

**Enzymatische Charakterisierung der humanen  
Inositolhexakisphosphat-Kinase 2 und zelluläre Funktion von  
pyrophosphorylierten Inositolphosphaten in  
*Rattus norvegicus* (BERKENHOUT, 1769)**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
am Fachbereich Biologie der Universität Hamburg

vorgelegt von  
**Natalie Bischoff**  
aus Hamburg

Hamburg 2005

Genehmigt vom  
Fachbereich Biologie der  
Universität Hamburg  
auf Antrag von Professor Dr. G. W. MAYR  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Professor Dr. H.-P: MÜHLBACH  
Tag der Disputation: 18. Februar 2005

Hamburg, den 03. Februar 2005



Professor Dr. Arno Frühwald  
Dekan

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. G. W. Mayr für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung sämtlicher technischer und finanzieller Mittel, sowie für zahlreiche kompetente Anregungen und echte Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. H.-P. Mühlbach danke ich für die bereitwillige Übernahme des Gutachtens seitens des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg.

Danke möchte ich auch Dr. Sabine Windhorst und Christine Blechner für die fachkundige und hilfsbereite Unterstützung besonders bei den Inhibitormessungen und –auswertungen und bei allen großen und kleinen Problemen der praktischen Laborarbeit.

Heike Gustke und Bettina Thiel danke ich für qualifizierte Unterstützung bei den HPLC-Analysen.

Gudrun Franke vom Medizinischen Proteom-Center der Ruhr-Universität in Bochum danke ich für die Durchführung und Auswertung der massenspektroskopischen Untersuchungen.

Herrn Prof. Dr. J. Kruppa möchte ich für die freundliche Bereitstellung der Ribosomenpräparationen danken.

Bei meinen jetzigen und ehemaligen Kollegen bedanke ich mich für anregende Diskussionen über wissenschaftliche und experimentelle Fragen.

**Inhaltsverzeichnis**

**Inhaltsverzeichnis ..... 1**

**1. Einleitung..... 5**

**1.1. Nomenklatur von Inositolphosphaten .....5**

**1.2. Inositolphosphate als zelluläre Signalmoleküle .....6**

1.2.1. Inositolphosphate als Regulatoren des Calciumsignals .....6

1.2.2. Inositolphosphate als nukleäre Effektoren .....9

1.2.3. Inositolphosphate als Effektoren des zellulären Membranflusses .....10

1.2.4. Effekte von hochphosphorylierten Inositolphosphaten bei der Zellproliferation und –  
differenzierung und Immunantwort .....11

1.2.5. Weitere zelluläre Funktionen von Inositolphosphaten .....12

**1.3. Die Enzyme des Inositolphosphat-Metabolismus .....13**

1.3.1. Inositolphosphatkinasen .....13

1.3.1.1. *Die Subfamilie der Inositol-1,4,5-trisphosphat-3-Kinasen.....14*

1.3.1.2. *Die Inositolphosphat-Multikinase.....16*

1.3.1.3. *Die Subfamilie der Inositolhexakisphosphat-Kinasen.....17*

1.3.1.4. *Die Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat-2-Kinase.....18*

1.3.1.5. *Die Inositol-1,3,4-trisphosphat-5/6-Kinase/Inositol-3,4,5,6-tetrakisphosphat-1-  
Kinase .....19*

1.3.2. Inositolphosphatphosphatasen .....19

**1.4. Der Inositolphosphat-Metabolismus.....20**

**1.5. Zielsetzung .....23**

**2. Material und Methoden ..... 24**

**2.1. Material .....24**

2.1.1. Geräte .....24

2.1.2. Software.....25

2.1.3. Verbrauchsmaterialien.....25

2.1.4. cDNA der humane IP6K-2 .....26

2.1.5. Plasmide .....27

2.1.6. Oligonukleotide .....27

2.1.7. Bakterienstämme.....28

2.1.8. Chemikalien .....28

2.1.9. Bakterienkultur: Medien und Lösungen .....28

2.1.10. Enzyme.....29

2.1.11. Längen- und Molekulargewichtstandards .....29

2.1.12. Puffer und Lösungen .....29

2.1.13. Antikörper .....32

2.1.14. Matrices .....32

2.1.15. Inositolphosphate.....32

**2.2. Molekularbiologische Methoden .....33**

2.2.1. Präparative und analytische Polymerasekettenreaktion (PCR).....33

2.2.2. QuikChange-Mutagenese .....33

2.2.3. Analytische und präparative Trennung von DNA in Agarosegelen.....34

2.2.4. DNA-Elution aus Agarosegelen .....34

2.2.5. *A-Tailing* von PCR-Produkten.....35

2.2.6. Ligation von DNA.....35

2.2.7. Konzentrationsbestimmung von DNA.....35

2.2.8. Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....36

2.2.9. Sequenzierung von DNA .....36

**2.3. Mikrobiologische Methoden .....37**

2.3.1. Sterilisierung von Lösungen und Geräten .....37

2.3.2. Kultur und Aufbewahrung von Bakterien .....37

2.3.3. Herstellung chemisch kompetenter Zellen.....37

2.3.4. Transformation von Bakterien.....38

2.3.5. Plasmidpräparation .....	38
<b>2.4. Biochemische Methoden .....</b>	<b>39</b>
2.4.1. Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	39
2.4.2. <i>Western-Blotting (semi-dry) und Immunprinting</i> .....	39
2.4.3. Bakterielle Expression rekombinanter HsIP6K-2 .....	40
2.4.4. Lyse des Expressionsansatzes .....	41
2.4.5. Affinitätschromatographie rekombinanter Fusionsproteine .....	41
2.4.5.1. <i>Chromatographie der Streptavidin-IP6K-2 über Streptactin-Sepharose</i> .....	41
2.4.5.2. <i>Chromatographie der Polyhistidin-IP6K-2 über Nickel-NTA (native Bedingungen)</i> .....	41
2.4.5.3. <i>Chromatographie der Polyhistidin-IP6K-2 über Nickel-NTA (denaturierende Bedingungen)</i> .....	42
2.4.5.4. <i>Chromatographie der GST-IP6K-2 über Glutathion-Sepharose B</i> .....	42
2.4.6. Ionenaustauschchromatographie .....	43
2.4.6.1. <i>Ionenaustauschchromatographie über Phosphozellulose</i> .....	43
2.4.6.2. <i>Ionenaustauschchromatographie über DEAE-Sepharcel</i> .....	43
2.4.7. Lagerung gereinigter rekombinanter IP6K-2.....	44
2.4.8. Proteinbestimmung nach Bradford .....	44
2.4.9. Densitometrische Proteinbestimmung .....	44
2.4.10. Enzymatische Charakterisierung der HsIP6K-2 .....	44
2.4.10.1. <i>Messung enzymatischer Reaktionsverläufe mit dem gekoppelten optischen Test</i> ..	45
2.4.10.2. <i>Bestimmung von Km-Werten mit dem gekoppelten optischen Test</i> .....	46
2.4.10.3. <i>Hemmung rekombinanter HsIP6K-2 durch bestimmte polyphenolische Inhibitoren</i> .....	47
2.4.10.4. <i>Messung des Hemmstoffeinflusses auf die Km-Werte von InsP<sub>6</sub> und ATP</i> .....	48
2.4.11. Analyse von Inositolphosphaten mit <i>Metal-Dye-Detection (MDD)–HPLC</i> .....	48
2.4.11.1. <i>Untersuchung der Substratspezifität der HsIP6K-2</i> .....	50
2.4.11.2. <i>Bestimmung des Km-Werts ausgewählter Substrate der HsIP6K-2 mit MDD-HPLC</i> ..	50
2.4.11.3. <i>Aufarbeiten von Inositolphosphaten aus in vitro-Enzymreaktionen für die Analyse mit MDD-HPLC</i> .....	50
2.4.12. Säurekatalysierte Hydrolyse von PP-InsP <sub>5</sub> .....	51
2.4.13. Enzymatische Synthese und Reinigung von hochphosphorylierten Inositolphosphaten .....	51
2.4.13.1. <i>Enzymatische Synthese von D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub></i> .....	52
2.4.13.2. <i>Enzymatische Synthese von 6[<sup>32</sup>P]-PP-InsP<sub>5</sub></i> .....	53
2.4.13.3. <i>Enzymatische Synthese von 5β[<sup>32</sup>P]-PP-InsP<sub>5</sub></i> .....	55
2.4.14. Gewinnung gereinigter fetaler Rattenleberextrakte .....	56
2.4.14.1. <i>Präparation der Lebern</i> .....	56
2.4.14.2. <i>Herstellen der Leberextrakte: Gewebeaufschluss</i> .....	56
2.4.14.3. <i>Trennen der Zellbestandteile: Differentielle Zentrifugation</i> .....	56
2.4.14.4. <i>Reinigen der Zellfraktionen: Ammoniumsulfatfällung</i> .....	57
2.4.14.5. <i>Entsalzen der Ammoniumsulfat-gefällten Proteine</i> .....	57
2.4.15. Überprüfen der enzymatischen Aktivität der gereinigten Rattenleberextrakte.....	58
2.4.16. Markierung von fetalen Rattenleberextrakten mit 6[ <sup>32</sup> P]-PP-InsP <sub>5</sub> /[ <sup>32</sup> P]-InsP <sub>6</sub> .....	58
2.4.16.1. <i>Vorversuche zur Markierung von fetalen Rattenleberextrakten mit 6[<sup>32</sup>P]-InsP<sub>6</sub>/6[<sup>32</sup>P]-PP-InsP<sub>5</sub></i> .....	58
2.4.16.2. <i>Standardreaktion zur Markierung von gereinigten fetalen Rattenleberextrakten mit 6[<sup>32</sup>P]-InsP<sub>6</sub>/6[<sup>32</sup>P]-PP-InsP<sub>5</sub></i> .....	60
2.4.16.3. <i>Vorbereiten von 6[<sup>32</sup>P]-InsP<sub>6</sub>/6[<sup>32</sup>P]-PP-InsP<sub>5</sub>-markiertem Rattenleberextrakt für die Analyse durch SDS-PAGE</i> .....	61
2.4.17. Chemische, biochemische und physikalische Eigenschaften der 6[ <sup>32</sup> P]-InsP <sub>6</sub> /6[ <sup>32</sup> P]-PP-InsP <sub>5</sub> -Markierung von Rattenleberextrakten .....	61
2.4.17.1. <i>Zeit- und Temperaturabhängigkeit der Markierung von Rattenleberextrakten mit 6[<sup>32</sup>P]-InsP<sub>6</sub>/6[<sup>32</sup>P]-PP-InsP<sub>5</sub></i> .....	61
2.4.17.2. <i>Säurestabilität der radioaktiver Signale in 6[<sup>32</sup>P]-InsP<sub>6</sub>/6[<sup>32</sup>P]-PP-InsP<sub>5</sub>-markierten Rattenleberextrakten</i> .....	62

2.4.17.3. Stabilität der radioaktiver Signale in $6[^{32}P]$ -InsP <sub>6</sub> / $6[^{32}P]$ -PP-InsP <sub>5</sub> -markierten Rattenleberextrakten gegenüber DNase, Proteasen und Alkali.....	62
2.4.18. Markierung von Proteinextrakt aus fetalen Rattenlebern mit $5\beta[^{32}P]$ -PP-InsP <sub>5</sub> .....	63
2.4.19. Identifizierung und Prüfung potentieller Zielproteine für eine Bindung von hochphosphorylierten Inositolphosphaten .....	64
2.4.19.1. Proteolyse von $6[^{32}P]$ -InsP <sub>6</sub> / $6[^{32}P]$ -PP-InsP <sub>5</sub> -markiertem Rattenleberextrakt .....	64
2.4.19.2. Massenspektrometrie .....	66
2.4.19.3. Bindung von hochphosphorylierten Inositolphosphaten an Ferritin.....	66
2.4.19.4. Zeitabhängigkeit der Markierung von Holo ferritin mit $6[^{32}P]$ -InsP <sub>6</sub> / $6[^{32}P]$ -PP-InsP <sub>5</sub> .....	66
2.4.19.5. Einfluss des Eisen-Chelators L1 auf die Markierung von Holo ferritin mit $6[^{32}P]$ -InsP <sub>6</sub> / $6[^{32}P]$ -PP-InsP <sub>5</sub> .....	67
2.4.19.6. Bindung von hochphosphorylierten Inositolphosphaten an ribosomale Proteine ....	67
2.4.20. Extraktion von Inositolphosphaten aus Ferritin.....	68
2.4.20.1. Proteolyse von Ferritin.....	68
2.4.20.2. Alkalische Hydrolyse von Ferritin zur Extraktion von Inositolphosphaten.....	68
2.4.20.3. Saure Extraktion von Inositolphosphaten aus Ferritin .....	68
2.4.20.4. Extraktion von Inositolphosphaten aus Ferritin mit Triton X-100 .....	68
2.4.21. Extraktion von Inositolphosphaten aus ribosomalen Proteinen .....	69
2.4.21.1. Alkalische Hydrolyse von ribosomalen Proteinen zur Extraktion von Inositolphosphaten .....	69
2.4.21.2. Saure Extraktion von Inositolphosphaten aus ribosomalen Proteinen .....	69
2.4.22. Aufarbeitung der Ferritin- und Ribosomen-Proben für die Analyse mit MDD-HPLC ..	69
<b>2.5. Zellbiologische Methoden.....</b>	<b>69</b>
2.5.1. Zelllinien .....	70
2.5.2. Zellkultur: Medien und Lösungen.....	70
2.5.3. Kontinuierliche Kultivierung von NRK52E- und H1299-Zellen .....	70
2.5.4. Aussaat von Zellen in 4-Kammerdeckgläser .....	71
2.5.5. Transiente Transfektion von NRK52E- und H1299-Zellen .....	71
2.5.6. Fixieren und Permeabilisieren von Zellen in Kammerdeckgläsern.....	71
2.5.7. Nachweis der HsIP6K-2 durch Immunfluoreszenzmarkierung .....	72
2.5.8. Färben der Zellkerne mit DAPI .....	72
2.5.9. Präparation von Zelllysaten aus H1299-Zellen.....	72
<b>2.6. Fluoreszenzmikroskopie.....</b>	<b>73</b>
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>74</b>
<b>3.1. Charakterisierung enzymatischer Eigenschaften der humanen IP6K-2.....</b>	<b>74</b>
3.1.1. Bestimmung der Km-Werte für InsP <sub>6</sub> und ATP.....	74
<b>3.2. Substratspezifität der HsIP6K-2 .....</b>	<b>79</b>
3.2.1. Umsatz der InsP <sub>5</sub> -Enantiomere D-Ins(1,2,4,5,6)P <sub>5</sub> und D-Ins(2,3,4,5,6)P <sub>5</sub> durch IP6K-2 .....	80
3.2.2. Umsatz der InsP <sub>5</sub> -Enantiomere D-Ins(1,2,3,4,5)P <sub>5</sub> und D-Ins(1,2,3,5,6)P <sub>5</sub> durch IP6K-2 .....	83
3.2.3. Umsatz der InsP <sub>5</sub> -Isomere D-Ins(1,3,4,5,6)P <sub>5</sub> und D-Ins(1,2,3,4,6)P <sub>5</sub> durch IP6K-2 ..	85
3.2.4. Substrateignung verschiedener InsP <sub>4</sub> - und InsP <sub>3</sub> -Isomere.....	86
3.2.5. Zusammenfassung der Substratspezifitäten.....	88
<b>3.3. Inhibitoren der IP6K-2-Aktivität .....</b>	<b>90</b>
3.3.1. Bestimmung der IC <sub>50</sub> -Werte für ausgewählte polyphenolische Inhibitoren .....	90
3.3.2. Messung des Hemmstoffeinflusses auf die Km-Werte von InsP <sub>6</sub> und ATP.....	92
<b>3.4. Lokalisation der HsIP6K-2 .....</b>	<b>95</b>
<b>3.5. Markierung gereinigter fetaler Rattenleberextrakten mit InsP<sub>6</sub>/PP-InsP<sub>5</sub> .....</b>	<b>99</b>
3.5.1. Enzymatische Aktivität der gereinigten Rattenleberextrakte .....	101
3.5.2. Enzymatische Synthese von $6[^{32}P]$ -PP-InsP <sub>5</sub> .....	102
3.5.3. Enzymatische Synthese von $5\beta[^{32}P]$ -PP-InsP <sub>5</sub> .....	104
3.5.4. Markierung von Extrakten aus fetalen Rattenlebern mit $6[^{32}P]$ -InsP <sub>6</sub> / $6[^{32}P]$ -PP-InsP <sub>5</sub> ..	105
3.5.4.1. Einfluss der Calcium- und Magnesium-Konzentration, Hitze und TCE-Fällung auf die Markierung von fetalen Rattenleberextrakten mit $6[^{32}P]$ -InsP <sub>6</sub> / $6[^{32}P]$ -PP-InsP <sub>5</sub> .....	105

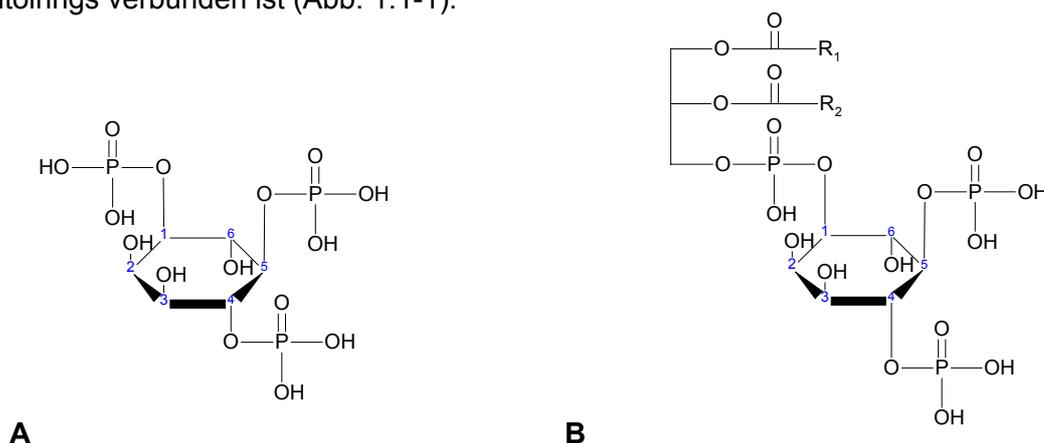
3.5.4.2. Zeit- und Temperaturabhängigkeit der Markierung von Rattenleberextrakten mit $6[^{32}P]$ -InsP <sub>6</sub> / $6[^{32}P]$ -PP-InsP <sub>5</sub> .....	109
3.5.4.3. Säurestabilität der radioaktiver Signale in $6[^{32}P]$ -InsP <sub>6</sub> / $6[^{32}P]$ -PP-InsP <sub>5</sub> -markierten Rattenleberextrakten .....	110
3.5.4.4. Stabilität der radioaktiver Signale in $6[^{32}P]$ -InsP <sub>6</sub> / $6[^{32}P]$ -PP-InsP <sub>5</sub> -markierten Rattenleberextrakten gegenüber DNase, Proteasen und Alkali.....	112
3.5.4.5. Proteolyse von $6[^{32}P]$ -InsP <sub>6</sub> / $6[^{32}P]$ -PP-InsP <sub>5</sub> -markierten Rattenleberextrakten ....	114
3.5.5. Phosphorylierung von fetalen Rattenleberextrakten durch $5\beta[^{32}P]$ -PP-InsP <sub>5</sub> .....	115
3.5.6. Identifizierung von möglichen Inositolphosphat-markierten Peptiden mit Massenspektrometrie .....	117
3.5.6.1. Vorbereiten von Proben für die Massenspektrometrie .....	117
3.5.6.2. Ergebnisse der massenspektrometrische Untersuchung der SDS-Gelbanden.....	118
<b>3.6. Ferritin als möglicher Bindungspartner für hochphosphorylierte Inositolphosphate.....</b>	<b>122</b>
3.6.1. Bindung von hochphosphorylierten Inositolphosphaten an Ferritin .....	122
3.6.1.1. Zeitabhängigkeit der Markierung von Ferritin mit $6[^{32}P]$ -InsP <sub>6</sub> / $6[^{32}P]$ -PP-InsP <sub>5</sub> .....	123
3.6.1.2. Einfluss des Eisen-Chelators L1 auf die der Markierung von Holo ferritin mit $6[^{32}P]$ -InsP <sub>6</sub> / $6[^{32}P]$ -PP-InsP <sub>5</sub> .....	123
3.6.1.3. Extraktion von Inositolphosphaten aus isoliertem Ferritin .....	125
<b>3.7. Ribosomen als möglicher Bindungspartner für hochphosphorylierte Inositolphosphate.....</b>	<b>128</b>
3.7.1. Bindung von hochphosphorylierten Inositolphosphaten an ribosomale Proteine .....	128
3.7.2. Extraktion von Inositolphosphaten aus ribosomalen Proteinen .....	129
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>130</b>
<b>4.1. Charakterisierung der enzymatischen Eigenschaften der HsIP6K-2.....</b>	<b>130</b>
<b>4.2. Substratspezifität der humanen IP6K-2.....</b>	<b>132</b>
4.2.1. Strukturelle Voraussetzungen für die Substraterkennung .....	132
4.2.1.1. Generelle Voraussetzungen für eine Phosphorylierung an der D-3'-äquivalenten Hydroxygruppe (D-3'-OH) .....	133
4.2.1.2. Die D-2'- und D-4'-äquivalenten Phosphatgruppen (2*- und 4*-P) .....	134
4.2.1.3. Die D-1'- und die D-6'-äquivalente Phosphatgruppe (D-1* und D-6*) .....	135
4.2.1.4. Die D-5'-äquivalente Phosphatgruppe (D-5*) .....	135
4.2.1.5. Pyrophosphorylierung alternativer Substrate.....	135
4.2.1.6. Zusammenfassung der Substratspezifitäten.....	137
4.2.2. Alternative Metabolisierungswege zur Synthese von InsP <sub>6</sub> und Inositolpyrophosphaten.....	139
<b>4.3. Inhibitoren der HsIP6K-2.....</b>	<b>142</b>
4.3.1. Bekannte Wirkungen der eingesetzten Inhibitoren auf zelluläre Zielmoleküle .....	142
4.3.2. Die IP6K-2 als potentielles zelluläres Ziel für die getesteten Inhibitoren .....	145
4.3.3. Strukturelemente potenter Hemmstoffe der HsIP6K-2 .....	147
4.3.4. Hemmtypen der Inhibitoren ECG, THF und Quercetin in Bezug auf die Substrate InsP <sub>6</sub> und ATP .....	148
4.3.5. Selektivität der untersuchten Inhibitoren für verschiedene IP-Kinasen .....	149
4.3.6. Schlussfolgerung .....	151
<b>4.4. Lokalisation der HsIP6K-2 in NRK52E- und H1299-Zellen .....</b>	<b>152</b>
<b>4.5. Bindung von InsP<sub>6</sub> / PP-InsP<sub>5</sub> an fetale Rattenleberextrakte .....</b>	<b>154</b>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>162</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>163</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>I</b>
<b>A1. Abbildungen.....</b>	<b>I</b>
<b>A2. HPLC-Gradienten.....</b>	<b>II</b>
<b>A3. Verzeichnis der Abkürzungen .....</b>	<b>III</b>
<b>A4. Abkürzungen der Aminosäuren .....</b>	<b>VII</b>
<b>A5. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>A6. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>IX</b>

## 1. Einleitung

Inositolphosphate (InsP) sind seit etwa 85 Jahren bekannt. Damals wurde angenommen, dass InsP die Funktion von Phosphatspeichermolekülen in Pflanzen haben. Nachdem in den 80er Jahren Inositol-1,4,5-trisphosphat (Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>) als wichtiger zellulärer, Calcium-mobilisierender, sekundärer Botenstoff erkannt wurde, konnten eine Reihe weiterer zellulärer InsP identifiziert werden [Irvine & Schell, 2001]. Über die Funktion der meisten InsP ist nach wie vor wenig bekannt, einige konnten jedoch mit unterschiedlichen zellulären Funktionen in Verbindung gebracht werden, auf die in Abschnitt 1.2. näher eingegangen wird. Neben einfach phosphorylierten InsP wurden inzwischen auch eine Reihe pyrophosphorylierter InsP (PP-InsP) gefunden, deren Rolle in zellulären Stoffwechsel- und Signaltransduktionsprozessen weitgehend unklar ist. Die Inositolhexakisphosphat-Kinase 2 (IP6K-2), die ein metabolisches Bindeglied zwischen dem Stoffwechsel der InsP und PP-InsP darstellt, wurde in der vorliegenden Arbeit enzymatisch charakterisiert und mögliche, bisher unbekannt Funktionen von hochphosphorylierten InsP und PP-InsP untersucht.

### 1.1. Nomenklatur von Inositolphosphaten

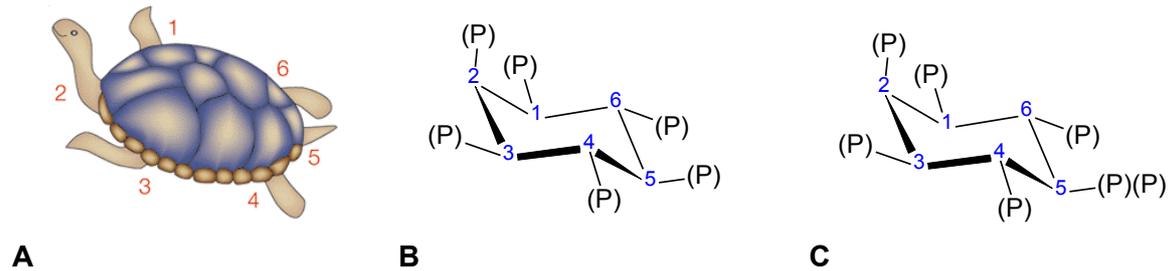
Inositolphosphate bestehen aus einem Inositolring, der eine unterschiedlichen Anzahl von Phosphatgruppen tragen kann. Sie sind aus diesem Grund wasserlöslich. Phosphatidylinositolphosphate (PtdInsP) tragen zusätzlich einen hydrophoben Rest, der aus zwei Fettsäuren und Glycerol besteht, das über eine Phosphodiesterbindung mit der 1-Hydroxygruppe des Inositolrings verbunden ist (Abb. 1.1-1).



**Abb. 1.1-1: Struktur von Inositolphosphaten und Phosphatidylinositolphosphaten.** A: Inositol-1,4,5-trisphosphat. B: Phosphatidylinositol-4,5-phosphat, R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> sind Fettsäurereste. Die Kohlenstoffatome sind nach D-Nomenklatur nummeriert.

Zur Vereinfachung der Nomenklatur der InsP kann ein *myo*-InsP-Molekül, das in Sesselkonformation dargestellt ist, mit einer Schildkröte verglichen werden [Agranoff, 1978]. Dabei markiert das rechte Vorderbein die D-1'-Position. Die Nummerierung nach der inzwischen

allgemein verwendeten D-Nomenklatur erfolgt gegen den Uhrzeigersinn, so dass die axiale Phosphatgruppe in D-2'-Position steht (Abb. 1.1-2 A und B).



**Abb. 1.1-2: Nummerierung von Inositolphosphaten.** A: Agranoffs Schildkröte [Irvine & Schell, 2001]. B: Inositolhexakisphosphat ( $\text{InsP}_6$ ). C: 5-Diphosphoinositolpentakisphosphat ( $\text{PP-InsP}_5$ ). Phosphatgruppen sind vereinfacht als (P) dargestellt. Die Kohlenstoffatome sind nach D-Nomenklatur nummeriert.

Mathematisch ist es denkbar, dass 63 Inositolmonophosphate existieren. Nach der Entdeckung von zellulären pyrophosphorylierten  $\text{InsP}$ , bei denen eine weitere Phosphatgruppe mit einer bereits bestehenden Phosphatgruppe verknüpft ist, steigt die Anzahl der theoretisch existierenden  $\text{InsP}$  um ein Vielfaches. Diese Pyrophosphatgruppen sind in Mammalia beim Diphosphoinositolpentakisphosphat ( $\text{PP-InsP}_5$ ) an D-5'-Position des Inositolphosphatringes lokalisiert [Albert *et al.*, 1997] (Abb. 1.1-2 C). Die Stellung der Pyrophosphatgruppen in Diphosphoinositoltettrakisphosphat ( $\text{PP-InsP}_4$ ) und Bis-diphosphoinositoltettrakisphosphat ( $(\text{PP})_2\text{-InsP}_4$ ) sind bisher spekulativ, wobei angenommen wird, dass beim  $\text{PP-InsP}_4$  die Pyrophosphatgruppe ebenfalls an D-5'-Position gebunden ist und beim  $(\text{PP})_2\text{-InsP}_4$  zumindest eine der beiden Pyrophosphatgruppen ebenfalls an dieser Position lokalisiert ist [Safrany *et al.*, 1999].

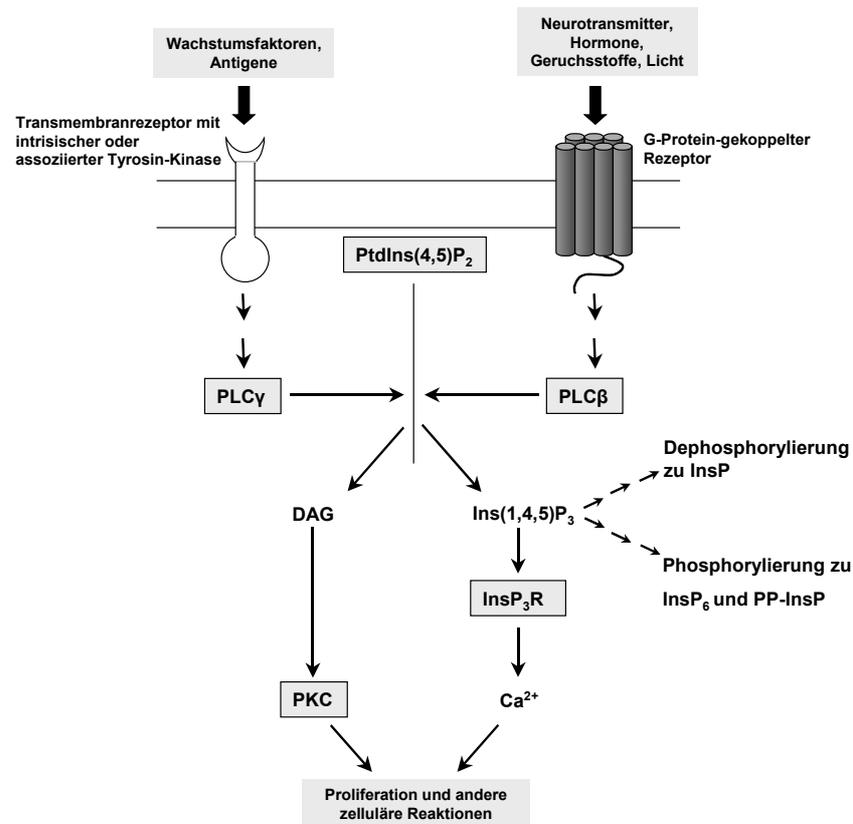
*Myo*-Inositolphosphate haben eine Symmetrieebene, die von der axialen D-2'-Gruppe zur äquatorialen D-5'-Gruppe verläuft. Anhand dieser Symmetrieebene können Enantiomerenpaare voneinander unterschieden werden. So ist beispielsweise D- $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$  das Enantiomer von D- $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ .

## 1.2. Inositolphosphate als zelluläre Signalmoleküle

### 1.2.1. Inositolphosphate als Regulatoren des Calciumsignals

Es ist bereits seit längerem bekannt, dass  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  ein wichtiger sekundärer Botenstoff bei der Generierung des Calciumsignals in Zellen ist. Das Calciumsignal hat eine zentrale Funktion bei der Umwandlung extrazellulärer Stimuli in zellinterne Signale, Signalverstärkung und Vermittlung einer spezifischen Zellantwort, wodurch Prozesse der Zellteilung, Zelldifferenzierung und des Zelltods koordiniert werden. Zudem steuert es die Muskelkontraktion und vermittelt sekretorische und neuronale Vorgänge [Berridge *et al.*, 2000]. Betroffen von der

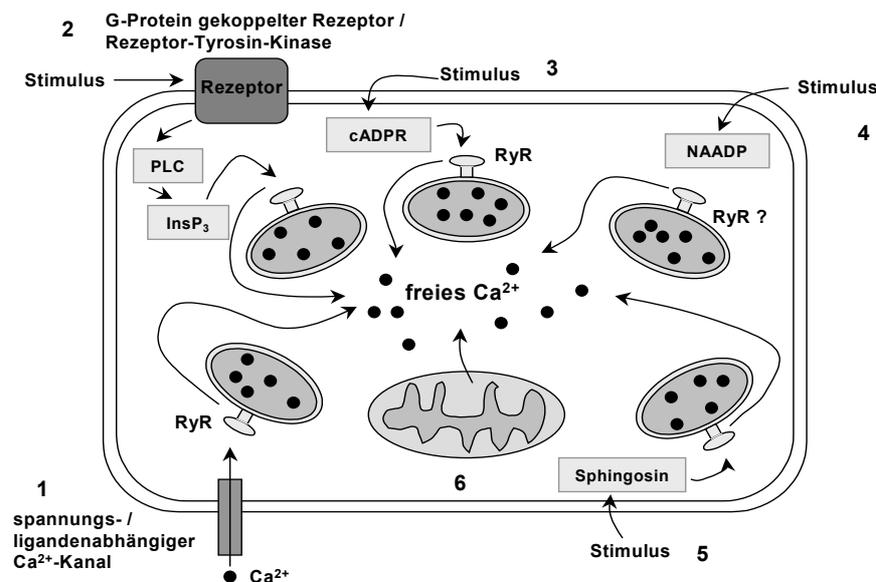
Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-vermittelten Signaltransduktion sind beispielsweise Prozesse der Transkription, Translation, des Stoffwechsels und Aus- und Umbildung des Zytoskeletts.



**Abb. 1.2-1: Schematische Darstellung der Bildung von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> und DAG.** Verschiedene extrazelluläre Stimuli aktivieren Transmembranrezeptoren mit intrinsischer oder assoziierter Tyrosinkinase-Aktivität oder trimere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Die Aktivierung der Rezeptoren führt zur Aktivierung von Phospholipasen, die PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> zu DAG und Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> hydrolysieren. Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> bindet an den InsP<sub>3</sub>R am Endoplasmatischen/Sarkoplasmatischen Retikulum (ER/SR), wodurch Ca<sup>2+</sup> aus dessen Lumen freigesetzt wird und verschiedene zelluläre Prozesse induziert. DAG aktiviert die PKC, womit ebenfalls zelluläre Prozesse reguliert werden. PLCβ: Phospholipase β; PLCγ: Phospholipase γ; DAG: Diacylglycerol; PKC: Proteinkinase C; InsP<sub>3</sub>R: Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-Rezeptor; InsP: Inositol(mono)phosphat; InsP<sub>6</sub>: Inositolhexakisphosphat; PP-InsP: Inositolpyrophosphat. Verändert nach Krauss, 2003: S. 239.

Zellen reagieren über zwei Signalwege auf bestimmte extrazelluläre Stimuli mit der Generierung von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>. Ein Signalweg führt über die Aktivierung von trimeren G-Protein-gekoppelten Rezeptoren durch Neurotransmitter wie Acetylcholin und Glutamat, Hormone, Geruchsstoffe oder Licht zur Stimulation der Phospholipase C β (PLCβ), die das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) zu Diacylglycerol (DAG) und Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> spaltet. Ein zweiter Weg, der über die Bindung von z.B. Wachstumsfaktoren und Antigenen an Rezeptor-gekoppelte Tyrosinkinasen ausgelöst wird, führt zur Stimulation der PLCγ und ebenfalls zur Spaltung von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> zu DAG und Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> (Abb. 1.2-1). Während DAG zur Aktivierung der membranlokalisierten Proteinkinase C (PKC) führt, bindet Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> an spezifische Rezeptoren (InsP<sub>3</sub>R) am Endoplasmatischen Retikulum (ER)

bzw. Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) und löst dort eine Freisetzung von Calcium-Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) aus dem ER/SR-Lumen aus. Durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in das Zytoplasma wird eine Verstärkung des Calciumsignals durch Aktivierung plasmamembranständiger spannungsabhängiger Calciumkanäle herbeigeführt (Calcium-induziertes Calciumsignal), wobei  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem extrazellulären Raum in die Zelle einströmt. Zytoplasmatisches  $\text{Ca}^{2+}$  stimuliert außerdem den ER-ständigen Ryanodin-Rezeptor (RyR), der ebenfalls an einen Calciumkanal gekoppelt ist. An der Generierung des Calciumsignals sind neben  $\text{InsP}_3$ , dem  $\text{InsP}_3$ R-Kanal und dem spannungsabhängigen Calciumkanal noch andere Effektoren und Calciumkanäle beteiligt. So moduliert zyklische Adenosindiphosphat-Ribose (cADPR), die über eine membranständige rezeptorabhängige ADP-rybosyl-Zyklase gebildet wird, die Effektivität mit der  $\text{Ca}^{2+}$  auf den RyR wirkt. Ein weitere  $\text{Ca}^{2+}$ -Effektor ist Nikotinsäure-Adenin-Dinukleotidphosphat (NAADP), das auf bisher unbekanntem Weg in der Zelle gebildet wird und auf einen weiteren, putativen, bisher wenig charakterisierten Calciumkanal wirkt [Guse, 2004]. Die an der Generierung des Calciumsignals beteiligten Hauptwege sind in Abb. 1.2-2 dargestellt.



**Abb. 1.2-2: Schematische Darstellung der Calcium-freisetzenden Elemente.** 1: Calcium-induzierte Calcium-Freisetzung über Ryanodinrezeptoren (RyR) durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx über plasmamembranständige, spannungs- oder ligandenabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. 2: PLC/ $\text{InsP}_3$ -vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung. 3:  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch zyklische ADP-Ribose (cADPR). 4:  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch Nikotinsäure-Adenin-Dinukleotidphosphat (NAADP) über einen unbekanntem Receptor, der möglicherweise aber ein RyR ist. 5:  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch Sphingosin-1-phosphat. 6:  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch Mitochondrien. Verändert nach Krauss, 2003: S. 245.

Sarkoplasmatische/endoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen (SERCA), an der Plasmamembran lokalisierte  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen (PMCA) und  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ -Austauscher regulieren in Ruhephasen die intrazelluläre Calcium-Konzentration, so dass keine dauerhafte Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration stattfindet. Außerdem nehmen Mitochondrien während des Anstiegs

der zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration schnell Calcium-Ionen auf und geben diese später langsam über einen  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ -Austauscher wieder in das Zytoplasma ab.

Ein weiteres InsP, Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphat ( $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ ), wird auch mit Modulation des  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  vermittelten Calciumsignals in Verbindung gebracht. Einerseits wird  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  durch die gleiche 5-Phosphatase, aber mit höherer Effektivität wie  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  hydrolysiert [Connolly *et al.*, 1987], was auf eine Schutzfunktion in Bezug auf die Hydrolyse von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  hindeutet. Zudem wurde in Endothelzellen gezeigt, dass  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$   $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in der Plasmamembran aktivieren kann [Luckhoff & Clapham, 1992]. Weiterhin gibt es Hinweise, dass  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  die Aktivität von  $\text{InsP}_3$ -Rezeptoren modulieren kann [Bird & Putney, 1996; Hermosura *et al.*, 2000]. Außerdem wurde ein Protein der Familie der GTPase-aktivierenden Proteine (GAP1) als möglicher  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -Rezeptor identifiziert [Cullen *et al.*, 1995], wodurch  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  direkt die Calcium-vermittelte Aktivierung von Ras GTPasen regulieren und dadurch andere Signalwege (z.B. MAPK/ERK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase/Extrazellulär-Signal-regulierte Kinase)) oder auch indirekt das Calciumsignal über eine Aktivierung der  $\text{PLC}\epsilon$  beeinflussen könnte [Cullen & Lockyer, 2002].

Für  $\text{InsP}_6$  sind Calcium-aktivierende Eigenschaften in pankreatischen  $\beta$ -Zellen und Neuronen beschrieben worden. Die intrazelluläre Calcium-Konzentration ist in pankreatischen  $\beta$ -Zellen entscheidend für die Exozytose bzw. Insulinsekretion. Es konnte beobachtet werden, dass die intrazelluläre  $\text{InsP}_6$ -Konzentration in Korrelation mit dem Calcium-Influx über spannungsabhängige Calciumkanäle in Folge eines extrazellulären Stimulus mit Glukose ansteigt. Dabei wird der Calcium-Influx indirekt über  $\text{InsP}_6$  reguliert. Einerseits hemmt  $\text{InsP}_6$  eine Serin/Threonin-Phosphatase, die spannungsabhängige Calciumkanäle dephosphoryliert und so die Kanäle desensibilisiert oder inhibiert. Gleichzeitig stimuliert  $\text{InsP}_6$  die  $\text{PKC}\epsilon$ , was zu einer Phosphorylierung und Aktivitätssteigerung des Kanals führt [Barker & Berggren, 1999; Høy *et al.*, 2003]. In Neuronen beeinflusst  $\text{InsP}_6$  offenbar die durch zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) vermittelte Signaltransduktion. Dabei stimuliert  $\text{InsP}_6$  die Adenylatzyklase, wodurch eine Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) herbeigeführt wird [Yang *et al.*, 2001]. Die PKA phosphoryliert u.a. bestimmte spannungsabhängige Calciumkanäle der Plasmamembran, wodurch deren Aktivität erhöht und der Calcium-Influx verstärkt wird. Die Aktivität der cAMP-Phosphodiesterasen wird nicht durch  $\text{InsP}_6$  beeinflusst, wodurch cAMP nicht hydrolysiert wird.

### 1.2.2. Inositolphosphate als nukleäre Effektoren

Verschiedene Inositolphosphate sollen die Remodulierung von Chromatin über Bindung an ATPabhängige Chromatin-Remodulierungs-Komplexe beeinflussen. Chromatin-Remodulierungs-Komplexe vermitteln nichtkovalente Konformationsänderungen von Nukleosomen

während der Transkription. Dabei werden DNA und Histone neu geordnet und das Nukleosom auf dem DNA-Strang bewegt. Studien *in vitro* und mit Hefen zeigten eine Aktivierung des Chromatin-Remodulierungs-Komplexes SWI/SNF durch Bindung von Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub> oder Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>. Dagegen wirkte eine Bindung von InsP<sub>6</sub> an die Chromatin-Remodulierungs-Komplexe NURF, ISW2, INO80 inaktivierend [Shen *et al.*, 2003]. Außer einer putativen Funktion bei der Chromatin-Remodulierung sind hochphosphorylierte InsP in weitere nukleäre Prozesse eingebunden, die eine DNA-Reparatur in Folge von DNA-Doppelstrangbrüchen vermitteln. Es wurde gezeigt, dass InsP<sub>6</sub> an die Ku-Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK) bindet und so die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen über die nicht-homologe Endverknüpfung stimuliert [Hanakahi & West, 2002; Ma & Lieber, 2002; Byrum *et al.*, 2004]. In Hefe werden für homologe Rekombination offenbar PP-InsP<sub>5</sub> und (PP)<sub>2</sub>-InsP<sub>4</sub> benötigt. Es wird davon ausgegangen, dass dabei eine Phosphorylierung verschiedener, an diesem Prozess beteiligter Proteine durch Phosphatgruppen der Pyrophosphate stattfindet [Luo *et al.*, 2002]. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass InsP<sub>6</sub> für den nukleären mRNA-Export in Hefe wesentlich ist [York *et al.*, 1999].

### 1.2.3. Inositolphosphate als Effektoren des zellulären Membranflusses

Die Beteiligung von InsP an Prozessen der Endo- und Exozytose, sowie der Membranintegrität ist bisher überwiegend nur für die hochphosphorylierten InsP InsP<sub>6</sub>, PP-InsP<sub>5</sub> und (PP)<sub>2</sub>-InsP<sub>4</sub> diskutiert worden. Häufig sind aber die Ergebnisse der verschiedenen Studien nicht eindeutig, da auch andere InsP wie Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> und Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> die putativen Interaktionspartner binden. Zudem deuten einige Studien darauf hin, dass die eigentlichen Modulatoren von Endo- und Exozytose PtdInsP wie z.B. PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> sind [Irvine & Schell, 2001; Shears, 2001]. InsP<sub>6</sub> bindet *in vitro* an ein Protein des synaptischen Vesikel-Komplexes, Synaptotagmin I. Synaptotagmin I fördert Ca<sup>2+</sup>-abhängig die Exozytose von Neurotransmittern [Lu *et al.*, 2002]. Durch Injektion von InsP<sub>6</sub> in Tintenfischsynapsen konnte die Neurotransmitter-Ausschüttung von synaptischen Vesikeln inhibiert werden [Llinas *et al.*, 1994]. InsP<sub>6</sub> wird ebenfalls eine Funktion bei der Formation des Clathrin-Käfigs bei der Endozytose zugesprochen. Auch hier zeigten *in vitro*-Experimente, dass InsP<sub>6</sub> an die Adapter-Proteine AP-2 [Voglmaier *et al.*, 1992, Mizutani *et al.*, 1997] und AP-180 [Norris *et al.*, 1995; Ye *et al.*, 1995] bindet und so die Ausbildung des Clathrin-Käfigs inhibiert. Als weiteres Zielprotein für die Bindung von InsP<sub>6</sub> wird Arrestin diskutiert. Arrestine interagieren mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, wodurch diese desensitiviert und internalisiert werden. Die Bindung von InsP<sub>6</sub> an Arrestin soll diese Rezeptor-Internalisierung verhindern [Gaidarov *et al.*, 1999]. Weiterhin existiert in Synapsen eine InsP<sub>6</sub>/PP-InsP<sub>5</sub>-sensitive, bisher nicht näher identifizierte Proteinkinase, die den Pacsin/Syndapin I-Komplex phosphoryliert [Hilton *et al.*, 2001]. Dieser Komplex verknüpft Endozytosevesikel mit dem Zytoskelett bzw. mit dem Motorprotein Dynamin I.

### 1.2.4. Effekte von hochphosphorylierten Inositolphosphaten bei der Zellproliferation und –differenzierung und Immunantwort

Es gibt verschiedene Hinweise, dass in Zellkulturen extrazellulär zugeführtes  $\text{InsP}_6$  Signalwege beeinflusst, die der Zell-Zell-Kommunikation und der Regulation von Wachstum und Differenzierung dienen und verschiedene Funktionen in Zellen des Immunsystems und des Blutbildungssystems erfüllen. Diese Signalwege werden häufig über extrazelluläre Botenstoffe, z.B. Zytokine aktiviert. Zu den Zytokinen gehören z.B. Interleukine (IL), Interferone (IFN), Wachstumshormone und Tumor-Nekrosis-Faktor (TNF). Die Signaltransduktion verläuft über spezifische Transmembranrezeptoren mit intrinsischer oder assoziierter Tyrosin-Kinase-Aktivität. Bekannte Zytokin-vermittelte Signalwege sind der Jak/Stat- (Janus-Kinase/Signal-Transduktor und -Aktivator der Transkription), Ras-Signalwege mit MAPK-Kaskade und der  $\text{InsP}_3$ -vermittelte Calciumsignalweg über  $\text{PLC}\gamma$ . In Neutrophilen konnte gezeigt werden, dass eine Kostimulation von  $\text{InsP}_6$  und einem entzündungsauslösenden Wirkstoff zu einer erhöhten IL-8-Sekretion gegenüber Kontrollzellen führt [Eggleton, 1999]. In menschlichen Ovarial-Karzinom-Zellen konnte im Zuge der IFN- $\beta$ -regulierten Apoptose eine deutliche Erhöhung des IP6K-Levels festgestellt werden [Morrison *et al.*, 2001], was auf eine Beteiligung des Substrats ( $\text{InsP}_6$ ) und/oder des Produkts ( $\text{PP-InsP}_5$ ) des Enzyms an der Vermittlung des apoptotischen Signals hinweist. In weiteren Experimenten konnte die gleiche Gruppe zeigen, dass auch die Apoptose in Folge von DNA-Schädigung durch  $\gamma$ -Strahlung eine erhöhte Expression der IP6K-2 verursacht, wobei DR4 (*Death Receptor 4*) hochreguliert wird [Morrison *et al.*, 2002]. Beide Apoptosewege aktivieren Caspase 8 und damit verbundene apoptotische Folgeprozesse, wie limitierte Proteolyse zur Aktivierung anderer Caspasen, Proteolyse zellulärer Proteine und Zelltod. Eine Funktion der IP6K-2 bei der Aktivierung und Expression von Caspase 8 konnte durch eine positive Korrelation der IP6K-2- und Caspase 8-Expressionslevel in IP6K-2 überexprimierenden Ovarial-Karzinom-Zellen belegt werden [Morrison *et al.*, 2002]. Ein weiterer Hinweis, dass  $\text{InsP}_6$  apoptotische Prozesse beeinflusst, konnte auch in HeLa-Zellen gefunden werden. Hier konnte in Folge von Behandlung der Zellen mit  $\text{InsP}_6$  eine Permeabilisierung der Mitochondrien mit nachfolgender Freisetzung von Cytochrom C beobachtet werden, wodurch verschiedene an apoptotischen Prozessen beteiligte Caspasen aktiviert werden. Gleichzeitig inhibiert  $\text{InsP}_6$  den Akt-NF $\kappa$ B (Akt-Kinase/Proteinkinase B-Nuklear-Faktor  $\kappa$ B) –Signalweg, der für ein Überleben der Zelle notwendig ist [Ferry *et al.*, 2002].

Verschiedene Studien konnten eine antiproliferative und apoptotische Wirkung von extrazellulär zugeführtem  $\text{InsP}_6$  belegen. Bestimmte Krebsarten zeichnen sich durch besonders hohe Expressionslevel des Epidermalen-Wachstums-Faktor-Rezeptors (EGFR oder ErbB1) aus. Die Aktivierung dieses Rezeptors löst über Bindung des Adaptorproteins Shc und der Phosphatidyl-3-kinase (PI3K) Signalkaskaden aus, die antiapoptotisch wirken oder die Zell-

wachstum und -teilung vermitteln, wie den PI3K/Akt- und den MAPK/ERK -Signalweg. MAP-Kinasen werden direkt in den Nukleus transloziert, wo sie die Transkriptionsfaktoren für die Zellteilung- und differenzierung aktivieren. Nach Ligandenbindung wird der EGFR u.a. mit Hilfe von AP-2 endozytiert und degradiert. In Prostatakarzinom-Zellen der Linie DU145 konnte gezeigt werden, dass  $\text{InsP}_6$  an den aktivierten EGFR-AP-2-Komplex bindet und so die Bindung von Shc und PI3K inhibiert [Zi *et al.*, 2000]. Zusätzlich inhibiert  $\text{InsP}_6$  verschiedene Cyclin-abhängige Kinasen (CDK2, 4, und 6) und Cycline (Cyclin D1 und E) und verursacht eine erhöhte Expression von bestimmten Cyclin-Kinase-Inhibitoren (CKI) wodurch das Zellwachstum einem G1-Arrest unterliegt [Singh *et al.*, 2003].

Aber nicht nur  $\text{InsP}_6$  kann mit der Induktion und/oder Vermittlung der Apoptose in Verbindung gebracht werden. Eine Studie mit Ovarial-, Brust- und Lungen-Karzinomzellen konnte einen positiven Effekt von u.a.  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  auf die Apoptose über den PI3K/Akt-Signalweg belegen [Piccolo *et al.*, 2004]. Die Autoren vermuten hierbei eine kompetitive Hemmung der PI3K über Bindung bestimmter  $\text{InsP}$  an die Pleckstrin-homologe (PH)-Domäne von Akt, wodurch eine Interaktion mit dem eigentlichen Substrat ( $\text{Ptd}(3,4,5)\text{P}_3$ ) verhindert wird.

### 1.2.5. Weitere zelluläre Funktionen von Inositolphosphaten

Für Inositolphosphate sind noch weitere zelluläre Funktionen beschrieben worden, auf die an dieser Stelle nur sehr kurz eingegangen wird. Zu erwähnen ist dabei Inositol-3,4,5,6-tetrakisphosphat ( $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ ), das mit der Modulation der Chlorid-Sekretion in Verbindung gebracht wird. In Endothelzellen ist  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$  ein Inhibitor von  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Kinase II (CaMKII)-aktivierten Chloridkanälen [Ismailov *et al.*, 1996; Xie *et al.*, 1996; Ho *et al.*, 2001].  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte  $\text{Cl}^-$ -Kanäle regulieren z.B. die Kontraktion von glatten Muskeln und die Neurotransmission. Mindestens ein nicht CaMKII-aktivierter  $\text{Cl}^-$ -Kanal (CIC) wird offenbar ebenfalls durch  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$  gehemmt, wobei der genaue Mechanismus der Hemmung unbekannt ist. Dieser CIC-Kanal befindet sich in den Insulin-sekretierenden Granula in pankreatischen  $\beta$ -Zellen und ist für den Ladungsausgleich in Folge der Ansäuerung der Granula durch die Aktivität eine  $\text{H}^+$ -ATPase notwendig [Renström *et al.*, 2002].

Für  $\text{InsP}_6$  ist beschrieben, dass es in der Zelle antioxidative Funktionen hat [Graf *et al.*, 1984, Graf & Empson, 1987] und an Hämoglobin A binden und so die Affinität für Sauerstoff erniedrigen kann [Jänig *et al.*, 1971]. In Pflanzen, besonders in Karyopsen, ist  $\text{InsP}_6$  ein bedeutender Phosphatspeicher, außerdem kann es die Abscisinsäure-vermittelte, stressinduzierte Stomatabewegung durch Modulation des  $\text{K}^+$ -Influx beeinflussen [Lemtiri-Chlieh *et al.*, 2000].

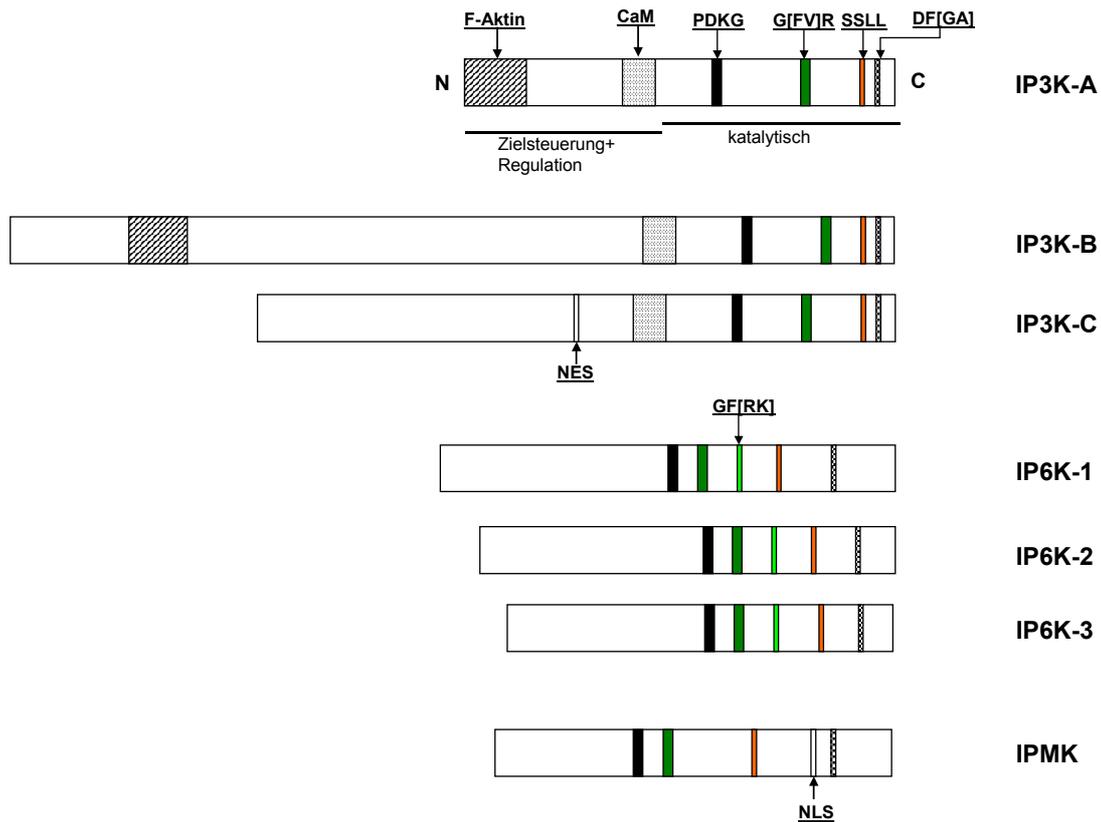
Über die Funktion der verschiedenen PP- $\text{InsP}$  ist bisher wenig bekannt. Es wird aber vermutet, dass eine ihrer Funktionen in der Phosphorylierung von Proteinen über die Pyrophosphatgruppe liegen könnte (1.2.2.). Eine andere Möglichkeit, bei der PP- $\text{InsP}$  als

posttranslationale Modifikatoren von Proteinen wirken könnten, wurde in der Doktorarbeit von S. Haverland [2001] aufgezeigt. Dieser konnte mit verschiedenen Extraktionsmethoden, die geeignet waren, kovalente Bindungen zwischen Molekülen zu hydrolysieren, an Extrakten aus Rattenleber und -herz zeigen, dass eine signifikante Menge (bis zu etwa 40 nmol/g Feuchtgewicht) hochphosphorylierter InsP offenbar *in vivo* in fest gebundener Form vorliegt. Eine Funktion solch einer posttranslationalen Modifikation ist bisher aber nicht bekannt.

### 1.3. Die Enzyme des Inositolphosphat-Metabolismus

#### 1.3.1. Inositolphosphatkinasen

Der Inositolphosphat-Metabolismus wird durch eine Reihe von Inositolphosphatkinasen (IPK) und Inositolphosphatphosphatasen (IPP) kontrolliert. Die IPK sind teilweise isoformspezifisch in verschiedenen Geweben exprimiert und auf subzellulärer Ebene unterschiedlich lokalisiert. Zur Familie der klassischen IPK, die Formen aus Tieren und Hefen umfassen, gehören drei Unterfamilien, die Inositol-1,4,5-trisphosphat-3-Kinasen (IP3K), die Inositolphosphat-Multikinase (IPMK) und die Inositolhexakisphosphat-Kinasen (IP6K). Die verschiedenen IPK haben einen hochkonservierten C-Terminus, in dem sich die Bindungsstellen für ATP und die InsP-Substrate befinden. Gemeinsam sind ihnen verschiedene Aminosäure-Motive, die in die Substratbindung und Katalyse eingebunden sind: das PDKG-Motiv (**P-C-[VI]-[ML]-D-X-K-[MI]-G**), ein SLL-Motiv, das G[FV]-Motiv (GFR-Motiv bei den IP3K), und das DF[GA]-Motiv [Bertsch *et al.*, 2000, Deschermeier, 2002, Saiardi *et al.*, 2001<sup>a</sup>]. Die IP3K, die IPMK und die IP6K werden daher zu einer Kinase-Familie, der PDKG-Familie zusammengefasst [Nalaskowski & Mayr, 2004]. Die Länge und Funktionalität des N-Terminus unterscheidet sich zwischen den Kinasen und es sind teilweise katalytische Motive enthalten und solche, welche die intrazelluläre Lokalisation bestimmen. Zusätzlich wurden zwei weitere IPK identifiziert, Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat-2-Kinase (IP5-2-K) und die Inositol-1,3,4-trisphosphat-5/6-Kinase/Inositol-3,4,5,6-tetrakisphosphat-1-Kinase (IP3-5/6-K/IP4-1-K), die nicht in die PDKG-Familie einzuordnen sind. Eine weitere Kinase-Aktivität, bei der PP-InsP<sub>5</sub> zu (PP)<sub>2</sub>-InsP<sub>4</sub> phosphoryliert wird, konnte in Lysaten aus Rattenhirn beobachtet werden [Huang *et al.*, 1998]. Die zugehörige Kinase konnte bisher aber weder kloniert noch identifiziert werden.



**Abb. 1.3-1: Schematische Darstellung funktioneller Bereiche humaner PDKG-Kinasen.** F-Aktin: Aktin-Bindungsdomäne; CaM: Calmodulin-Bindung; PDKG: Substratpositionierung und Phosphattransfer; G[FV]R und GF[RK]: InsP-Bindung; SSSL: katalytische Aktivität; DF[GA]: ATP-Bindung; NES: Nukleäres Export-Signal; NLS: Nukleäres Lokalisations-Signal; N: N-Terminus; C: C-Terminus. Die Darstellung erfolgte nach Protein-Sequenzen mit folgenden NCBI-Nummern: *Homo sapiens* IP3K: Isoform A NP\_002211.1, Isoform B NP\_002212.2, Isoform C NP\_079470.1; IP6K: Isoform 1 NP\_695005.1, Isoform 2 AF432853\_1, Isoform 3 NP\_473452.1, IPMK: AF432853\_1.

### 1.3.1.1. Die Subfamilie der Inositol-1,4,5-trisphosphat-3-Kinasen

Die Familie der IP3K ist die am längsten bekannte Gruppe der IPK und nur im Tierreich vorzufinden. IP3K katalysieren die Phosphorylierung von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  zu  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ , wodurch der  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende sekundäre Botenstoff entfernt und ein anderes putatives Signalmolekül gebildet wird (1.2.1.) [Cullen *et al.*, 1990, Cullen *et al.*, 1995]. Es wurden bisher drei Isoformen, A, B, und C, identifiziert, die homologe C-terminale Bereiche enthalten, sich aber in der Länge der N-Termini unterscheiden. Die Isoformen A und B sind schon länger bekannt [Choi *et al.*, 1990; Takazawa *et al.*, 1991; D'Santos *et al.*, 1994; Bertsch *et al.*, 1999; Dewaste *et al.*, 2002], wobei die humane (*Homo sapiens* (Hs)) und die Ratten (*Rattus norvegicus* (Rn)) Isoform A jüngst kristallisiert wurden [González *et al.*, 2004; Miller & Hurley, 2004]. Die humane Isoform A besteht aus 461 Aminosäuren (As) mit einem Molekulargewicht von etwa 51 kDa. Die humane Isoform B ist mit einem Molekulargewicht von rund 125 kDa und 946 As die größte IP3K. Die Vollängen cDNAs der Isoform C aus Mensch und Ratte wurden kürzlich kloniert [Dewaste *et al.*, 2000; Nalaskowski *et al.*, 2003]. Die As-Sequenz der humanen Iso-

form C besteht aus 683 As und weist ein Molekulargewicht von etwa 75 kDa auf. Die unterschiedlichen Molekulargewichte der IP3K sind durch die Länge der N-Termini bestimmt, in denen sich teilweise isoformspezifische funktionelle Bereiche befinden, die der Regulation und der intrazellulären Lokalisation dienen.

Bei den IP3K befindet sich N-terminal vom PDKG-Motiv eine Calmodulin- (CaM) Bindungsdomäne. Sie dient der Regulation der Kinasen durch den  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin- ( $\text{Ca}^{2+}$ /CaM) Komplex, der nach Bindung zu einer isospezifischen Aktivitätssteigerung der Kinaseaktivität führt. Die spezifische Aktivität der Isoform A wird durch Bindung des  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-Komplexes in etwa verdoppelt, während die der Isoform B um nahezu das 20fache gesteigert wird. Zusätzlich konnten für beide Isoformen je eine Phosphorylierungsstelle für posttranslationale Modifikation durch die CaMKII und für die B-Isoform noch eine zusätzliche PKC-Phosphorylierungsstelle identifiziert werden, wodurch eine Steigerung der spezifischen Aktivität der Enzyme erreicht wird [Communi *et al.*, 1997; Communi *et al.*, 1999]. Die spezifische Aktivität der humanen C-Isoform wird durch  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM nicht beeinflusst, aber durch  $\text{Ca}^{2+}$  allein gehemmt [Dewaste *et al.*, 2000]. Die spezifische Aktivität der Isoform C aus Ratte hingegen wird durch  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM substratabhängig um bis zu 8fach gesteigert, wobei zusätzlich eine allosterische Produktaktivierung durch  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  angenommen wird [Nalaskowski *et al.*, 2003]. Diese Regulation ist vermutlich eine „*feed-back*“-Aktivierung in Zellen, die nur langsam  $\text{Ca}^{2+}$  freisetzen, um ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal zu verstärken. Andererseits erfolgt in Gegenwart von CaM bei hohen  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Konzentrationen und in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  *in vitro* eine Inhibition des Enzyms, was ebenfalls auf eine Feinregulation der Kinaseaktivität in Abhängigkeit von der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration hindeutet [Nalaskowski *et al.*, 2003].

In den N-Termini der A- und B-Isoformen wurden zusätzliche Bereiche identifiziert, welche die proteolytische Spaltung der Enzyme fördern könnten [Choi *et al.*, 1990; Dewaste *et al.*, 2002]. Hierbei handelt es sich um PEST-Sequenzen (Proline (**P**), Glutaminsäure (**E**), Serin (**S**), Threonin (**T**)), die als proteolytische Signale für verschiedene Proteasen fungieren. Solche Sequenzen treten häufig bei Proteinen auf, die einem schnellen Abbau unterliegen [Rechensteiner & Rogers, 1996]. Untersuchungen einer putativen Schnittstelle im N-Terminus nahe der CaM-Bindungsdomäne der B-Isoform zeigten, dass dieser durch Calpain von der katalytischen Domäne getrennt werden kann, wobei die Bindung von CaM an das Enzym eine Proteolyse durch Calpain verhindert [Pattni *et al.*, 2003].

Funktionelle Bereiche, die der subzellulären Zielsteuerung der Enzyme dienen, liegen bei der A- und B-Isoform ebenfalls im N-terminalen Bereich. Die A-Isoform weist hier in ihrer As-Sequenz eine Aktin-Bindungsdomäne auf, über die sie in dendritischen Dornen von Nervenzellen an F-Aktin bindet [Schell *et al.*, 2001]. Die B-Isoform liegt vorwiegend zytosolisch vor oder ist an die Membranen des ER lokalisiert [Soriano *et al.*, 1997]. Neuere Untersuchungen mit dem exprimierten EGFP- (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) Fusionsprotein der hu-

manen oder Ratten IP3K-B in verschiedenen Zelllinien zeigten ebenfalls eine Lokalisation dieses Enzyms mit F-Aktin, wobei auch eine N-terminale Aktin-Bindungsdomäne identifiziert werden konnte [Dewaste *et al.*, 2003; Brehm *et al.*, 2004]. Für die subzelluläre Zielsteuerung der Isoform C gibt es unterschiedliche Berichte. Dewaste *et al.* [2003] konnten in COS-7 Zellen eine ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation des EGFP-Fusionsproteins der humanen Isoform C beobachten. Dagegen unterliegt die Ratten EGFP-IP3K-C in NRK52E-Zellen einem nukleo-zytoplasmatischen Transport [Nalaskowski *et al.*, 2003], wobei hier ein N-terminal gelegenes Kernexport-Motiv (NES) identifiziert wurde und anscheinend ein bisher nicht näher bestimmtes Kernimport-Signal ebenfalls N-terminal vorhanden ist.

Offenbar sind die verschiedenen IP3K-Isoformen auf verschiedene Funktionen auf zellulärer Ebene spezialisiert, wobei sich diese Spezialisierung auch im Expressionsmuster der einzelnen Isoformen in unterschiedlichen Gewebetypen widerspiegelt. So konnte mit *Northern-Blot*-Analysen auf mRNA-Ebene eine unterschiedliche Verteilung der einzelnen Isoformen auf verschiedene Gewebe in Ratte nachgewiesen werden. Dabei wird die Isoform A hauptsächlich in Hirn und Hoden exprimiert. Die B-Isoform ist dagegen ubiquitärer verteilt und konnte in Geweben der Lunge, der Thymusdrüse, der Hoden, des Gehirns sowie des Herzens nachgewiesen werden [Vanweyenberg *et al.*, 1995]. Ein 3,4 kb mRNA-Transkript der Ratten IP3K-C wurde überwiegend in Geweben von Herz, Gehirn und Hoden, aber auch in Geweben der Zunge gefunden. Gewebe der Lunge, Leber und Nieren zeigten niedrigere Expressionslevel [Nalaskowski *et al.*, 2003]. Ein 3,7 kb Transkript der menschlichen C-Isoform wurde dagegen hauptsächlich in Geweben aus der Bauchspeicheldrüse, dem Skelettmuskel, der Leber, Lunge und Plazenta sowie dem Herz detektiert. Schwache Expressionen des Transkripts waren dagegen in Geweben aus der Niere und dem Gehirn zu finden [Dewaste *et al.*, 2000]. Neben isoformspezifischen Expressionen der IP3K, findet offenbar auch eine artspezifische Expression statt, wie am Beispiel der Isoform C gezeigt ist.

### **1.3.1.2. Die Inositolphosphat-Multikinase**

Die IPMK ist wahrscheinlich der Urform der PDKG-Kinasen am nächsten [Nalaskowski & Mayr, 2004] und weist in ihrer cDNA-Sequenz sowohl Homologien zu den IP3K als auch zu den IP6K auf. Formen der Inositolphosphat-Multikinase sind in Protisten, Pflanzen, Pilzen und Tieren zu finden. Die IPMK katalysiert eine Reihe von Reaktionen im InsP-Metabolismus und ist ein zentrales Element in der Synthese der höher und hochphosphorylierten InsP. Das zu der humanen IPMK homologe Hefe-Protein ArgRIII ist schon seit längerem *in vitro* und *in vivo* gut untersucht [Saiardi *et al.*, 1999; Odom *et al.*, 2000; Shears, 2000; Zhang *et al.*, 2001]. Neben der IPK-Aktivität ist dieses Protein auch ein Transkriptionsregulator im Arginin-Metabolismus. Das Enzym phosphoryliert  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  sowohl an D-3'- als auch an D-6'-

Position und generiert so  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_4$ , welches das zentrale  $\text{InsP}_5$ -Isomer für die Synthese von  $\text{InsP}_6$  und Inositolpyrophosphaten ist. Die humane IPMK zeigt eine ArgRIII-entsprechende Kinase-Aktivität [Nalaskowski *et al.*, 2002, Chang *et al.*, 2002]. Zusätzlich kann das Enzym  $\text{Ins}(4,5)\text{P}_2$  zu  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  und  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  zu PP- $\text{InsP}_4$  phosphorylieren, wie für die Ratten IPMK gezeigt werden konnte [Saiardi *et al.*, 2001<sup>a</sup>]. Das humane Protein besteht aus 416 As mit einem Molekulargewicht von etwa 47 kDa. Untersuchungen mit einem EGFP-Fusionsprotein der IPMK in NRK52E-Zellen zeigten, dass das Protein überwiegend im Zellkern lokalisiert ist. Dabei konnte ein Kernlokalisierungssignal (NLS) auf As-Ebene identifiziert werden, das sich im C-Terminus des Enzyms befindet [Nalaskowski *et al.*, 2002]. Möglicherweise ersetzt die IPMK im Zellkern, die in manchen Zelltypen fehlende, nukleäre IP3K-C und hat hier grundlegende Bedeutung für die Synthese von allen hochphosphorylierten Inositolphosphaten, von denen z.B.  $\text{InsP}_6$  im Zellkern verschiedene Funktionen bei der DNA-Reparatur und der Chromatin-Remodulierung erfüllt (1.2.2.). Die Funktion eines IP3K-Substituenten hat die IPMK auch in Pflanzen, Pilzen und Protisten, die nicht über IP3K verfügen [Nalaskowski & Mayr, 2004].

### 1.3.1.3. Die Subfamilie der Inositolhexakisphosphat-Kinasen

Die Subfamilie der IP6K umfasst die drei bisher in Tieren identifizierte Isoformen 1, 2 und 3. Die Säuger Isoformen 1 und 2 waren die ersten IP6K, die kloniert und teilweise charakterisiert wurden [Saiardi *et al.*, 1999, Saiardi *et al.*, 2000]. Sie katalysieren die Phosphorylierung von  $\text{InsP}_6$  zu PP- $\text{InsP}_5$ , sowie die Phosphorylierung von  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  zu PP- $\text{InsP}_4$ . Später wurde eine dritte Isoform identifiziert, die ähnliche enzymatische Aktivität zeigt [Saiardi *et al.*, 2001<sup>b</sup>]. Die IP6K haben Molekulargewichte von 47 kDa (HsIP6K-3, 410 As), 49 kDa (HsIP6K-2, 426 As) und 50 kDa (*Mus musculus* (Mm) IP6K-1, 433 As). Die drei Isoformen zeigen eine Sequenzidentität von etwa 50 % zueinander, wobei die Hauptunterschiede in den Sequenzen überwiegend N-terminal zu finden sind [Saiardi *et al.*, 2001<sup>b</sup>]. Im Gegensatz zu den IP3K weisen die IP6K ein „zweites“ GFR-Motiv auf, das genauer gesagt ein GF[RK]-Motiv ist und vermutlich in die Bindung von hochphosphorylierten  $\text{InsP}$  eingebunden ist [Deschermeier, 2002]. Die drei Isoformen zeigen wie die IP3K eine isoformspezifische subzelluläre Lokalisation und auf mRNA-Ebene ein ähnliches Expressionsmuster. *Northern-Blot*-Analysen mit verschiedenen Mausgeweben zeigten, dass die MmIP6K-1 als 5 kb Transkript besonders in Hirn und Hoden und 2 kb Transkript ebenfalls in Hoden und schwach in Geweben aus Herz, Niere, Leber, Lunge und Milz vorliegt. Die HsIP6K-2 wird als 1,9 kb Transkript überwiegend in Gehirn- und Lungen-Geweben exprimiert, aber auch in Leber-, Nieren- und Hoden-Gewebe [Saiardi *et al.*, 1999]. Die humane Isoform 3 konnte als 6 kb und 2 kb Transkript in Gehirn-Gewebe und hier besonders im Cerebellum und Hippocampus detektiert werden. *in situ*-Hybridisierung von Mäuse-Gehirn zeigte, dass alle drei Isoformen im

Cerebellum mit Purkinje-Zellen und im Hippocampus mit Zellen des Gyrus dentatus lokalisiert sind [Luo *et al.*, 2001, Saiardi *et al.*, 2001<sup>b</sup>], was eine Koexpression aller drei Isoformen in den gleichen Zellen vermuten lässt. Lokalisationsstudien mit EGFP-Fusionsproteinen aller drei Isoformen in HEK293-Zellen zeigten jedoch eine unterschiedliche subzelluläre Verteilung der Isoformen. Dabei war die Isoform 1 ubiquitär im ganzen Zellkörper verteilt, während die Isoform 2 exklusive nukleäre Lokalisation und die Isoform 3 eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisation zeigte [Saiardi *et al.*, 2001<sup>b</sup>]. Spezifische Interaktionspartner auf Proteinebene konnten bisher nur für die IP6K-1 identifiziert werden [Luo *et al.*, 2001]. Sie interagiert mit einem Guanin-Nukleotid-Austausch-Protein (GEF), dem Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor für Rab3a (GRAB). Rab3a gehört zu den kleinen G-Proteinen der Rab-Familie, die in den Membranfluss vieler Zelltypen eingebunden sind. Rab-Proteine bewegen sich zwischen Zytoplasma und Plasmamembran, wobei dieser Wechsel wie bei allen kleinen GTPasen über den GTP/GDP-Zyklus kontrolliert wird [Cullen & Lockyer, 2002]. Zytoplasmatische Rab-Proteine liegen als inaktive GDP-gebundene Proteine vor, wobei der inaktive Zustand durch die Bindung von Guanin-Nukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (GDI) aufrechterhalten wird, welche die Dissoziation von GDP verhindern. Die Aktivierung der Rab-Proteine findet über GEF statt, die eine Dissoziation des GDP von Rab herbeiführen, so dass GTP an Rab binden kann und eine Translokation von Rab an die Plasmamembran erfolgt, wo es Prozesse der Endo- und Exozytose wie Vesikelanlagerung und -fusion vermittelt. Die Aktivierung der intrinsischen GTPase-Aktivität von Rab-Proteinen erfolgt über GAP, wodurch Rab wieder in einen inaktiven Zustand überführt wird und sich von der Membran löst. Rab3a ist ein spezifisches neuronales Protein, das mit synaptischen Vesikeln assoziiert ist und Calcium-abhängig die Ausschüttung von Neurotransmittern reguliert [Gundelfinger *et al.*, 2003]. Die IP6K-1 bindet kompetitiv zu Rab3a an GRAB und verhindert so eine Aktivierung von Rab3a. Für die IP6K-2 konnte in der gleichen Studie keine Interaktion mit GRAB gefunden werden. Diese Ergebnisse sind eine weitere Bestätigung für die Involvierung von InsP<sub>6</sub> bzw. PP-InsP<sub>5</sub> in den Membranfluss von Zellen und bestätigen auch, dass die verschiedenen IP6K-Isoformen wahrscheinlich unterschiedliche zelluläre Funktionen innehaben, die mit ihrer Lokalisation einhergehen.

### **1.3.1.4. Die Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat-2-Kinase**

Die Aktivität einer putativen IP5-2-K war aus Studien mit Hefen schon seit längerem bekannt [Ongusaha *et al.*, 1998; York *et al.*, 1999; Ives *et al.*, 2000]. Die humane Isoform der IP5-2-K wurde aber erst kürzlich kloniert und charakterisiert [Verbsky *et al.*, 2002]. Das Protein gehört nicht zur PDKG-Familie und katalysiert offenbar ausschließlich die Phosphorylierung von Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> zu InsP<sub>6</sub>. Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> ist das dominante InsP<sub>5</sub>, über dessen Phosphorylierung *in vivo* InsP<sub>6</sub> gebildet wird. Bisher sind keine weiteren IPK bekannt, die

Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> zu InsP<sub>6</sub> umsetzen können. Die IP5-2-K hat damit eine exklusive Funktion im InsP-Metabolismus.

Das Protein hat eine Sequenzlänge von 491 As und ein berechnetes Molekulargewicht von etwa 56 kDa. Auf mRNA-Ebene konnte mittels *Northern-Blot*-Analysen ein 3 kb Transkript gefunden werden, das besonders in Geweben aus Hoden, Plazenta, Gehirn und Herz exprimiert war [Verbsky *et al.*, 2002].

### **1.3.1.5. Die Inositol-1,3,4-trisphosphat-5/6-Kinase/Inositol-3,4,5,6-tetrakisphosphat-1-Kinase**

Die Enzym-Aktivitäten mit der Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> zu Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub> und Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub> phosphoryliert wird, sind schon seit längerem bekannt. Später wurde dann entdeckt, dass es sich um nur ein Enzym handelt. Die Klonierung und Charakterisierung der humanen Isoform zeigte schließlich, dass das Enzym auch D-1'-Kinase-Aktivität hat und Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub> zu Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> phosphorylieren kann [Shears, 2004]. Die humane IP3-5/6-K/IP4-1-K ist ein 46 kDa-Protein (414 As). *Northern-Blot*-Analysen mit verschiedenen menschlichen Geweben zeigten die Expression eines 5,3 kb und eines 3,6 kb mRNA-Transkripts in Gehirn-Geweben und eines 3,6 kb Transkripts in anderen Geweben, das am stärksten in Herz-Gewebe und weit weniger stark in Skelettmuskel-, Nieren, Bauchspeicheldrüsen, Leber, Plazenta und Lungen-Gewebe exprimiert ist [Wilson & Majerus, 1996]. Die IP3-5/6-K/IP4-1-K ist u.a. in Pflanzen und Tieren und einigen Protisten verbreitet, wie eine bisher unveröffentlichte Phylogeniestudie zeigt (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. Mayr).

### **1.3.2. Inositolphosphatphosphatasen**

Ähnlich wie bei den IPK gibt es in Tieren eine Gruppe von Inositolphosphatphosphatasen (IPP), deren Funktion *in vivo* noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Bisher sind eine Reihe von 5-Phosphatasen bekannt, welche wasserlösliche InsP<sub>3</sub> und InsP<sub>4</sub> an D-5'-Position dephosphorylieren und daher D-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>/D-Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>-5-Phosphatase (Typ I) genannt werden. IPP des Typ II hydrolysieren D-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, D-Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> sowie PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> und PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> an D-5'-Position und sind häufig an das innere Blatt der Plasmamembran gebunden. Typ III-Phosphatasen hydrolysieren InsP- und PtdInsP-Substrate auch an D-5'-Position. Diese Enzyme werden aufgrund einer N-terminalen SH2-Domäne (*Src homology 2*) als SHIP (*SH2-domain-containing inositol phosphatase*) und SHIP2 bezeichnet. Eine weitere, bisher nur schlecht charakterisierte Gruppe von 5-Phosphatasen wird als Typ IV zusammengefasst [Majerus *et al.*, 1999].

Weiterhin existiert eine Multiple Inositolpolyphosphat-Phosphatase (MIPP), die *in vitro* eine Reihe von Substraten dephosphorylieren kann und InsP-Substrate mit vier oder mehr Phosphatgruppen bevorzugt. Allerdings ist dieses Enzym innerhalb des ERs lokalisiert, wo bisher keine InsP nachgewiesen werden konnten. Ein MIPP *Knock-out* in Mäusen erzeugte keinen auffälligen Phänotyp aber eine Veränderung der zellulären  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ - und  $\text{InsP}_6$ -Konzentrationen, was eine Beteiligung des Enzyms an der Hydrolyse dieser Isomere vermuten lässt. Es wird angenommen, dass es noch weitere bisher nicht identifizierte MIP-Phosphatasen in Tieren gibt, die kompensatorisch hochreguliert werden können [Irvine & Schell, 2001].

Inositolpyrophosphate werden durch eine weitere Gruppe von drei bisher bekannten Phosphatasen dephosphoryliert, welche die  $\beta$ -Phosphatgruppe von Pyrophosphaten entfernen und daher Diphosphoinositolpolyphosphat-Phosphatasen (DIPP) genannt werden [Irvine & Schell, 2001].

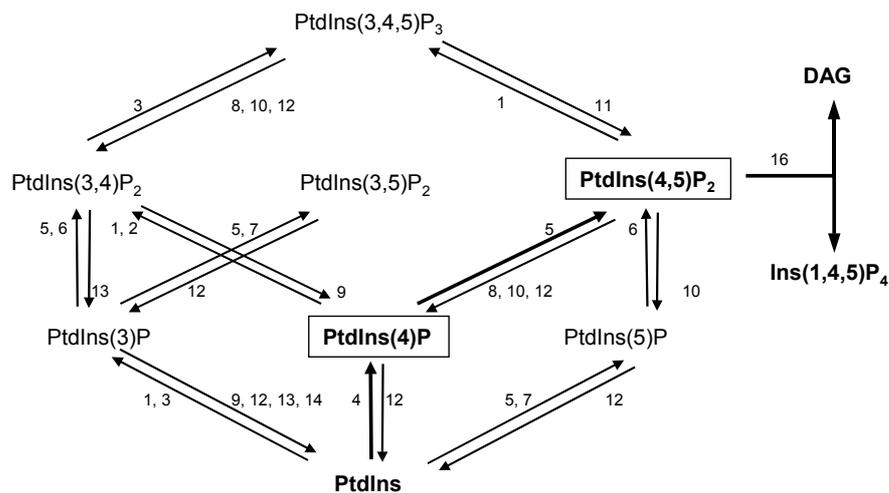
Außerdem existieren noch verschiedene Inositolmonophosphat-Phosphatasen und Inositolpolyphosphat-1- und -4-Phosphatasen. Zu erwähnen sei noch, dass die bisher aus dem Phosphatidylinositol-Metabolismus (1.4.) bekannte Phosphatase PTEN (Phosphatase und Tensin homolog) kürzlich als potente  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -3-Phosphatase *in vitro* und *in vivo* identifiziert wurde [Shears, 2004].

### 1.4. Der Inositolphosphat-Metabolismus

Ausgangspunkt für die Synthese von InsP sind die Phosphatidylinositolphosphate (PtdInsP), die mit spezifischen Kinasen und Phosphatasen einem eigenen Stoffwechselweg unterliegen (Abb. 1.4-1), der weitestgehend vom InsP-Metabolismus abgetrennt ist. PtdInsP tragen lipophile Fettsäurereste (Abb. 1.1-1.) und sind mit Ausnahme von PtdIns am inneren Blatt der Plasmamembran lokalisiert. Viele PtdInsP (z.B.  $\text{Ptd}(4,5)\text{P}_2$ ,  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ ) und einige PI-Kinasen (PI3K) und PI-Phosphatasen (PTEN) haben spezifische Regulator-Funktionen bei zellulären Prozessen. Im Zuge der PtdInsP-vermittelten Regulation kann es zu einer Translokierung von PtdInsP zwischen Plasmamembran und Zytosol kommen. Bestimmte PtdInsP der Plasmamembran binden spezifisch an Protein-Interaktionspartner (PKC, Akt/PKB, Proteine des Zytoskeletts), wobei durch die Wechselwirkung die enzymatische Aktivität des Interaktionspartners moduliert oder dieser an die Plasmamembran transloziert wird. Die Bindung erfolgt dabei häufig über PH- (Pleckstrin-homologe) Domänen, aber auch über SH2, C2, PTB (Phosphotyrosin-Bindungs) oder FYVE (Fab1p, YOTB, Vac1p, EEA1) -Domänen des Interaktionspartner. Häufig bindet auch die PI3K über ihre SH-Domänen an Protein-Interaktionspartner (z.B. bestimmte Rezeptor-Tyrosinkinase). Dabei werden verschiedene Signalkaskaden (z.B.  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ /Akt-Signalweg) initiiert, die Zellwachstum, Proliferati-

on, Apoptose, sekretorische und andere Prozesse steuern. Umgekehrt ist die PI3K auch ein Effektormolekül, das z.B. durch Ras-Proteine oder die G $\beta\gamma$ -Untereinheit von trimeren G-Protein-gekoppelten Rezeptoren aktiviert werden kann und so in verschiedene Signaltransduktionsprozesse eingebunden ist [Krauss, 2003: S. 248-253].

Durch die PLC-vermittelte Spaltung von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> zu Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> und DAG knüpft der tierische PtdInsP-Metabolismus an den InsP-Metabolismus an.

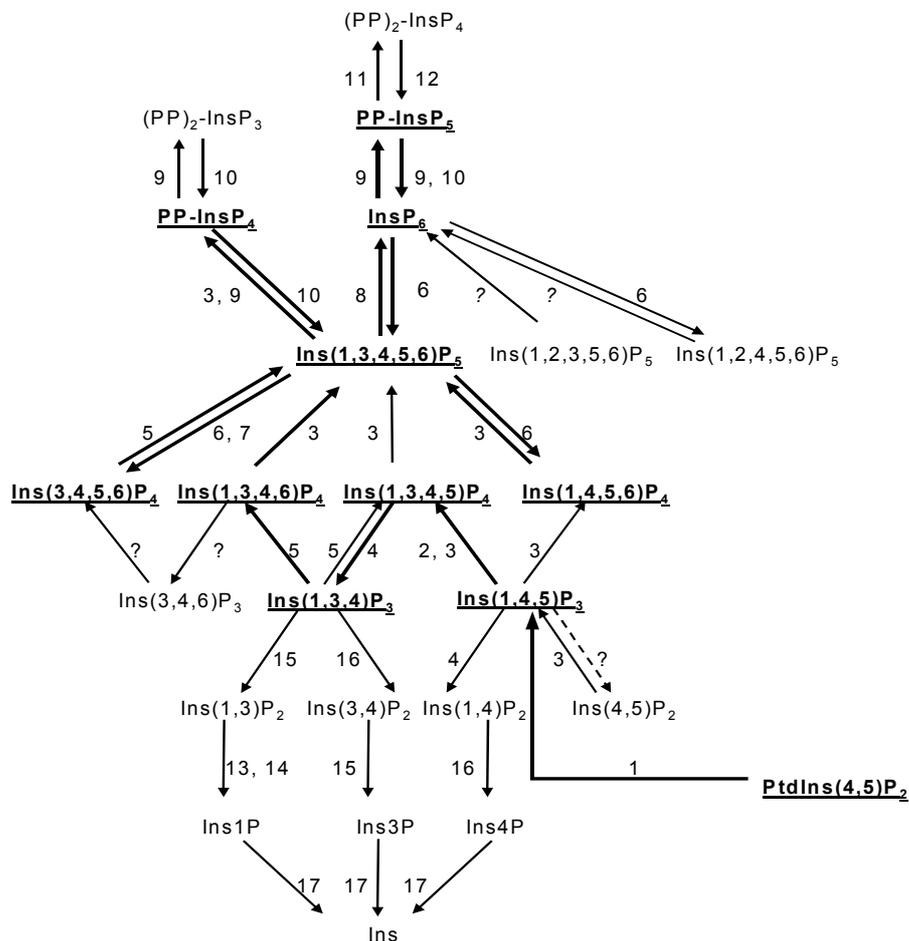


**Abb. 1.4-1: Stoffwechselwege des Phosphatidylinositolphosphat-Metabolismus.** Dickere Pfeile beschreiben den Hauptweg, durch den *in vivo* Ptd(4,5)P<sub>2</sub> synthetisiert wird. 1 PtdIns-3-Kinase Typ I; 2 PtdIns-3-Kinase Typ II; 3 PtdIns-3-Kinase Typ III; 4 PtdIns-4-Kinase; 5 PtdInsP-Kinase Typ I, 6 PtdInsP-Kinase Typ II; 7 PtdInsP-Kinase Typ III; 8 PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>/PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>-5-Phosphatase; 9 PtdInsPolyphosphat-3-Phosphatase; 10 SHIP; 11 PTEN; 12 Synaptojanin; 13 Ins(1,3)P<sub>2</sub>/PtdIns3P-3-Phosphatase Typ I; 14 Ins(1,3)P<sub>2</sub>/PtdIns3P-3-Phosphatase Typ II; 15 Ins(1,3,4)P<sub>2</sub>/Ins(3,4)P<sub>2</sub>/PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>-4-Phosphatase; 16 PLC. Verändert nach Abel *et al.*, 2001.

Inositolphosphate sind aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften relativ frei im Zytoplasma diffusibel. Das durch Spaltung von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> generierte Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> bildet in Tieren das Ausgangssubstrat für die Bildung einer Anzahl von InsP. Durch spezifische Kinasen, deren Funktionen und Regulation im vorangegangenen Kapitel erläutert wurden (1.3.), werden höherphosphorylierte InsP synthetisiert. Durch die enzymatische Aktivität verschiedener Phosphatasen, können InsP bis hin zum *myo*-Inositol dephosphoryliert werden.

Allerdings existieren wahrscheinlich noch weitere bisher unbekannte Metabolisierungswege. Im Rahmen einer in der Arbeitsgruppe durchgeführten Doktorarbeit von S. Haverland [2001] wurden InsP-Substratumsätze in Rattenleberextrakten analysiert und es konnten u.a. eine Ins(2,4,5)P<sub>3</sub>-3/6-Kinase-, eine Ins(2,4,5,6)P<sub>4</sub>-1/3-Kinase, eine Ins(1,2,4,6)P<sub>4</sub>-5-Kinase, sowie eine Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub>-6-Kinase-Aktivität und die Aktivitäten verschiedener Phosphatasen beobachtet werden.

Hefen, Schleimpilze und Pflanzen exprimieren andere IPK als Tiere, daher werden hochphosphorylierte InsP, wie InsP<sub>5</sub> und InsP<sub>6</sub> über einen alternativen Weg gebildet. Dieser führt über die Phosphorylierung von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> zu Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub>, das wiederum zu Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> und schließlich zu InsP<sub>6</sub> umgesetzt wird [Shears, 2004].



**Abb. 1.4-2: Der Inositolphosphat-Metabolismus in Tieren.** Hauptsynthesewege sind mit dickeren Pfeilen und die Hauptprodukte unterstrichen dargestellt. **1** PLC; **2** IP3K; **3** IPMK; **4** D-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>/D-Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>-5-Phosphatase Typ I; **5** IP3-5/6-K/IP4-1-K; **6** MIPP; **7** PTEN; **8** IP5-2-K; **9** IP6K; **10** DIPP; **11** Bis-Diphosphoinositolpolyphosphat-Synthase; **12** Diphosphoinositolpolyphosphat-Phosphohydrolase; **13** Ins(1,3)P<sub>2</sub>-3-Phosphatase Typ I; **14** Ins(1,3)P<sub>2</sub>-3-Phosphatase Typ II; **15** Ins(3,4)P<sub>2</sub>/Ins(1,3,4)P<sub>3</sub>-4-Phosphatase; **16** Inositol(1,4)P<sub>2</sub>/Ins(1,3,4)P<sub>3</sub>-1-Phosphatase; **17** Inositolmonophosphat-Phosphatase. Verändert nach Abel *et al.*, 2001 und Irvine & Schell, 2001.

### 1.5. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollte die IP6K-2 umfassend enzymatisch charakterisiert werden, um ihre zelluläre Funktion und Beteiligung bei Zellsteuerungsprozessen besser zu verstehen. Die Isoform 2 wurde aus den drei IP6K-Isoformen ausgewählt, weil sie nach Literaturangaben die höchste spezifische Aktivität zeigt und damit für enzymkinetische Studien am besten geeignet war. Die enzymatischen Messungen anderer Arbeitsgruppen wurden bisher mittels HPLC-Analysen (*High Pressure Liquid Chromatography*) durchgeführt, die kinetische Verläufe weniger genau abbilden. Im Zuge der enzymatischen Charakterisierung sollte daher basierend auf dem gekoppelten optischen Test, der von K. Hillemeier [2001] für die Hühner (*Gallus gallus* (Gg)) IP3K-A entwickelt wurde, ein an die IP6K-2 angepasstes Messverfahren etabliert werden, mit dem die enzymatische Aktivität der IP6K-2 genauestens erfasst werden kann. Dabei sollten zusätzlich Substrat-Produkt-Analysen mit HPLC durchgeführt werden, mit deren Hilfe die Substraterkennung des Enzyms beschrieben werden kann und weitere potentielle Substrate vorhergesagt werden könnten. Derartige Analysen sollen auch Aufschluss über mögliche bisher unbekannte Metabolisierungswege von InsP *in vivo* geben.

IP6K sind potentielle Ziele für die wirkstoffinduzierte, d.h. pharmakologische Unterbrechung des InsP-Metabolismus zu den pyrophosphorylierten InsP. Im Rahmen eines in der Arbeitsgruppe durchgeführten Projektes, in dem die Inhibitor-Wirkung verschiedener polyphenolischer Substanzen auf die IPK untersucht werden, sollte die Wirkung wirksamer IP3K-Hemmstoffe auf die IP6K-2 bestimmt werden. Ziel ist es potente IPK-Inhibitoren zu identifizieren, mit deren Hilfe *in vivo* möglichst selektiv die enzymatische Aktivität verschiedener Kinasen inhibiert werden kann. Solche Experimente können dazu beitragen, den InsP-Metabolismus *in vivo* detaillierter aufzuklären.

Sowohl das Hauptsubstrat der IP6K-2, InsP<sub>6</sub>, als auch ihr Produkt, PP-InsP<sub>5</sub>, wurden in verschiedenen Studien mit vielfältigen Funktionen in zellulären Prozessen in Verbindung gebracht (1.2.2., 1.2.3., 1.2.4., 1.2.5.), wobei die genauen Funktionen und Protein-Interaktionen von PP-InsP<sub>5</sub> bisher nicht genau beschrieben sind. Die Rolle der Inositolpyrophosphate bei der Regulation von zellulären Prozessen könnte in der Modifikation von Proteinen liegen, wobei sowohl eine Phosphorylierung der Proteine über die energiereichen Pyrophosphatgruppen als auch in einer posttranslationalen Modifikation durch Bindung des gesamten InsP<sub>6</sub>-Moleküls an zelluläre Makromoleküle unter Abspaltung einer Phosphatgruppe denkbar wären. Hinweise, dass die letztgenannte Modifikation *in vivo* vorliegt, wurden von S. Haverland [2001] im Rahmen seiner Dissertation (1.2.5.) und von K. Lindner [2000] in seiner Diplomarbeit erhalten und sollten mit dieser Arbeit überprüft werden. Dabei sollte ein *in vitro*-Reaktionssystem entwickelt werden, mit dem eine solche kovalente Modifikation von zellulären Makromolekülen durchgeführt werden kann, um diese zu identifizieren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte

Analysenwaage BP 221S	Sartorius
Autoklav 5075 ELV	System
Brutschrank für Bakterienkultur	Memmert
Duran-Glasgeräte	Schott, Brand
Feinwaage PM 480 <i>Delta range</i>	Mettler
Flüssig-Scintillations-Zähler Wallac 1409	Wallac
Gelkammer, für horizontale Elektrophorese	MWG-Biotech
Gelkammer SE 250, für vertikale Elektrophorese	Hofer
Geltrockner <i>Easy Breeze</i>	Hofer
Handmonitor LB122	Berthold
Heiztisch	Biotec Fischer
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf
Inkubator mit CO <sub>2</sub> -Begasung für Zellkultur	Heraeus
Laborschüttler	Gerhardt
Leitfähigkeitsmessgerät LF 530	WTW
Magnetrührer MR 3001K	Heidolph
Mischer Vortex Genie 2	Scientific Industries
Mikrotiterplattenlesegerät BioKinetics EL 340	Bio-Tek Instruments
PCR-Maschinen: <i>Mastercycler Gradient / personal</i>	Eppendorf
Netzanschlussgerät <i>Gene Power Supply</i> GPS 200/400	Pharmacia
Netzanschlussgerät <i>Power Supply</i> E835	Consort
Netzanschlussgerät <i>Power Supply</i> 2197	LKB Bromma
pH-Meter pH526	WTW
pH-Elektroden SenTix mic und Sentix 41	WTW
Phosphoimager FLA-3000	FujiFilm
Photometer BioPhotometer	Eppendorf
Pipette, Model Reference, 1 - 10 µl	Eppendorf
Pipette, Model Reference, 10 - 100 µl	Eppendorf
Pipette, Model Reference, 100 - 1000 µl	Eppendorf
Pipettierhilfe accu-jet	Brand
<i>Semi-dry-Blot</i> -Kammer	Phase
Schüttelinkubator Serie 25	New Brunswick, Scientific Co. Ins.
Spektralphotometer UV/VIS Lambda 20	Perkin Elmer
Sterile Werkbank <i>Microflow Biological Safety Cabinet</i>	MDH
Sterile Werkbank Herasafe	Heraeus
Tischzentrifuge Biofuge pico und Biofuge fresco	Heraeus
Ultraschallbad Sonorex RK100H	Bandelin electronic
Ultraschall-Homogenisator Sonopuls GM 70 mit Sonode UM 70	Bandelin electronic
Ultra-Turrax T25 basic	IKA
Ultrazentrifuge L7-80 mit Rotor 80-Ti	Beckman
UV-Tisch (312nm)	Bachhofer
Vakuumzentrifuge	Bachhofer
Videodokumentationssystem, Kamera VarioCam	Phase
Videoprinter UP-890 CE	Sony
Monitor	Panasonic
Waage BP 2100S	Sartorius
Wasserbad	Memmert
Zentrifuge Sorvall RC 5C plus mit GSA- und SS-34-Rotor	Sorvall

### 2.1.2. Software

Aida 2.31  
Kroma 3000  
GraphPad Prism 4  
Kappa ImageBase  
Image Master 1d Version 1.1  
MaxChelator  
MS Word, Excel  
Picture Publisher 8  
SigmaPlot 8.0  
UV Winlab  
Protein Explorer 2.41 beta

Raytest  
Bio-Tek  
GraphPad Software, Inc.  
Kappa  
PDI, Inc.  
Chris Patton, Uni Stanford  
Microsoft  
Micrografx  
SPSS Inc.  
Perkin Elmer  
Eric Martz

### 2.1.3. Verbrauchsmaterialien

4-Kammerdeckgläser (1,8 cm<sup>2</sup> pro Kammer)  
Chromatographiepapier  
Dialyseschläuche Spectra/Por® Nr. 1  
ECL™ Hyperfilm  
Film X-OMAT AR  
Gewebekulturflaschen aus Polystyrol (steril), 25 cm<sup>2</sup> und 75 cm<sup>2</sup>  
Gewebekulturflaschen aus Polystyrol (steril), 175 cm<sup>2</sup>  
Gewebekulturplatten aus Polystyrol, 24-Loch, Füllvolumen je Vertiefung: 3,3 ml, Kulturfläche je Vertiefung: 1,9 cm<sup>2</sup>  
Glasfläschchen 12x32 mm, große Öffnung, braun mit Schraubverschluss  
HPLC-Filter Spartan 3/0,2 PA, 0,2 µm Porengröße  
HPLC-Glasfläschchen Supelco Crimp, 2 ml Volumen  
Injektionskanüle 0,55/25 mm  
Küvetten, Halb-Mikro, Quarzglas-Suprasil, Typ 104-QS  
Küvetten, Halb-Mikro, Polystyrol,  
Küvetten Uvette 220, Volumen 50–2000 µl  
Membrandeckel Eppendorf Lid ® Bac  
Mikrotiterplatten Nunc-Immuno Module Maxisorb V16  
Nitrozellulose Transfer Membrane 0,45 µm  
Pipetten (steril), Volumen 5, 10 und 25 ml  
Pipettenspitzen,  
Reaktionsgefäße aus Polypropylen, Volumen 0,2 ml  
Reaktionsgefäße aus Polypropylen, Volumen 0,5 ml  
Reaktionsgefäße aus Polypropylen, Volumen 1,5 ml  
Reaktionsgefäße aus Polypropylen, Volumen 2,0 ml  
Petrischalen mit Nocken aus Polystyrol (steril), 20x100 mm, 58 cm<sup>2</sup> Kulturfläche  
pH-Papier, Universalindikator und Neutralit-Stäbchen pH 5-10  
Phosphoimagerscreen BAS-IP-MS 2325  
Probenröhrchen mit Schraubverschluß aus Polypropylen, Spitzboden (steril) Füllvolumen 50 ml (BlueMax)  
Probenröhrchen mit Schraubverschluß aus Polypropylen, Spitzboden (steril) Füllvolumen 15 ml (BlueMax)  
Probenröhrchen aus Polypropylen (steril), Füllvolumen 14 ml  
Spritze (steril) 20 und 60 ml  
Spritze Omnifix 40 Solo, 1 ml Volumen  
Sterilfilter Millex 0,22 µm  
Zellophanblätter, vorgeschnitten

Nalgen Nunc International)  
Whatman  
Spectrum Med. Industries  
Amersham  
Kodak  
Greiner  
Nunc  
  
Greiner  
  
Alltech  
Schleicher & Schuell  
Sigma-Aldrich  
Braun  
Hellma  
Greiner  
Eppendorf  
Eppendorf  
Nunc  
Protran  
Beckton Dickinson  
Sarstaed, Eppendorf  
Eppendorf  
Eppendorf  
Eppendorf, Greiner  
Eppendorf  
  
Greiner  
Merck  
Fujifilm  
  
Greiner  
  
Greiner  
Greiner  
Braun  
Braun  
Millipore  
Pharmacia



### 2.1.5. Plasmide

pTrcHis B (Invitrogen): bakterielles Expressionsplasmid für Fusionsproteine mit N-terminalem Poly-Histidin-Anhang. Die HsIP6K-2 wurde zwischen die *Xho I*- und *BstB I*- Schnittstellen der *Multiple Cloning Site* (MCS) kloniert.

pGEX-4T-2 (Amersham Biosciences): bakterielles Expressionsplasmid für Fusionsproteine mit N-terminalem Glutathion-S-Transferase-Anhang (GST-Anhang). Die HsIP6K-2 wurde zwischen die *Sal I*- und *Not I*- Schnittstellen der MCS kloniert.

pSK-A [Deschermeier, 2002]: bakterielles Expressionsplasmid für Fusionsproteine mit N-terminalem Streptavidin-Anhang. Die HsIP6K-2 wurde zwischen die *Nar I*- und *Xho I*- Schnittstellen der MCS kloniert.

pGEM-Teasy (Promega): Plasmid, das für eine effiziente bakterielle Klonierungen optimiert ist und das zur Zwischenklonierung der HsIP6K-2 verwendet wurde.

pEGFP-N1 (Clontech): Plasmid für die eukaryotische Expression von Fusionsproteinen mit C-terminalem Anhang einer verbesserten (*Enhanced*) Variante des *Green Fluorescent Protein* (EGFP). EGFP hat ein Exzitationsmaximum bei 488 nm und emittiert bei 507 nm. Die HsIP6K-2 wurde zwischen die *Hind III*- und *Sma I*- Schnittstellen der MCS kloniert.

### 2.1.6. Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG bezogen. Basen, die nicht auf der Vorlage-Sequenz binden, sind kleingeschrieben. Der Unterstrich bedeutet eine Basen-Deletion.

#### Oligonukleotide zur Klonierung in pSK-A

HsIP6K-2.5'CDS 5'-ggc gcc ATG AGC CCA GCC TTC AGG GC-3'  
KL4 5'-tctcgagTCACTCCCCACTCTCCTCAC-3'

#### Oligonukleotide zur Klonierung in pEGFP-N1

hsip6k2.5'-hind 5'-aag ctt ATG AGC CCA GCC TTC AGG GC-3'  
hsip6k2.3'-sma 5'-ccc ggg TCA CTC CCC ACT CTC CTC AC-3'

#### Oligonukleotide für QuikChange™ Mutagenese

HsIP6K-2.QC.5' 5'-CAA ACC CAT CGG aGC CAG CTC TGT AGA TG-3'  
HsIP6K-2.QC.3' 5'-CAT CTA CAG AGC tGG CTC CGA TGG GTT TG-3'  
hsip6k2.qc.5' 5'-GTC ACA GAG ATA AGT GAG GAG AGT GGG GAG TGA gcg gcc gc-3'  
hsip6k2.qc.3' 5'-gcg gcc gcT CAC TCC CCA CTC TCC TCA CTT ATC TCT GTG AC-3'  
GFP.Sma.QC.5' 5'-GGA GAG TGG GGA GT\_C CCG GGA TCC ACC GG-3'  
GFP.Sma.QC.3' 5'-CCG GTG G\_AT CCC GGG ACT CCC CAC TCT CC-3'

#### Oligonukleotide zur Sequenzierung

NP 24 5'-GACGTTGTAAAAACGACGGCCAGTG-3'  
RP 24 5'-AACAGCTATGACCATGATTACGCC-3'

T7 - Promotor 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'  
T7 Terminator 5'- GCT AGT TAT TGC TCA GCG G - 3'  
pGEX.FW 5'-GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG-3'  
pGEX.RV 5'-CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG-3'  
pTrcHis.FW 5'-GAG GTA TAT ATT AAT GTA TCG-3'  
pTrcHis.RV 5'-GAT TTA ATC TGT ATC AGG-3'  
pEGFP-N1.5' 5'-GCA AAT GGG CGG TAG GCG TGT ACG-3'  
MN007 5'-CGT CGC CGT CCA GCT CGA CCA-3'  
KL3 5'-tcccgggACAGAAAAGACCCCTAAGGAC-3'

### 2.1.7. Bakterienstämme

#### Stämme für die Klonierung und Vermehrung von Plasmiden:

*Escherichia coli* XL1 Blue (Stratagene)  
*E. coli* Top 10F' (Invitrogen)  
*E. coli* SCS110 (Stratagene)

#### Stämme für die Proteinexpression:

*E. coli* BL21 Codon Plus(DE3)-RIL (Stratagene)  
*E. coli* BL21 CodonPlus(DE3)-RP (Stratagene)  
*E. coli* BL21 (DE3) pLysS, pREP4  
*E. coli* BL21 (DE3) GroELS RIL  
*E. coli* B834 (DE3) pLys (Novagen)

### 2.1.8. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von Alexis Biochemicals, Aldrich, Amersham, Apotheke des UKE, Biomol, Biorad, Fluka, Gibco, Merck, Pierce, Serva, Sigma, Roche und Roth bezogen.

### 2.1.9. Bakterienkultur: Medien und Lösungen

LB Medium: 4 g Bacto-Trypton, 2 g Hefeextrakt, 4 g NaCl, ad 400 ml H<sub>2</sub>O  
pH 7,2 (mit NaOH eingestellt)

Agarplatten: 4 g Bacto-Trypton, 2 g Hefeextrakt, 6 g Bacto-Agar,  
0,5 ml 4 M NaCl, ad 400 ml H<sub>2</sub>O

Soc Medium: 20 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl,  
10 ml 250 mM KCl, ad 1 l H<sub>2</sub>O, pH 7,0 (mit NaOH eingestellt)  
nach dem Autoklavieren: plus 20 ml 1 M sterile Glukose

Antibiotika: Entsprechend des Bakterienstammes und des gewählten Plasmids wurden unter sterilen Bedingungen folgende Konzentration den Medien zugesetzt: Ampicillin: 100 µg/ml; Chloramphenicol: 34 µg/ml; Kanamycin: 50 µg/ml; Tetracyclin: 12,5 µg/ml

### 2.1.10. Enzyme

#### DNA-Polymerasen und Ligasen

*Taq*-Polymerase, rekombinant (Invitrogen)  
*Pfu*-Polymerase (Stratagene)  
Turbo-*Pfu*-Polymerase (Stratagene)  
T4-DNA-Ligase (Invitrogen)

#### Restriktionsenzyme

*Xba I*, *Nar I* (*Ehe I*), *Sal I*, *Not I*, *Xho I*, *Dpn I*, *EcoR I*, *Hind III*, *Pst I*, *BsmB I*, *Sma I*

Alle aufgeführten Restriktionsenzyme und die entsprechenden Puffer wurden von MBI Fermentas, New England Biolabs oder Boehringer Mannheim bezogen.

#### Andere Enzyme

Pyruvatkinase (PK) aus Kaninchen (Roche)  
Lactatdehydrogenase (LDH) aus Froschmuskel (Roche)

### 2.1.11. Längen- und Molekulargewichtstandards

#### DNA-Längenstandards

100bp-Leiter, *Gene Ruler 100bp ladder* (Fermentas)  
1kb-Leiter, *Gene Ruler 1kb ladder* (Fermentas)  
Lambda-DNA/*EcoR I* *Hind III* (Promega)

#### Protein-Molekulargewichtsstandards

*Low Molecular Weight* (LMW) Leiter (BioRad)  
*High Molecular Weight* (HMW) Leiter (BioRad)  
BenchMark Protein Leiter (vorgefärbt) (Invitrogen)

### 2.1.12. Puffer und Lösungen

#### Puffer für DNA-Polymerasen und -Ligasen

*Pfu*-Puffer (Stratagene): 20 mM Tris/HCl pH 8,8, 10 mM KCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  
2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 % Triton X-100 (w/v), 100 µg/ml BSA (w/v)

*Taq*-Puffer (Invitrogen): 10 mM Tris/HCl pH 8,4, 50 mM KCl.  
Vor Verwendung wurden 1-2,5 mM MgCl<sub>2</sub> frisch zugesetzt.

Ligationspuffer (Invitrogen): 50 mM Tris/HCl pH 7,8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM ATP,  
25 µg/ml BSA (w/v)

#### Puffer für die Agarosegelelektrophorese

6fach DNA-Probenpuffer: 0,25 % Bromphenolblau (w/v), 0,25 % Xylencyanol FF (w/v),  
15 % Ficoll 400 (w/v), in wässriger Lösung

TAE-Puffer: 40 mM Tris/Acetat, 2 mM EDTA, pH 8,3

## Material und Methoden

RF1:	100 mM RbCl, 50 mM MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O, 30 mM K-Acetat, 10 mM CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O, 15 % Glycerol (w/v), pH 5,8 , eingestellt mit Essigsäure
RF2:	10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O, 15 % Glycerol (w/v), pH 6,8 , eingestellt mit Essigsäure

### Lösungen für die SDS-PAGE

Acrylamidlösung Rotiphorese Gel 30 (Roth):	30 % Acrylamid, 0,8 % N,N-Methylbisacrylamid
Laemmli-Laufpuffer:	0,025 M Tris/HCl, 0,192 M Glyzin, 0,1 % SDS (w/v)
Trenngelpuffer (4fach):	1,5 M Tris/HCl, 0,4 % SDS (w/v), pH 8,8
Sammelgelpuffer (4fach):	0,5 M Tris/HCl, 0,4 % SDS (w/v), pH 6,8
SDS-Probenpuffer (4fach):	0,25 M Tris/HCl, 200 mM DTT, 35 % Glycerol (w/v), 4 % SDS (w/v), 0,04 % Bromphenolblau (w/v), pH 7,6
Färbelösung:	0,5 % Coomassieblau (w/v), 9 % Eisessig, 45,2 % Methanol in H <sub>2</sub> O
Entfärbelösung:	8 % Eisessig, 25 % Ethanol, 67 % H <sub>2</sub> O
weitere Reagenzien:	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung (APS, Serva) 10 % (v/v) N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin-Lösung (TE-MED, Serva)

### Lösungen für Western-Blotting und Immunprinting

Kathodenpuffer:	25 mM Tris/HCl, 40 mM 6-Aminocaprinsäure, 20 % Methanol, pH 7,6
Anodenpuffer I:	30 mM Tris/HCl, 20 % Methanol, pH 10,4
Anodenpuffer II:	300 mM Tris/HCl, 20 % Methanol, pH 10,4
Ponceau-Lösung (Serva):	0,2 % Ponceau-S, 3 % Essigsäure in H <sub>2</sub> O
TBS:	50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5
TTBS:	50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,06 % Tween 20 (v/v), pH 7,5
Blockierlösung:	3 % BSA (w/v) in TBS
Inkubationslösung (IK-Lsg.):	0,3 % BSA (w/v) in TTBS
Alkalische Phosphatase-Puffer:	100 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM NaCl, pH 9,5
BCIP-Lösung:	5 % 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat in 100 % DMF
NBT-Lösung:	7,7 % Nitroblautetrazoliumchlorid in 100 % DMF
ECL™ Western Blot Detektions Reagenzien (Amersham Biosciences)	

### Puffer für Affinitätschromatographie über Streptactin-Matrix

Waschpuffer:	20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 7,5
Elutionspuffer::	Waschpuffer mit 2,5 mM Desthiobiotin

### Puffer für Affinitätschromatographie über Ni-NTA

Lysepuffer (nativ):	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0,5 mM Benzamidin, 0,3 % Triton X-100 (v/v), pH 8,0
Waschpuffer (nativ):	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0
Elutionspuffer (nativ):	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0
Harnstoff-Lysepuffer:	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM Tris/HCl, 8 M Urea, pH 8,0
Harnstoff-Waschpuffer:	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM Tris/HCl, 8 M Urea, pH 6,3
Harnstoff-Elutionspuffer:	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM Tris/HCl, 8 M Urea, 100 mM Imidazol, pH 5,9
Dialysepuffer:	100 mM NaHCO <sub>3</sub> , 500 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,5

### Puffer für Affinitätschromatographie über Glutathion-Sepharose B

PBS ( <i>Phosphate-Buffered Saline</i> ):	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,3 (mit HCl eingestellt)
GST-Elutionspuffer:	50 mM Tris/HCl, 10 mM reduziertes Glutathion, pH 8,0

### Puffer für Ionenaustauschchromatographie

P11-Equilibrationpuffer:	25 mM Tris/HCl, 0,1 % Triton X-100 (v/v), pH 7,5
P11-Waschpuffer:	25 mM HEPES, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, 0,1 % Triton X-100 (v/v); pH 7,5
P11-Elutionspuffer:	P11-Waschpuffer + 750 mM NaCl
DEAE-Waschpuffer:	25 mM HEPES, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 7,5
DEAE-Elutionspuffer:	DEAE-Waschpuffer + 750 mM KCl

### Puffer für MDD-HPLC

Puffer A:	0,2 mM HCl, 15 µM YCl <sub>3</sub>
Puffer B:	0,5 M HCl, 15 µM YCl <sub>3</sub>
Puffer C:	1,6 M Triethanolamin (TEA), 300 µM PAR, pH 9,0
Aufnahmepuffer für HPLC-Proben:	2 mM NaF, 2 mM Natrium-Acetat

### sonstige Puffer:

Aufnahmepuffer:	50 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,5 mM Benzamidin, 1 mM DTT, 0,5 % Triton X-100 (v/v), pH 7,5
Homogenisierungspuffer (HP):	25 mM HEPES, 100 mM KCl, 2,5 mM EDTA, pH 7,5
Solubilisierungspuffer	50 mM Tris/HCl, 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1 % SDS, pH 7,5

### 2.1.13. Antikörper

#### Primäre Antikörper

Kaninchen anti-Ratte-IP6K-2 IgG (Dianova), eingesetzte Konzentration 1:5000 in IK-Lsg.

Ziege anti-GST IgG (Amersham Biosciences), eingesetzte Konzentration 1:2000 in IK-Lsg.

Kaninchen anti-EGFP IgG (Molecular Probes), eingesetzte Konzentration 1:500 in IK-Lsg.

#### Sekundäre Antikörper und Antikörperkonjugate

Streptavidin Alkalische Phosphatase-Konjugat (BioRad), eingesetzte Konzentration 1:3000 in IK-Lsg.

anti-Kaninchen IgG Alkalische Phosphatase-Konjugat (Jackson/Hilz), eingesetzte Konzentration 1:3333 in IK-Lsg.

Maus anti-Ziege/Schaf IgG Alkalische Phosphatase-Konjugat (Sigma), eingesetzte Konzentration 1:5000 in IK-Lsg.

Ziege anti-Kaninchen IgG Meerrettich-Peroxidase-Konjugat (Southern Biotechnology Associate, Inc.), eingesetzte Konzentration 1:10000 in IK-Lsg.

### 2.1.14. Matrices

Streptactin-Matrix (IBA)

Ni-NTA (Qiagen)

Glutathion-Sepharose B (Amersham Biosciences)

P11-Phosphozellulose (Whatman)

DEAE Sephacel (Amersham Biosciences)

Q-Sepharose FF (Amersham Biosciences)

### 2.1.15. Inositolphosphate

D-PP-InsP <sub>5</sub>	04/99 / J.R. Falck, Dallas
D-InsP <sub>6</sub>	Calbiochem
D-Ins(1,2,3,4,5)P <sub>5</sub>	03/98 / M. Rudolf, AG C. Schultz, Bremen
D-Ins(1,2,3,4,6)P <sub>5</sub>	09/95 / M. Rudolf, AG C. Schultz, Bremen
D-Ins(1,2,3,5,6)P <sub>5</sub>	02/96 / M. Rudolf, AG C. Schultz, Bremen
D-Ins(1,2,4,5,6)P <sub>5</sub> /D-Ins(2,3,4,5,6)P <sub>5</sub>	04/96 / M. Rudolf, AG C. Schultz, Bremen
D-Ins(1,3,4,5,6)P <sub>5</sub>	09/95 / M. Rudolf, AG C. Schultz, Bremen
D-Ins(2,3,4,5,6)P <sub>5</sub>	12/02 / Fraktion 298-314 / N.Bischoff
D-Ins(2,3,4,5,6)P <sub>5</sub> /D-Ins(1,2,4,5,6)P <sub>5</sub>	04/96 / M. Rudolf, AG C. Schultz, Bremen
D-Ins(1,2,4,5)P <sub>4</sub>	Alexis
D-Ins(1,2,5,6)P <sub>4</sub>	Alexis
D-Ins(1,2,5,6)P <sub>4</sub>	15.05.88/ Fraktion 153-155/Prof. Dr. Mayr
D-Ins(1,3,4,6)P <sub>4</sub>	Calbiochem
D-Ins(1,4,5,6)P <sub>4</sub>	Calbiochem
D-Ins(2,3,4,5)P <sub>4</sub>	06.04.87 / Prof. Dr. Mayr
D-Ins(2,4,5,6)P <sub>4</sub>	07.04.88/ Fraktion 151-156/Prof. Dr. Mayr
D-Ins(1,4,5)P <sub>3</sub>	07/86 III / Prof. Dr. Mayr
D-Ins(2,4,5)P <sub>3</sub>	03/91 / Prof. Dr. Mayr

## 2.2. Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1. Präparative und analytische Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation von Doppelstrang-DNA, bei der als Vorlage Plasmid-DNA diente, wurde eine sogenannten *proofreading* Polymerase, die *Pfu*-Polymerase, mit dem zugehörigen Puffer eingesetzt. Diese arbeitet mit hoher Genauigkeit und besitzt neben einer 5'→3'-Polymerase-Aktivität auch eine 5' → 3'- und 3' → 5'-Exonuklease-Aktivität. Für die analytische PCR, beispielsweise das Durchsuchen (*Screenen*) von Bakterienklonen auf eine gewünschte Insertion, wurde die *Taq*-Polymerase mit dem entsprechende Polymerase-Puffer verwendet. Die *Taq*-Polymerase besitzt lediglich eine 5'→3'-Exonuklease-Aktivität.

PCR-Reaktionsansatz:        1-100 ng Plasmid-DNA  
                                       1fach *Pfu*-Puffer, bzw. 1fach *Taq*-Puffer plus MgCl<sub>2</sub>  
                                       0,06-0,14 U *Pfu*-Polymerase, bzw. 0,05-0,25 U *Taq*-Polymerase  
                                       0,2 mM dNTPs  
                                       0,2 µM 5'-Primer  
                                       0,2 µM 3'-Primer

Das Ansatzvolumen betrug 20-50 µl in einem 0,2ml-PCR-Reaktionsgefäß.

PCR-Programme	Amplifikat		IP6K-2/pGex-4T-2	IP6K-2/pGex-4T-2
	5'-Primer		HsIP6K-2.5'CDS	hsip6k2.5'-hind
	3'-Primer		KL4	hsip6k2.3'-sma
1.	Initiale Denaturierung	2 min	95 °C	95 °C
2.	Denaturierung	1 min	94 °C	94 °C
3.	Annealing	1 min	55,8 °C	54 °C
4.	Elongation	2 min	72 °C	72 °C
5.	Finale Elongation	5 min	72 °C	72 °C
	Zyklen (2.-4.)		30	30

### 2.2.2. QuikChange-Mutagenese

QuikChange ist eine PCR-Technik, die eine gerichtete Mutagenese in doppelsträngiger Plasmid-DNA erlaubt. Hierbei können Punktmutationen in der Sequenz, sowie das Einfügen oder Eliminieren einzelner oder multipler Basen vorgenommen werden. Das grundlegende Prinzip dieser PCR-Methode ist die Verwendung einer Vorlage aus Plasmid-DNA, welche die zu mutierende Insertion trägt, zusammen mit zwei, die Mutation tragenden und zueinander komplementären Primern. Diese Primer werden in den PCR-Zyklen durch die Turbo-*Pfu*-DNA-Polymerase verlängert, so dass ein mutiertes Plasmid entsteht. Anschließend wird nichtmutiertes Vorlage-Plasmid mittels *Dpn I*-Endonukleaseverdau eliminiert. Hierbei wird sich eine Eigenschaft der meisten kommerziellen *E. coli*-Stämme zu Nutze gemacht, die das Gen für

die dam-Methylase tragen und daher methylierte Plasmide erzeugen. *Dpn I* schneidet spezifisch hemimethylierte und methylierte DNA (Erkennungssequenz: 5'-Gm<sup>6</sup>ATC-3'), so dass das eingesetzte dam-methylierte Vorlage-Plasmid selektiv entfernt wird. Das zurückbleibende mutierte Plasmid wird dann in *E. coli* XL1 Blue transformiert und so vermehrt.

Reaktionsansatz (in 0,2ml-PCR-Reaktionsgefäß):

- 10-40 ng Vorlage-Plasmid
- 0,2 µM 5'-Mutageneseprimer
- 0,2 µM 3'-Mutageneseprimer
- 1fach *Pfu*-Puffer
- 2,8 U *Pfu*-Polymerase (2,8 U/µl)
- 0,2 mM dNTPs
- ad. 50 µl ddH<sub>2</sub>O

### PCR-Programm für die QuikChange-Mutagenese:

1. Initiale Denaturierung	30 s	95 °C
2. Denaturierung	30 s	94 °C
3. Annealing (s)	1 min	55 °C
4. Elongation (min)	2 min / kb Plasmidlänge	68 °C
Zyklen (2.-4.)		16

### **2.2.3. Analytische und präparative Trennung von DNA in Agarosegelen**

Die Trennung von Doppelstrang-DNA-Fragmenten von unterschiedlicher Länge erfolgte durch Gelelektrophorese in Agarosegelen. Die Gele wurden abhängig von den zu trennenden DNA-Längen mit 0,75-1,5 % Agarose (SeaKem LE Agarose, Cambrex) in TAE-Puffer gekocht. Nach Abkühlen der noch flüssigen Agarose auf ca. 50 °C wurden 0,2 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt und das Gel zum Erhärten in ein Gelbett mit Kamm gegossen. Nachdem Aushärten wurde das Gel in einer horizontalen Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer überschichtet und der Kamm entfernt. Die DNA-Proben wurden vor dem Gel-Auftrag mit DNA-Probenpuffer versetzt. Die Trennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 80 V für 0,5 -1h. Das Agarosegel wurde dann unter UV-Licht fotografiert und die Größe der DNA-Banden durch Molekulargewichtsstandards bestimmt. Bei präparativen Gelen wurden die gewünschten Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in 1,5ml-Reaktionsgefäßen bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert oder sofort weiterbearbeitet.

### **2.2.4. DNA-Elution aus Agarosegelen**

Die Elution von DNA aus den präparierten Agarosestücken erfolgte mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers. Die Elution der Fragmente erfolgte mit 20 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,5.

### 2.2.5. A-Tailing von PCR-Produkten

Für die Zwischenklonierung von PCR-Produkten in den pGEM-TEasy-Vektor muss eine überhängende Desoxyadenosinbase an jedem Ende vorhanden sein, da der linearisierte Vektor überhängende Desoxythyminebasen an den Enden besitzt. Wurde ein DNA-Fragment zuvor mit einer Polymerase amplifiziert, die neben einer 5' → 3'-Exonuklease-Aktivität auch eine 3' → 5'-Exonuklease-Aktivität aufweist (z.B. *Pfu*), mussten die überhängenden Desoxyadenosinbase nachträglich eingeführt werden. Verschiedene thermostabile Polymerasen z.B. die *Taq*-Polymerase fügen unabhängig von der DNA-Vorlage ein einzelnes Desoxyadenosin an die 3'-Enden der Amplikons an.

Reaktionsansatz ( in 0,5ml-Reaktionsgefäß):

5-13 µl gereinigtes PCR-Produkt
2,5 mM MgCl <sub>2</sub>
200 µM dATP
1fach <i>Taq</i> -Polymerase-Puffer
5-10 U <i>Taq</i> -Polymerase
ad. 20 µl ddH <sub>2</sub> O

Die Inkubation erfolgte 30 min bei 72 °C im Biometra-PCR Block.

### 2.2.6. Ligation von DNA

Für Ligationen wurde die T4-DNA-Ligase mit Ligationspuffer oder der pGEM-TEasy Kit (Promega) verwendet. Die T4-Ligase katalysiert unter Verbrauch von ATP die Bindung einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-Hydroxygruppe zu einem Phosphodiester. Dabei wurden 50–100 ng Vektor-DNA und ein dreifacher molarer Überschuss der Insertions-DNA in einem 0,2ml-PCR-Reaktionsgefäß mit 1 U T4-Ligase und T4-Ligasepuffer inkubiert (Gesamtvolumen 10 µl). Die einzusetzende Menge Insertions-DNA wurde dabei nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Vektor (ng)} \times \text{Insertion (bp)}}{\text{Vektor (bp)}} \times 3 = \text{Insertion (ng)}$$

Die Inkubationsdauer und -temperatur richtete sich nach der Art der Ligation. Die Ansätze wurden entweder für 3 h bei RT (*sticky-end*-Ligationen) oder bei 16 °C über Nacht (*blunt-end*- und *semiblunt-end*-Ligationen) inkubiert bzw. bei der Verwendung des pGEM-TEasy Kits bei 4°C über Nacht.

### 2.2.7. Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurden max. 50 µl Probe in eine Mikroküvette pipettiert und die Absorption bei 260 nm bestimmt. Außerdem wurde die Absorption (OD) bei 230 nm (Detektion von Salz-Kontaminationen), bei 280 nm (Detektion

von Protein-Kontaminationen) und bei 320 nm (Detektion von Ethanol-Kontaminationen) gemessen und so die Reinheit der jeweiligen DNA-Präparation bestimmt. Dabei wurden Proben als rein betrachtet, die bei einer 1:50 –Verdünnung folgende Ratio der Absorptionswerte zeigten:  $OD_{260} / OD_{280} \geq 1,8$  ;  $OD_{230} / OD_{260} \leq 1,3$  ;  $OD_{320} \leq 0,005$

### 2.2.8. Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Analytische und präparative Restriktionsverdaue wurden unter den vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen und Temperaturen durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug zwischen 30 min und 2 h. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl angesetzt. Dabei wurden für analytische Verdaue DNA-Mengen von 200–1000 ng und für präparative Verdaue 500–2000 ng DNA eingesetzt. Pro µg DNA wurden 2–10 U Restriktionsendonuklease verwendet. Doppelverdaue von DNA mit zwei Restriktionsendonukleasen wurden in kompatiblen Puffern durchgeführt.

### 2.2.9. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA erfolgte mit einer PCR-gestützten Didesoxy-Methode [modifiziert nach Sanger *et al.*, 1977]. Dabei wird dem PCR-Ansatz ein Anteil unterschiedlich fluorophormarkierter Didesoxynukleotide (ddNTPs) jeder Base zugegeben. Aufgrund der fehlenden Hydroxyfunktion dieser Basen, ist eine DNA-Verlängerung durch DNA-Polymerase nicht möglich und es kommt zum Kettenabbruch. Da die ddNTPs zufällig eingebaut werden, bricht die DNA-Synthese an verschiedenen Stellen ab. Nach der PCR wird der Ansatz mittels Gelelektrophorese getrennt und die Sequenz kann über die verschiedenen Fluoreszenzen im Gel abgelesen werden. Es wurde das *Big Dye Terminator Sequencing Kit* (Applied Biosystems) und der *Taq*-Polymerase-Puffer *Half-Term* (GENPAK) verwendet. Als Primer wurden vektorspezifische (z.B. NP24, RP24) bzw. genspezifischen Oligonukleotide (z.B. KL3) benutzt.

Reaktionsansatz (in 0,2ml-PCR-Reaktionsgefäße):	250-500 ng Plasmid-DNA
	15 pmol Sequenzier-Primer
	3 µl Big Dye
	5 µl Half Term
	ad. 20 µl ddH <sub>2</sub> O

#### PCR-Programm für die DNA-Sequenzierung:

1. Denaturierung	10 sec	96 °C
2. Annealing	5 sec	50 °C
3. Elongation	4 min	60 °C
Zyklen (1.-3.)		25

Die Reaktionsansätze wurden in 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt und die DNA mit 40 µl Ethanol abs. für 10 min bei RT gefällt. Die DNA wurde in der Tischzentrifuge für 25 min bei 14 000 UpM und RT pelletiert, die Pellets anschließend mit 40 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (Tischzentrifuge, 10 min, 14 000 UpM, RT). Die Überstände wurden abgenommen und die Pellets ca. 10 min luftgetrocknet. Die Gelelektrophorese der DNA und die Sequenzbestimmung wurden im Service-Labor des Instituts für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie, UKE durchgeführt.

### **2.3. Mikrobiologische Methoden**

#### **2.3.1. Sterilisierung von Lösungen und Geräten**

Alle verwendeten Lösungen, Medien und Verbrauchsmaterialien wurden bei 121 °C und 1,2 bar 35 min autoklaviert oder steril vom Hersteller bezogen. Hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert. Die Desinfektion von Arbeitsflächen und Geräten erfolgte durch Besprühen mit 70-80%igem Ethanol. Drygalskispatel und Impfösen wurden nach Eintauchen in 80%igem Ethanol durch Abflammen desinfiziert.

#### **2.3.2. Kultur und Aufbewahrung von Bakterien**

3 ml Flüssigkulturen wurden mit einem einzelnen Klon von einer Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (250 UpM) inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden entweder größere Volumina LB-Medium im Verhältnis 1:100 angeimpft oder je nach Bakterienstamm, Plasmid und Verwendungszweck 20-500 µl Kultur auf einer Agarplatte ausgestrichen.

Kulturen auf Agarplatten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, zur Lagerung mit Parafilm verschlossen und konnten so bei 4 °C bis etwa 4 Wochen aufbewahrt werden.

#### **2.3.3. Herstellung chemisch kompetenter Zellen**

Für die Anzucht wurde ein Aliquot des gewählten Bakterienstammes auf Agarplatten ausgestrichen, die ein oder mehrere entsprechende Selektionsantibiotika enthielten. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank bebrütet. Mit je einer Bakterienkolonie wurden 3ml-LB-Vorkulturen (mit Antibiotika) angeimpft, die über Nacht unter Schütteln (250 UpM) bei 37 °C inkubiert wurden. Die Bakterien wurden am nächsten Tag in der Tischzentrifuge (2000 UpM / 5 min / RT) sedimentiert und mit einer entsprechenden Menge frischen LB-Mediums versetzt. Frisches, vorgewärmtes und mit Selektionsantibiotika versetztes LB-Medium (50–

100 ml) wurde im Verhältnis 1:100 mit den Vorkulturen angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C solange kultiviert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6 erreicht war. Danach wurde die Kultur 15 min auf Eis abgekühlt und in 50ml-BlueMax-Röhrchen umgefüllt. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (Heraeus Cryofuge 8500i, 2000 UpM, 15 min / 4 °C), der Überstand abgegossen, das Pellet in 1/3 des Ausgangsvolumens Puffer RF1 aufgenommen und darin 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurde erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1/12,5 des Ausgangsvolumens Puffer RF2 resuspendiert. Die Bakterien wurden in 1,5ml-Reaktionsgefäßen à 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert.

### 2.3.4. Transformation von Bakterien

Ein 100 µl Aliquot chemisch kompetente Bakterien wurde auf Eis aufgetaut. Üblicherweise wurde ein gesamter Ligationsansatz (10 µl), 10-50 µl einer QuikChange-Reaktion oder 100–200 ng Plasmid-DNA zu den Bakterien pipettiert und diese 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 1 min bei 42 °C. Dem Transformationsansatz wurden 1 ml LB-Medium zugegeben und das Reaktionsgefäß mit einem Membrandeckel verschlossen. Der Ansatz wurde unter Schütteln 45-60 min bei 37 °C inkubiert und unter sterilen Bedingungen auf Agarplatten ausgestrichen. Die Agarplatten wurden über Nacht im Bakterienbrutschrank bei 37 °C inkubiert.

Für die Transformation von chemisch superkompetenten Zellen (*E. coli* TOP 10F'), wurde ein aufgetautes 50 µl Bakterienaliquot wie oben beschrieben mit DNA versetzt. Es wurde 30 min auf Eis inkubiert und anschließend ein Hitzeschock von 30 s bei 42 °C durchgeführt. Der Transformationsansatz wurde mit 200 µl Soc-Medium versetzt und unter Schütteln 45–60 min bei 37 °C inkubiert. Aliquots von 50–200 µl wurden unter sterilen Bedingungen auf Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

### 2.3.5. Plasmidpräparation

Für die Plasmid-DNA-Minipräparation wurde der *Silica Spin Kit* für Plasmid-DNA-Minipräparation (Biometra) verwendet. Plasmidpräparationen wurden aus 3ml-Vorkulturen nach Anweisung des Herstellers gewonnen.

Für eine Plasmidpräparation in größerem Maßstab (Midipräparation) wurden je nach Plasmid 500 ml LB-Kultur (*very low copy* Plasmide) bzw. 100 ml LB-Kultur (*low copy* Plasmide) und der *Nukleobond PC100 Kit* (Machery & Nagel) verwendet.

Sollten endotoxinfreie Plasmid-DNA Präparationen für die Transfektion von eukaryotischen Zellen hergestellt werden, so wurde der *Endofree Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) und 400 ml LB-Vorkultur benutzt.

### 2.4. Biochemische Methoden

#### 2.4.1. Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteingemischen wurde durch diskontinuierlicher SDS-PAGE [Laemmli, 1970; Ornstein, 1964] durchgeführt. Es wurden Gele verwendet, die aus Sammel- und Trenngel bestanden. Der pH-Gradient zwischen den Gelen dient der Fokussierung und Aufkonzentrierung der Proteine bevor sie im Trenngel der Größe nach getrennt werden.

Sammelgel: 5 % Acrylamid, 1fach Sammelgelpuffer, 0,05 % (w/v) APS, 0,1 % (w/v) TEMED

Trenngel: 8–15 % Acrylamid, 1fach Trenngelpuffer, 0,05 % (w/v) APS, 0,1 % (w/v) TEMED

Für die SDS-PAGE wurden vertikale Gelkammern verwendet. Es wurden, je nach Probenvolumen, Gele von 0,7-1,5 mm Dicke gegossen. Vor dem Auftrag auf das Gel wurden die Proben mit 4fach SDS-Probenpuffer versetzt, und die darin enthaltenen Proteine durch Erhitzen für 2 min bei 95 °C denaturiert. Die Proben wurden mit einer Hamilton-Spritze in die Gel-taschen eingefüllt. Die Elektrophorese wurde in Laemmli-Laufpuffer bis zum Eintritt der Proben ins Trenngel bei 100 V und danach bei 125 V durchgeführt. Die fertigen Gele wurden mit Färbelösung für 10-20 min unter leichtem Schwenken gefärbt und anschließend überschüssige Farbe mit Entfärbelösung über Nacht entfernt.

Zur Aufbewahrung wurden die Gele in Zellophan eingeschweißt oder auf einem passenden Stück Chromatographiepapier vakuumgetrocknet.

#### 2.4.2. *Western-Blotting (semi-dry) und Immunprinting*

Proteine lassen sich durch *Western-Blotting* und *Immunprinting* spezifisch nachweisen. Dafür werden die Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Mit einem spezifischen primärer Antikörper wird das gewünschte Protein auf der Membran markiert und danach durch einen mit einem Enzym (Alkalische Phosphatase, Meerrettichperoxidase) konjugierten sekundären Antikörper über eine Farb- oder Fluoreszenzreaktion detektiert.

Der Proteintransfer auf die Nitrozellulosemembran wurde mit *semi-dry Western-Blotting* durchgeführt. Dazu wurde in einer *Semi-dry-Blot*-Kammer von Kathode nach Anode ein luftblasenfreier Stapel aus drei Lagen Kathodenpuffer-getränktem Chromatographiepapier und SDS-Gel, drei Lagen Anodenpuffer I-getränktem Chromatographiepapier und Nitrozellulo-

semembran, sowie drei Lagen Anodenpuffer II-getränktem Chromatographiepapier aufgebaut. Der Proteintransfer wurde bei einer konstanten Stromstärke von  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  Gelfläche für 1 h bei RT durchgeführt.

Mit einer Ponceau-Färbung der Nitrozellulosemembran wurde der Erfolg des Proteintransfers überprüft. Dazu wurde die Membran 5 min in der Ponceau-Lösung leicht geschwenkt und überschüssige Farbe durch Spülen mit ddH<sub>2</sub>O entfernt. Der Molekulargewichtsmarker wurde mit Bleistift nachgezeichnet. Dann wurde die Membran für 30 min in Blockierlösung geschwenkt. Die Lösung wurde abgegossen, 10 ml einer Lösung des primären Antikörpers zugegeben und die Membran darin über Nacht bei 4 °C leicht geschwenkt. Danach wurde die Membran dreimal 5 min mit Inkubationslösung gewaschen und schließlich 10 ml einer Lösung des sekundären Antikörpers zugegeben. Es wurde für 1 h bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert und danach dreimal 2 min mit TTBS gewaschen. Wurde das Streptavidin Alkalische Phosphatase-Konjugat als primärer Antikörper verwendet, entfiel der zweite Antikörper und es wurde sofort mit TTBS gewaschen.

Um die Farbreaktion der Alkalischen Phosphatase zu entwickeln, wurde die Membran schließlich für 2-10 min in 5 ml Alkalische-Phosphatase-Puffer mit 0,04 % NBT und 0,02% BCIP eingelegt. Die Färbung wurde durch Spülen mit ddH<sub>2</sub>O gestoppt.

Sollte eine Visualisierung der Proteine durch Chemolumineszenz erfolgen, wurde der ECL<sup>TM</sup>-Kit (Amersham Biosciences) mit einem ECL<sup>TM</sup>-Film benutzt. Dazu wurden Lösung 1 und 2 zu gleichen Teilen gemischt und mit der Membran für 1 min inkubiert. Ein ECL<sup>TM</sup>-Film wurde auf der so vorbereiteten und dann abgetrockneten Membran für 15-30 s exponiert und danach entwickelt.

### **2.4.3. Bakterielle Expression rekombinanter HsIP6K-2**

Es wurden 3ml-LB-Vorkulturen mit Bakterien angesetzt, die zuvor mit einem Expressionsplasmid mit HsIP6K-2-Insertion transformiert worden waren. Für die Expression rekombinanter HsIP6K-2 wurden verschiedene Fusionsproteine in allen dafür geeigneten Bakterienstämmen getestet. Die Vorkulturen waren mit den für den jeweiligen Stamm und das Plasmid selektierenden Antibiotika versetzt und wurden unter Schütteln (250 UpM) und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden je 100-400 ml mit 0,2 % Glukose und mit Antibiotika versetztes LB-Medium mit Übernachtskultur im Verhältnis 1:200 angeimpft. Die Kulturen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. Die Expression wurde durch Zugabe von 0,5 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid) induziert und die Kulturen 2–18 h bei 37 °C oder 21 °C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Bakterien kurz auf Eis abgekühlt, in 250ml-Zentrifugengefäße überführt und sedimentiert

(GSA-Rotor, 5500 UpM, 10 min bei 4 °C). Die Pellets wurden in je 24 ml Aufnahmebuffer resuspendiert und bei -20 °C eingefroren.

Es stellte sich heraus, dass die Expression von HsIP6K-2/pGex-4T-2 in *E. coli* B834 (DE3) pLys bei 21 °C und 18 h die besten Ergebnisse, d.h. die höchsten Ausbeuten löslichen rekombinanten Proteins, erzielte.

### **2.4.4. Lyse des Expressionsansatzes**

Die resuspendierten Bakterien wurden bei 37° C im Wasserbad aufgetaut, 10 min auf Eis inkubiert und in 50ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Dann wurde die Bakteriensuspension mit maximaler Stärke in 4 Zyklen à 20 s sonifiziert. Zwischendurch wurde jeweils 30 s auf Eis inkubiert. Die Membrantrümmer wurden sedimentiert (SS-34-Rotor, 20 000 UpM, 30 min und 4 °C). Aliquots des Expressionsansatzes, des Pellets und des Überstandes aus der Lyse wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

### **2.4.5. Affinitätschromatographie rekombinanter Fusionsproteine**

Anfangs wurden verschiedene Fusionsproteine der HsIP6K-2 für die Expression und Reinigung getestet, um möglichst optimale Ergebnisse zu erzielen.

#### **2.4.5.1. Chromatographie der Streptavidin-IP6K-2 über Streptactin-Sepharose**

Das Bakterienlysat (2.4.4.) wurde mit einer Lösung aus 1 mM EDTA und 3 mM DTT 1:1 verdünnt. Zur Rechromatographie von P11-Eluaten (2.4.6.1.) wurden diese mit 20 mM HEPES und 1 mM EDTA auf ≤ 150 mM NaCl verdünnt. Die verdünnte Proteinlösung wurde über eine 5ml-Säule (Pharmacia) mit 500 µl Streptactin-Matrix gegeben, die zuvor mit 4 ml Waschpuffer equilibriert wurde. Nach dem Probenauftrag wurde die Matrix mit 3 ml Waschpuffer gewaschen. Der Durchlauf des Probenauftrags und die Waschfraktion wurden gesammelt. Dann wurde mit 6 ml Elutionspuffer eluiert. Die Eluate wurde in Fraktionen à 500 µl gesammelt. Alle Fraktionen wurden später durch SDS-PAGE analysiert. Alle Arbeiten wurden im Kühlraum bei 4 °C durchgeführt.

#### **2.4.5.2. Chromatographie der Polyhistidin-IP6K-2 über Nickel-NTA (native Bedingungen)**

Die 100 ml Expressionskultur wurden in 250ml-Zentrifugengefäße überführt und sedimentiert (GSA-Rotor, 5500 UpM, 10 min bei 4 °C). Das Pellet wurde in 7 ml TBS aufgenommen und

bei -20 °C eingefroren. Die Bakterien wurden dann bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, in ein 50ml-Zentrifugenröhrchen überführt und erneut sedimentiert (SS-34 Rotor, 6500 UpM, 10 min bei 4 °C). Das Pellet wurde in 4 ml Lysepuffer aufgenommen, 10 min auf Eis inkubiert und dreimal 10 s bei maximaler Stärke sonifiziert. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (SS-34-Rotor, 10 000 UpM, 10 min bei 4 °C) und der Überstand in ein 15ml-BlueMax-Röhrchen überführt. Es wurde 1 ml mit Lysepuffer equilibrierte Ni-NTA zugegeben und 1 h bei 4 °C über Kopf geschwenkt. Die Matrix wurde in eine 5ml-Säule (Pharmacia) umgefüllt und darin zweimal mit 4 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 6mal 500 µl Elutionspuffer. Alle Arbeiten wurden bei 4 °C durchgeführt. Alle Fraktionen wurden gesammelt und später durch SDS-PAGE analysiert.

### **2.4.5.3. Chromatographie der Polyhistidin-IP6K-2 über Nickel-NTA (denaturierende Bedingungen)**

Die Expressionskultur wurde wie unter 2.4.5.2. beschrieben behandelt und nach dem Auftauen und Zentrifugieren in 4 ml Harnstoff-Lysepuffer aufgenommen und dreimal 10 s bei voller Stärke sonifiziert. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (SS-34-Rotor, 10 000 UpM, 10 min und 4 °C) und der Überstand in ein 15ml-Greiner-Röhrchen überführt. Es wurde 1 ml mit Lysepuffer equilibrierte Ni-NTA zugegeben und das Röhrchen 30 min und bei 4 °C über Kopf geschwenkt. Die Matrix wurde sedimentiert (GSA-Rotor, 3000 UpM, 15 min und 4 °C) und zweimal mit je 4 ml Harnstoff-Waschpuffer in der Zentrifuge gewaschen. Der Durchlauf aus Probenauftrag und Waschschrift wurde aufbewahrt und später durch SDS-PAGE analysiert. Es wurde zweimal mit 2 ml Harnstoff-Elutionspuffer unter über Kopf schwenken für je 15 min bei 4 °C eluiert. Die Eluate wurden in mit Dialysepuffer equilibrierte Dialyseschläuche gefüllt und gegen 500 ml Dialysepuffer bei 4 °C dialysiert. Nach 1 h wurde der Dialysepuffer gegen frischen Puffer gewechselt und es wurde für 18 h bei 4 °C weiterdialysiert.

### **2.4.5.4. Chromatographie der GST-IP6K-2 über Glutathion-Sepharose B**

Glutathion-Sepharose B wurde mit Aufnahmepuffer equilibriert. Es wurden 48 ml Bakterienlysat (2.4.4.) und 750 µl equilibrierte Matrix in ein 50ml-BlueMax-Röhrchen gegeben und für 30 min bei RT über Kopf geschwenkt. Die Matrix wurde sedimentiert (Heraeus Cryofuge 8500i, 600 UpM, 5 min und 4 °C) und dreimal mit je 15 ml PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Matrix in eine 5ml-Säule (Pharmacia) gefüllt und mit 4mal 1 ml GST-Elutionspuffer für je 10 min eluiert. Alle Fraktionen wurden gesammelt und später durch SDS-PAGE analysiert.

### 2.4.6. Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie wurde verwendet, um IP6K-Fusionsproteine vor dem Auftrag auf die Affinitätsmatrix vorzureinigen oder die Fusionsproteine nach der Affinitätschromatographie zu konzentrieren und umzupuffern.

#### 2.4.6.1. Ionenaustauschchromatographie über Phosphozellulose

P11-Phosphozellulose ist eine Kationenaustauschermatrix (funktionelle Gruppe:  $-\text{PO}_4\text{H}_2$ ). Vor der Chromatographie musste die Matrix vorbereitet werden. Dazu wurden 5 g Phosphozellulose in einem 250ml-Messzylinder mit 125 ml NaOH für 4 min suspendiert und mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  auf 250 ml aufgefüllt. Die Matrix wurde für 15 min sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Matrix nochmals mit 600 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Dann wurde die Matrix in 125 ml 0,5 M HCl für 4 min suspendiert und es wurde wie oben beschrieben erneut zweimal mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Danach folgten drei Waschschrte mit je 100 ml 1 M Tris/HCl, pH 7,5 und vier Waschschrte mit Equilibrierungspuffer. Es wurden 15 ml der vorbereiteten Matrix in eine 25ml-Säule (Pharmacia) gefüllt und solange mit Equilibrierungspuffer gespült, bis die Leitfähigkeit des Durchlaufs bei etwa 1,7 mS/cm war.

Die Chromatographie des Bakterienlysats (2.4.4.) wurde im Kühlraum bei 4 °C durchgeführt. Vor dem Auftrag wurde das Lysat mit einer Lösung aus 1 mM EDTA und 3 mM DTT im Verhältnis 1:1 verdünnt und dann mit einer Flussgeschwindigkeit von max. 1 ml/min auf die Säule gegeben. Es wurde mit 50 ml P11-Waschpuffer gewaschen und mit 10mal 3 ml P11-Elutionspuffer eluiert. Alle Fraktionen wurden gesammelt und später durch SDS-PAGE analysiert.

#### 2.4.6.2. Ionenaustauschchromatographie über DEAE-Sephacel

DEAE (diethylaminoethyl) Sephacel ist ein schwacher Anionenaustauscher. Die Matrix wurde mit 4 Volumen DEAE-Waschpuffer equilibriert. Das Matrixvolumen betrug abhängig von der aufzutragenden Proteinmenge 0,5 ml/mg Protein. Die vereinigten Eluate aus der Affinitätschromatographie (2.4.5.) wurden unverdünnt aufgetragen. Es wurde mit 10fachem Matrixvolumen DEAE-Waschpuffer gewaschen und 10mal mit 1 ml DEAE-Elutionspuffer eluiert. Alle Arbeiten wurden bei 4 °C durchgeführt. Aliquots jeder Fraktion wurden durch SDS-PAGE analysiert.

### 2.4.7. Lagerung gereinigter rekombinanter IP6K-2

Die Eluate aus der Affinitäts- bzw. Ionenaustauschchromatographie (2.4.5. und 2.4.6.) wurden mit 30 % Glycerin (v/v) versetzt und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren

### 2.4.8. Proteinbestimmung nach Bradford

Das Protein Assay Reagenz (BioRad) musste vor der Verwendung mit 3 Volumen ddH<sub>2</sub>O verdünnt werden. Es wurde eine Eichreihe mit 0  $\mu\text{g}$ , 0,5  $\mu\text{g}$ , 1  $\mu\text{g}$ , 1,5  $\mu\text{g}$ , 2  $\mu\text{g}$ , 2,5  $\mu\text{g}$ , 3  $\mu\text{g}$ , 4  $\mu\text{g}$ , 5  $\mu\text{g}$  Albumin-Standard (Pierce) in ddH<sub>2</sub>O und die wasserverdünnten Proben in einem Volumen von je 50  $\mu\text{l}$  in einer Mikrotiterplatten vorgelegt. Enthielten die Proben Triton X-100, wurde die entsprechende Menge Detergenz der Eichreihe zugefügt. Dann wurden je 200  $\mu\text{l}$  verdünntes Bradford-Reagenz in jede Vertiefung pipettiert und die Farbreaktion für 10 min entwickelt. Die Absorption der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 578 nm mit einem Mikrotiterplattenlesegerät bestimmt. Die Messdaten wurden mit MS Excel ausgewertet.

### 2.4.9. Densiometrische Proteinbestimmung

Aliquots der zu messenden Proben wurden zusammen mit einer Eichreihe von 0,1-1  $\mu\text{g}$  Albumin-Standard (Pierce) auf ein 12%iges SDS-Gel (2.4.1.) aufgetragen. Die gefärbten und entfärbten Gele wurden auf einen Leuchttisch gelegt und die Intensität der Banden mit dem Programm Image Master 1d Version 1.1 ausgewertet und so die Proteinkonzentration bestimmt.

### 2.4.10. Enzymatische Charakterisierung der HsIP6K-2

Für die enzymatische Charakterisierung der IP6K-2 wurde ein Reaktionsansatz optimiert, der sich an den von A. Saiardi *et al.* [1999] und K. Hillemeier [2001], erstellten Bedingungen für IP-Kinasen orientiert. Dieser Reaktionsansatz ermöglicht sowohl die Analyse von Substraten und Produkten der enzymatischen Reaktionen mit MDD-HPLC als auch von Reaktionsverläufen mit einem gekoppelten optischen Test. Für die Erstellung von Reaktionsverläufen wurden die Reaktionen in Quarzglas-Küvetten in 800  $\mu\text{l}$  Volumina bei  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Photometer inkubiert.

Standardreaktionsansätze und -mischungen:

	Basisansatz für HPLC-Analytik	Basisansatz für optischen Test	Basismix für opt. Test ohne ATP
HEPES	21 mM	21 mM	21 mM
KCl	30 mM	30 mM	30 mM
MgCl <sub>2</sub>	6 mM	6 mM	-
ATP	5 mM	5 mM	-
DTT	1 mM	1 mM	1 mM
PEP	1 mM	1 mM	1 mM
NADH	-	0,3 mM	0,3 mM
PK	2 U/ml	0,2 U/ml	0,2 U/ml
LDH	-	0,85 U/ml	0,85 U/ml
Glyzerin	1,7 %	1,7 %	1,7 %
EDTA	50 µM	50 µM	50 µM
Einstellen des pH mit KOH	6,4 mM	6,4 mM	-
pH	7,5	7,5	7,5

Konzentration IP6K-2: 33 nM für Substrattests und 57 nM für gekoppelte optische Tests

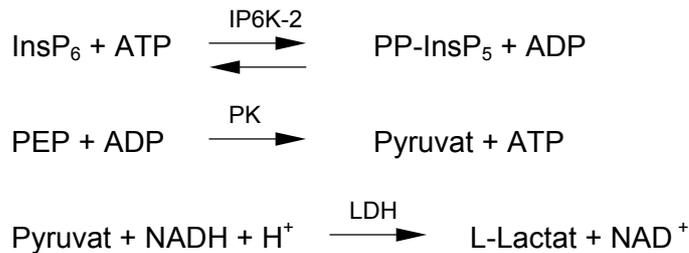
Konzentrationen der verwendeten InsP: 0,313 – 20 µM

Für die Messung der IP6K-Aktivität mit dem gekoppelten optischen Test haben sich nach Vorversuchen bei der Erstellung des Reaktionsansatzes bestimmte Einschränkungen ergeben. So sollte die freie Mg<sup>2+</sup>-Konzentration nicht über 1 mM und die InsP<sub>6</sub>-Konzentration unter 25 µM liegen, da InsP<sub>6</sub> sonst als trüber Magnesium-Komplex in der Küvette ausfällt, der die Messung stört. Die freie Mg<sup>2+</sup>-Konzentration wurde mit dem Programm MaxChelator [C. Patton, Universität Stanford] berechnet. Weiterhin wurde die Konzentration der Indikatorenzyme auf weniger als 1/10 der von K. Hillemeier eingesetzten Menge reduziert. Diese Enzyme enthalten als Kontamination ATPasen, deren Aktivitäten unter Umständen die IP6K-Aktivität so stark überlagern, dass diese nicht mehr messbar ist. Da die gemessenen maximalen Aktivitäten der IP6K-2 im Bereich von < 1 mU lagen, war die Konzentration der Indikatorenzyme in diesem Fall nicht limitierend für die Reaktionsgeschwindigkeit der IP6K-2.

### 2.4.10.1. Messung enzymatischer Reaktionsverläufe mit dem gekoppelten optischen Test

Der gekoppelte optische Test ist eine Methode zur direkten Messung enzymatischer Reaktionsverläufe, sogenannter *Single Transients* [Gutfreund, 1971: S. 189-203], die z.B. zur Be-

stimmung apparenter  $K_m$ -Werte und von Hemmkonstanten ( $IC_{50}$ -Werte) eingesetzt werden können. Dabei ist die Kinasereaktion des zu charakterisierenden Enzyms an die Reaktion sogenannter Indikatorenzyme gekoppelt. Bei diesen Indikatorenzymen handelt es sich zum einen um die Pyruvatkinase (PK), die Teil eines ATP-regenerierenden Systems ist. Durch ihre Reaktion wird die ATP-Konzentration im Reaktionsansatz konstant gehalten und dabei das Substrat (Pyruvat) für die eigentliche Indikatorreaktion produziert. Dieses wird durch ein zweites Enzym, die Lactatdehydrogenase (LDH), unter NADH-Verbrauch zu L-Lactat umgesetzt. Der Verbrauch von NADH kann bei einer Extinktion von  $\lambda = 365 \text{ nm}$  gemessen werden.



### 2.4.10.2. Bestimmung von $K_m$ -Werten mit dem gekoppelten optischen Test

Bei einer enzymkatalysierten Reaktion wird im einfachsten Fall durch das Enzym E nur ein Substrat S zu einem Produkt P umgesetzt. Wenn angenommen wird, dass die Geschwindigkeit der Rückreaktion nicht signifikant ist, ergibt sich vereinfacht folgende Gleichung:



Dabei sind  $k_1$  und  $k_2$  Konstanten, welche die Bildung und den Zerfall des Enzym-Substratkomplexes ES beschreiben. Die Konstante  $k_p$  ist die Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion zum Produkt und ist unter den angenommenen vereinfachten Bedingungen geschwindigkeitsbestimmend.

Die Geschwindigkeitsgleichung für eine einfache Reaktion, bei der ein Substrat umgesetzt wird, kann als Michaelis-Menten-Gleichung ausgedrückt werden [Segel, 1976: S.214-216]. Diese beschreibt vereinfacht die Geschwindigkeit, mit der bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen und einer bestimmten Enzymkonzentration eine enzymatische Reaktion abläuft:

$$v = \frac{V_{\max}[\text{S}]}{K_m + [\text{S}]}$$

Im Experiment kann nun bei immer gleicher Enzymkonzentration die Anfangsgeschwindigkeit bei verschiedenen eingesetzten Substratkonzentrationen bestimmt werden. Die  $K_m$ -Werte, die sich aus diesen Messungen ergeben, sind meistens apparente  $K_m$ -Werte ( $K_{m,\text{app}}$ ), da viele Enzyme einer Produkthemmung unterliegen. Wenn eine Produkthemmung vorliegt,

ändern sich die apparenten  $K_m$ -Werte bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen. Um eine Enzym-Substrat-Reaktion allgemein zu beschreiben, ist es notwendig, die ermittelten Daten mathematisch und graphisch auszuwerten. Üblicherweise werden die gemessenen Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentrationen aufgetragen und als Geschwindigkeits-Konzentrations-Kurven bzw. bei Verwendung der reziproken Werte linear als Lineweaver-Burk-Diagramm dargestellt.

Zur Messung des  $K_{m,app}$  von  $\text{InsP}_6$  mit dem gekoppeltem optischen Test wurden Standardreaktionen (2.4.10.) mit 57 nM IP6K-2 durchgeführt und die Substratkonzentrationen von 0,313–10  $\mu\text{M}$  variiert. Eine weitere Messreihe erfolgte in Gegenwart von 100 mM KCl. Für die Bestimmung des  $K_{m,app}$  von ATP wurden ebenfalls 57 nM IP6K-2 eingesetzt und die  $\text{InsP}_6$ -Konzentration wurde konstant bei 5  $\mu\text{M}$  gehalten. Die Konzentration von Mg-ATP wurde durch Zugabe einer Lösung von 75 mM ATP, 90 mM  $\text{MgCl}_2$ , 150 mM KOH, pH 7,5 auf 1–10 mM eingestellt. Der Reaktionsansatz wurde jedes Mal 10 min bei 30 °C im Photometer vorinkubiert und der sog. Vorlauf der Reaktion (durch Kontamination der Indikatorenzyme mit ATP-verbrauchenden ATPasen) aufgezeichnet. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrates gestartet und bis zum Ende inkubiert. Jede Messreihe wurde als Dreifachbestimmung mit verschiedenen Enzympräparationen durchgeführt. Das Messintervall betrug 2 s. Die Umrechnung der gemessenen Absorptionsänderungen ( $\Delta\text{OD}_{365\text{nm}}$ ) in NADH- bzw.  $\text{InsP}_6$ -Konzentrationsänderungen erfolgte nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz:  $\Delta c\text{NADH} = \Delta c\text{InsP}_6 = \Delta\text{OD}_{365\text{nm}} / (\epsilon d)$  mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von NADH  $\epsilon = 3,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bei einer Einstrahlwellenlänge von 365 nm und Schichtdicke der Küvette von  $d = 1 \text{ cm}$ . Die Daten wurden in MS Excel übertragen und die Reaktionsgeschwindigkeit ( $v$ ) bzw. die maximalen Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) wurden abzüglich des Vorlaufs ermittelt. Die Bestimmung des  $K_m$ -Werts erfolgte durch Auftragung von  $1/V_{max}$  vs  $1/S$  nach Lineweaver-Burk mit GraphPad Prism 4.

### **2.4.10.3. Hemmung rekombinanter HsIP6K-2 durch bestimmte polyphenolische Inhibitoren**

Für die Inhibitormessungen wurden einige polyphenolische Substanzen ausgewählt, die sich gegenüber der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinase A, B und C oder der IPMK [Mayr *et al.*, 2005] als potente Inhibitoren erwiesen hatten. Durch Vergleich der Hemmstoffwirkungen auf die verschiedenen  $\text{InsP}$ -Kinasen könnten möglicherweise kinasespezifische Inhibitoren identifiziert werden. Es wurden folgende Hemmstoffe verwendet: 3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon, THF (Lancaster), Aurintricarbonsäure, ATA (Aldrich), (-)-Epicatechin-3-gallat, ECG (Sigma), Gossypol (Sigma), Hypericin (Calbiochem), Quercetin (Fluka).

Die Hemmstofflösungen wurden als 10 mM Lösung in DMSO an jedem Messtag frisch angesetzt und, da manche Hemmstoffe photosensitiv sind, unter Lichtausschluss gelagert. Es wurden Hemmstoffkonzentrationen von 0,05-20  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Dabei wurde die DMSO-Konzentration im Reaktionsansatz konstant auf 0,05 % gehalten, da in Vorversuchen ein potentieller Effekt auf die eingesetzten Enzyme bis zu einer Konzentration von 0,2 % DMSO ausgeschlossen werden konnte.

Die Enzymaktivitäten wurden mit dem gekoppelten optischen Test bestimmt (2.4.10.1.). Dabei wurde die IP6K-2 im Reaktionsansatz vor Substratzugabe mit dem Hemmstoff für 10 min bei 30 °C vorinkubiert. Die Vorinkubation erfolgte für Hypericin, das lichtaktiviert wird, im Laborlicht und für alle anderen Hemmstoffe im Dunkeln. Die Reaktionen wurden mit 5  $\mu\text{M}$   $\text{InsP}_6$  als Substrat gestartet und die Anfangsgeschwindigkeiten für weitere 10 min gemessen. Als Referenzaktivitäten wurden Messungen ohne Hemmstoff und ohne DMSO sowie in Gegenwart von 0,2 % DMSO durchgeführt. Alle Messungen wurden insgesamt dreimal mit unterschiedlichen Enzympräparationen wiederholt. Ein Effekt der Hemmstoffe auf die Indikatorenzyme wurde nicht getestet, da dieser bereits von Hillemeier [2001] widerlegt wurde.

Die Rohdaten wurden wie beschrieben mit MS Excel ausgewertet und mit GraphPad Prism 4 als halblogarithmische Konzentrations-Wirkungs-Kurven dargestellt. Die IC50-Konzentrationen (Hemmstoffkonzentration bei halbmaximaler Hemmung) wurden durch das Programm rechnerisch aus den Kurven ermittelt.

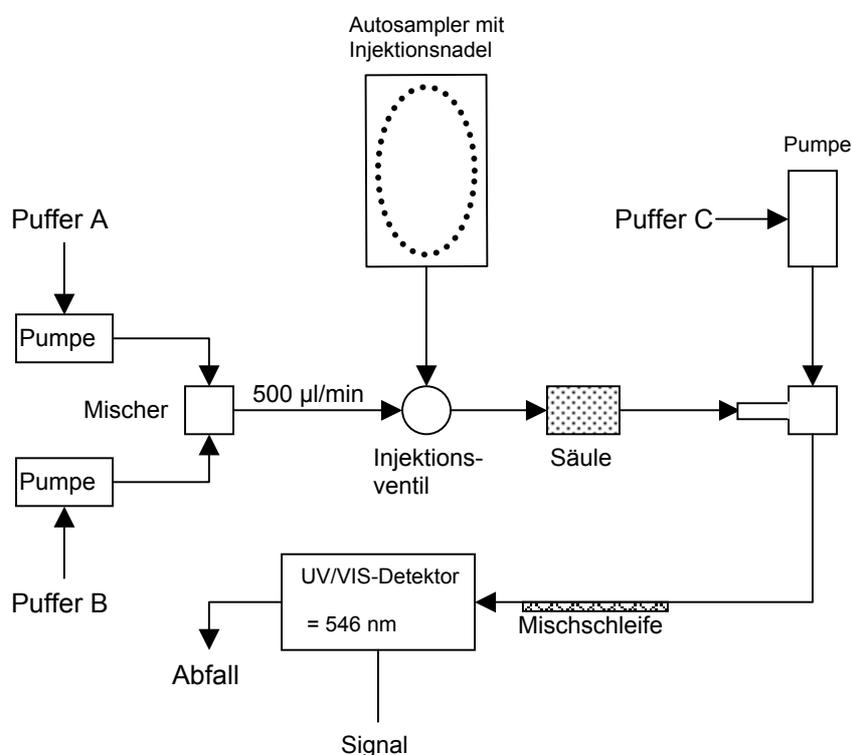
#### **2.4.10.4. Messung des Hemmstoffeinflusses auf die $K_m$ -Werte von $\text{InsP}_6$ und ATP**

Drei Hemmstoffe (THF, ECG und ATA) wurden exemplarisch ausgewählt und die  $K_m$ -Werte für  $\text{InsP}_6$  und ATP (2.4.10.2.) bei IC60-Konzentrationen bestimmt. Vor Substratzugabe wurde die IP6K-2 für 10 min bei 30 °C mit dem Hemmstoff im Dunkeln vorinkubiert. Die DMSO-Konzentration betrug 0,2 %. Die Rohdaten wurden wie beschrieben in MS Excel ausgewertet, die  $K_m$ -Werte mit GraphPad Prism 4 und der Hemmtyp mit dem Enzym Kinetik Modul von SigmaPlot 8.0 ermittelt.

#### **2.4.11. Analyse von Inositolphosphaten mit *Metal-Dye-Detection* (MDD)–HPLC**

Die MDD-Methode [Mayr, 1990: S. 83-108; Stephens *et al.*, 1993; Guse *et al.*, 1995] beruht auf einem Ligandenaustausch in einem ternären System. Dadurch können Inositolphosphate ohne vorherige radioaktive Markierung direkt und sehr empfindlich detektiert werden. Dieses ternäre System besteht aus dem metallbindenden Farbstoff 4-(2-Pyridyl-(2)-azo)-resorcin (PAR), den zu analysierenden metallbindenden Inositolphosphaten und dem dreiwertige Übergangsmetallkation Yttrium.

Zuerst werden die Inositolphosphate in einem sauren Puffersystem über eine Anionenaustauschersäule getrennt. Diese Puffer enthalten Yttrium im Überschuss, bezogen auf die Inositolphosphatkonzentration in der Probe. Danach wird das Eluat durch Beimischung eines dritten, den Farbstoff enthaltenden Puffers alkalisiert. Der Farbstoff PAR bindet Yttrium in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 und verändert dadurch seine Basisabsorption bei 520-550 nm. Bei alkalischem pH wird Yttrium durch Inositolphosphate deutlich affiner gebunden als durch PAR. Durch diese komplexiometrische Nachsäulenderivatisierung nimmt die Konzentration des Metall-Farbstoffkomplexes ab, wenn Inositolphosphate vorhanden sind. Durch Spannungsumkehr am Monitor werden die auftretenden negativen Peaks als positive Signale aufgezeichnet.



**Abb. 2.4-1: Schematische Darstellung des Aufbaus der MDD-HPLC.**

Pumpen: Puffer A und B : 422 Master (Kontron)  
Puffer C : LC-10 AD (Shimadzu)

Autosampler : HPLC 560 (Kontron)

Säule: Mini Q PC 3.2/3 (Pharmacia)

UV/Vis-Detektor : VWM (Pharmacia LKB) oder SPD-10A VP (Shimadzu)

Lampe: Deuterium Lampe (Sofi GmbH)

Die benutzten Gradienten sind im Anhang aufgeführt (A2.).

### **2.4.11.1. Untersuchung der Substratselektivität der HsIP6K-2**

Es sollte getestet werden, welche InsP die IP6K-2 alternativ zu InsP<sub>6</sub> als Substrat akzeptiert. Aufbauend auf den Ergebnissen sollten Substratstruktur-Analysen durchgeführt werden und potentielle Phosphorylierungswege zum InsP<sub>6</sub> *in vivo* [Haverland, 2001] bestätigt werden. Die Standardreaktionsansätze (2.4.10.) wurden mit IP6K-2 zusammen in einem 1,5ml-Reaktionsgefäß für 10 min bei 37 °C auf dem Heizblock vorinkubiert. Dann wurden die Reaktionen durch Zugabe von 5 µM InsP gestartet. Das finale Volumen betrug 400-1200 µl. Nach definierten Zeiten wurden 400µl-Aliquots genommen, die Reaktion durch Zugabe von 10 % TCE, 6 mM EDTA und 1,25 mM NaF gestoppt und die Probe für die Analyse mit MDD-HPLC aufgearbeitet (2.4.11.3.).

### **2.4.11.2. Bestimmung des Km-Werts ausgewählter Substrate der HsIP6K-2 mit MDD-HPLC**

Die Standardreaktionsansätze (2.4.10.) wurden zusammen mit IP6K-2 in einem 1,5ml-Reaktionsgefäß für 10 min bei 37 °C auf dem Heizblock vorinkubiert. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,313-20 µM InsP gestartet. Das finale Volumen betrug 400 µl. Zu einem definierten Zeitpunkt wurden die Reaktionen durch Zugabe von 10 % TCE, 6 mM EDTA und 1,25 mM NaF gestoppt und die Probe für die Analyse mit MDD-HPLC aufgearbeitet (2.4.11.3.).

### **2.4.11.3. Aufarbeiten von Inositolphosphaten aus *in vitro*-Enzymreaktionen für die Analyse mit MDD-HPLC**

Nach Zugabe von TCE wurden die Proteine für 15 min auf Eis gefällt und danach bei 13 000 UpM und 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Dann wurde eine Aktivkohleextraktion zur Entfernung von ATP durchgeführt, das die HPLC-Analytik stören würde. Dazu wurde der Überstand in ein 2ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 5 % Norit A-Suspension (20%ige (w/v) säuregewaschene Aktivkohle-Suspension) versetzt und das Gefäß für 10 min bei 4 °C über Kopf geschwenkt. Danach wurde die Kohle wie oben beschrieben in der Tischzentrifuge sedimentiert und der Überstand in ein sauberes 2ml-Reaktionsgefäß gegeben. Der Extraktionsschritt wurde zweimal wiederholt.

Zur Entfernung der TCE wurde der Überstand dreimal mit 1 ml wassergesättigtem Diethylether für 2 min durch kräftiges Schütteln extrahiert. Der Ether wurde zwischendurch mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die Probe wurde mit Triethanolamin (TEA) auf pH 6-7 eingestellt. Der verbleibende Ether wurde kurz in der Vakuumzentrifuge abgezogen. Danach wurden die Proben mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 500 µl aufgefüllt und mit einer Spritze

durch einen 0,2 µm-Filter gedrückt. Die so aufgearbeiteten Proben wurden bis zur Messung bei -20 °C gelagert.

### 2.4.12. Säurekatalysierte Hydrolyse von PP-InsP<sub>5</sub>

Es sollte über saure Hydrolyse der Phosphosäureanhydridbindung im PP-InsP<sub>5</sub> nachgewiesen werden, dass dieses durch die enzymatische Aktivität der IP6K-2 über InsP<sub>6</sub> als Zwischenprodukt aus D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> entsteht. Bei der sauren Hydrolyse von PP-InsP<sub>5</sub> entsteht immer InsP<sub>6</sub>, das unter den im folgenden beschriebenen Versuchsbedingungen nicht weiter dephosphoryliert [Mayr *et al.*, 1992]. Es wurden 5 nmol D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> (Endkonzentration 5 µM) unter Standardbedingungen (2.4.10.) für 30 min mit IP6K-2 inkubiert. Davon wurde ein Aliquot (0,8 nmol InsP) zur Bestimmung der Retentionszeiten mit MDD-HPLC analysiert (Gradient MQIP7-8). Dann wurde ein Volumen, das 2 nmol Gesamt-InsP entsprach, injiziert und à 30 s fraktioniert. Die C-Pumpe war dabei ausgeschaltet. Um eine unkontrollierte Hydrolyse der InsP zu verhindern, wurden die gesammelten Fraktionen sofort auf Eis gelagert. Ein halbes Volumen jeder Fraktion wurde mit 1 M TEA auf pH 6,0 eingestellt. Ein halbes Volumen wurde im Elutionspuffer für 15 min bei 95 °C auf dem Heizblock inkubiert und dann ebenfalls mit 1 M TEA auf pH 6,0 eingestellt. Die so behandelten Fraktionen wurden erneut mit MDD-HPLC analysiert.

### 2.4.13. Enzymatische Synthese und Reinigung von hochphosphorylierten Inositolphosphaten

Mit Hilfe der Enzyme IPMK (in der Arbeitsgruppe rekombinant exprimiert und gereinigt) und IP6K-2 wurden einige hochphosphorylierte InsP synthetisiert und teilweise an definierten Positionen radioaktiv mit <sup>32</sup>P markiert.

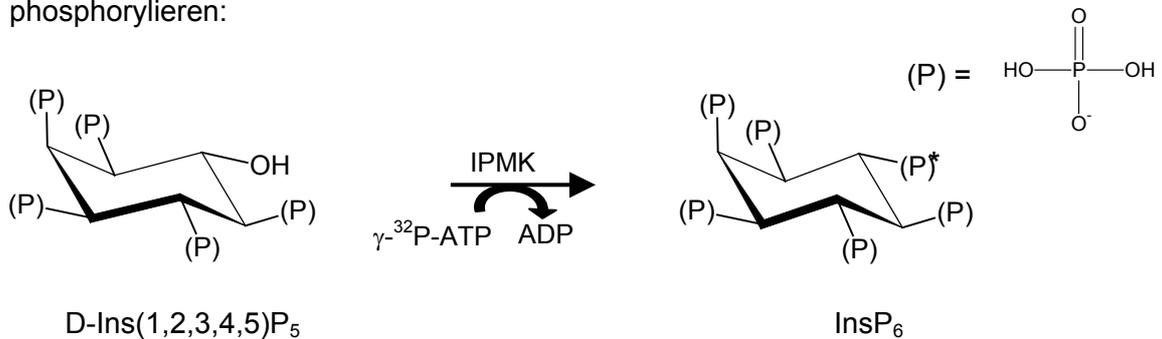
<u>IPMK-Basisansatz</u>	<u>IP6K-2-Reaktionsansatz</u>
10 mM TEA	20 mM HEPES
30 mM KCl	50 mM KCl
5 mM MgCl <sub>2</sub>	6 mM MgCl <sub>2</sub>
0,5 mM bzw. 50 µM ATP	5 mM ATP
1 mM DTT	1 mM DTT
1 mM PEP	1 mM PEP
2 U/ml PK	2 U/ml PK
pH 7,5	pH 7,2

### 2.4.13.1. *Enzymatische Synthese von D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub>*

Für die Synthese von D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub> wurde eine Nebenaktivität der IPMK genutzt, nämlich das Substrat D-Ins(2,4,5,6)P<sub>4</sub> an D-3'-Position zu phosphorylieren. Allerdings musste die Reaktion rechtzeitig gestoppt werden, da das entstandene InsP<sub>5</sub> sonst weiter zu InsP<sub>6</sub> umgesetzt worden wäre. 790 µl IPMK-Reaktionsansatz (0,5 mM ATP) wurden in eine Quarzküvette pipettiert, mit 5,5 mU/ml LDH, 0,2 mM NADH und 0,5 mU/ml IPMK versetzt und im Spektralphotometer für 10 min bei 30 °C vorinkubiert. Weiteren 10 ml Reaktionsansatz (0,5 mM ATP) wurden 0,1 µCi γ-[P<sup>32</sup>]-ATP (spezifische Aktivität 30 µCi/nmol; Amersham) und ebenfalls 0,5 mU/ml IPMK zugegeben und in einem 50ml-Zentrifugenröhrchen für 10 min bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Beide Reaktionsansätze wurden zeitgleich durch Zugabe von 50 µM D-Ins(2,4,5,6)P<sub>4</sub> gestartet. Anhand des Reaktionsverlaufs im Photometer konnte abgelesen werden, wann die Reaktion vollständig abgelaufen war. Beide Reaktionsansätze wurden dann vereinigt und die enthaltenen Proteine in Gegenwart von 10 % TCE, 5,5 mM EDTA und 0,5 mM NaF für 15 min auf Eis gefällt. Die gefällten Proteine wurden bei 10 000 UpM (SS-34 Rotor) und 4 °C für 10 min sedimentiert. Der Überstand wurde in ein 50ml-BlueMax-Röhrchen überführt und die TCE dreimal mit je 5 ml wassergesättigtem Diethylether extrahiert. Danach wurde mit 1 M TEA ein pH 6,0 eingestellt. Zur Trennung der InsP und ATP erfolgte eine Chromatographie über eine 10ml-Säule, die mit HCl-gewaschener und equilibrierter Q-Sepharose FF gepackt war. Der Reaktionsansatz wurde dabei unverdünnt aufgetragen und die Q-Sepharose mit 20 Säulenvolumen 0,05 M HCl gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 0,05-0,4 M HCl in einem Volumen von 100 ml. Es wurden Fraktionen à 500 µl gesammelt und die Radioaktivität von 10 µl Aliquots direkt im Flüssig-Scintillations-Zähler bestimmt. Die Ergebnisse der Radioaktivitätsbestimmung wurden in MS Excel graphisch dargestellt und so die radioaktiven InsP-Peaks ermittelt. Aliquots, der so ausgewählten Fraktionen wurden mit MDD-HPLC auf ihre Reinheit überprüft. Als „rein“ befundene Fraktionen wurden in einem 14ml-Greiner-Röhrchen vereinigt, mit 2 M LiOH auf pH 6,0 eingestellt und in der Vakuumzentrifuge vollständig lyophilisiert. Danach wurde die Probe durch Extraktion mit dreimal 6 ml Ethanol abs. entsalzt, erneut vollständig lyophilisiert und das Präzipitat in 1 ml ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Ein Aliquot wurde mit MDD-HPLC qualitativ und quantitativ analysiert.

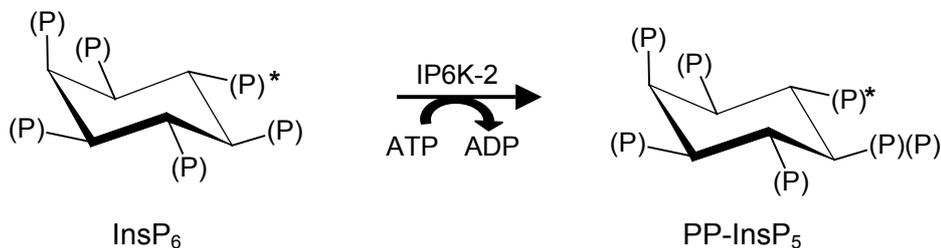
### 2.4.13.2. Enzymatische Synthese von 6[<sup>32</sup>P]-PP-InsP<sub>5</sub>

Die Herstellung von 6[<sup>32</sup>P]-PP-InsP<sub>5</sub> erfolgte in zwei enzymatischen Reaktionsschritten. Im ersten Schritt wurde die Nebenaktivität der IPMK genutzt, D-Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> an D-6'-Position zu phosphorylieren:



**Abb. 2.4-2: Enzymatische Synthese von 6[<sup>32</sup>P]-InsP<sub>6</sub> aus D-Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub>.**

Das entstandene Produkt, InsP<sub>6</sub>, wurde an D-6'-Position <sup>32</sup>P-markiert ((P)\*). Nach gründlicher chromatographischer Reinigung des InsP<sub>6</sub>, bei der nichtumgesetztes D-Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> und γ-[<sup>32</sup>P]-ATP entfernt wurden, wurde ein zweiter enzymatischer Syntheseschritt durchgeführt. Hierbei diente InsP<sub>6</sub> als Substrat für die IP6K-2, die eine Pyrophosphatgruppe, wahrscheinlich an D-5'-Position, einfügte.



**Abb. 2.4-3: Enzymatische Synthese von 6[<sup>32</sup>P]-PP-InsP<sub>5</sub>.**

Auf diese Weise wurde ein <sup>32</sup>P-markiertes PP-InsP<sub>5</sub> mit genau einem radioaktiven Phosphat in 6α-Position am Inositolring hergestellt. Dadurch sollte vermieden werden, dass bei nachfolgenden enzymatischen Reaktionen im Versuchansatz das radioaktive Phosphat über eine Hydrolyse der Pyrophosphatgruppe vom Inositolphosphat entfernt wird und, möglicherweise als Folge weiterer, normaler Protein-Phosphorylierungen, unspezifische Signale an Proteinen verursacht. Außerdem ermöglicht das Vorhandensein nur eines radioaktiven Phosphats pro Inositolphosphatmolekül den direkten Vergleich von radioaktiven Signalen.

#### Enzymatische Synthese von 6[<sup>32</sup>P]-InsP<sub>6</sub>

In einem 1,5ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 400 µl IPMK-Reaktionsansatz (50 µM ATP) mit nominal 100-250 µCi γ-[<sup>32</sup>P]-ATP (spezifische Aktivität: 3000 Ci/mmol, Amersham)

versetzt und die Reaktion durch Zugabe von 0,5 mU IPMK gestartet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25  $\mu$ M D-Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> gestartet und 1 h bei 37 °C auf dem Heizblock inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 % eiskalter TCE und 6,3 mM EDTA gestoppt und für 15 min auf Eis inkubiert. Die ausgefällten Proteine wurden in der Tischzentrifuge für 10 min bei 13 000 Upm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein sauberes 2ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 5 % Norit A-Suspension extrahiert und anschließend dreimal mit je 1 ml wassergesättigtem Diethylether gewaschen. Der pH-Wert wurde mit Tris auf pH 6-7 eingestellt. Das Ergebnis der enzymatischen Reaktion wurde durch MDD-HPLC überprüft (Gradient MQIPFLKURZ).

### Säulenchromatographie im Minimaßstab zur Trennung von ATP und InsP<sub>6</sub>

Um eine Absorption der InsP an die Wände der Reaktionsgefäße zu vermindern, wurden 1,5ml- und 2ml-Eppendorf-Gefäße und 14ml-Greiner-Röhrchen mit 2 mM Ammoniumphosphat (Monobase, Sigma) gefüllt und vollständig lyophilisiert. Die Gefäße wurden mit ddH<sub>2</sub>O ausgespült und getrocknet.

300  $\mu$ l Q-Sepharose FF wurden in eine 1 ml Spritze mit Fritte aus Glaswolle (Merck) gefüllt. Die Mini-Säule wurde mit 2 ml 0,5 M HCl gewaschen und anschließend solange mit ddH<sub>2</sub>O gespült, bis pH 5-6 erreicht war. Danach wurde die Säule mit 3 ml 20 mM Tris/HCl, pH 6,1 equilibriert. Der radioaktive Reaktionsansatz wurde in ein wie oben beschrieben vorbehandeltes und an einem Stativ befestigtes 14ml-Greiner-Röhrchen gegeben, mit 20 mM Tris/HCl, pH 6,1 auf 4 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und über einen Schlauch mit Klemme auf die Minisäule getropft. Der Durchlauf wurde in 2ml-Fractionen aufgefangen. Danach wurde die Säule mit 15-20 ml 0,05 M HCl gewaschen. Es wurden 2ml-Fractionen gesammelt und die Radioaktivität mit dem Handmonitor überprüft. Es wurde solange gewaschen, bis die Radioaktivität in den Fractionen nicht mehr messbar abnahm. Die Elution erfolgte stufenweise mit einem HCl-Gradienten, der über eine leere 10ml-Säule (Pharmacia) mit Ventil auf die Mini-Säule getropft wurde:

2 ml	0,10 M HCl
	0,15 M HCl
	0,20 M HCl
	0,25 M HCl
3 ml	0,30 M HCl
2 ml	1,00 M HCl

Es wurden 0,5ml-Fractionen gesammelt. Von jeder Fraction wurden 10  $\mu$ l in 1,5ml-Reaktionsgefäße pipettiert und die Radioaktivität im Flüssig-Scintillations-Zähler bestimmt. Die Ergebnisse wurden graphisch dargestellt und die Fractionen ermittelt, die radioaktives InsP<sub>6</sub> enthielten. Um zu vermeiden, dass über falsches Vereinigen von vermeintlichen Hauptfractionen erneut radioaktives ATP in die Probe gelangt, wurde eine Fraction aus der InsP<sub>6</sub>-Peakgrenze mit MDD-HPLC analysiert (Gradient MQIPFLKURZ). Danach wurden die InsP<sub>6</sub>-

Fraktionen, die kein ATP mehr enthielten, in einem phosphatbeschichteten 14ml-Greiner-Röhrchen vereinigt. Der pH-Wert wurde mit einer LiOH-Lösung sofort auf 6-7 eingestellt. Da Lithium weitere enzymatische Reaktionen und zuviel Salz die MDD-HPLC-Analytik stören könnten, wurde eine alkoholische Extraktion durchgeführt. Dazu wurde der Probe dreimal 1 ml und dreimal 2 ml Ethanol abs. zugesetzt, jedes Mal 2 min kräftig gevortext und 20 min auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde 10 min bei 14 000 Upm und Raumtemperatur in der Tischzentrifuge sedimentiert. Die Überstände wurden verworfen (ethanolgelöstes Lithiumchlorid) und das Präzipitat ( $\text{InsP}_6$ ) wurde in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Danach wurde das Präzipitat in 200-500  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Ein Aliquot (etwa 0,5 nmol Inositolphosphat) wurde mit MDD-HPLC analysiert und quantifiziert (Gradient MQIP7-8). Dabei wurden alle 30 s Fraktionen gesammelt und deren Radioaktivität im Flüssig-Scintillations-Zähler bestimmt. Die Ergebnisse wurden mit MS Excel graphisch dargestellt. Das radioaktive  $\text{InsP}_6$  wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### Enzymatische Synthese von $6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$

In einem 1,5ml-Reaktionsgefäß wurden 624  $\mu\text{l}$  IP6K-Reaktionsansatz mit 12 mU rekombinanter IP6K-2 versetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von etwa 5  $\mu\text{M}$  radioaktivem  $\text{InsP}_6$  gestartet und 10 min bei 37 °C inkubiert. Ein 10  $\mu\text{l}$  Aliquot wurde zusammen mit einem  $\text{InsP}$ -Standard über die MDD-HPLC à 30 s fraktioniert (Gradient MQIP7-8). Die Radioaktivität der Fraktionen wurde im Flüssig-Scintillations-Zähler gemessen und die Ergebnisse mit MS Excel graphisch dargestellt. Der verbleibende Reaktionsansatz wurde entweder sofort weiterverwendet oder bei -80 °C gelagert.

Anfangs wurden der Reaktion 5  $\mu\text{M}$  nichtradioaktives  $\text{InsP}_6$  und nur 0,25  $\mu\text{M}$   $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  zugesetzt. Nachdem aber die Synthese und Reinigung des  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6$  optimiert worden waren und damit genug radioaktives Substrat zur Verfügung stand, wurde auf die Zugabe von nichtradioaktivem  $\text{InsP}_6$  verzichtet.

### **2.4.13.3. Enzymatische Synthese von $5\beta[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$**

Für diesen Versuch wurde ein  $\text{PP-InsP}_5$  enzymatisch produziert, dass eine radioaktive Phosphatgruppe an  $\beta$ -Position des Inositolphosphattrings trägt. Dafür wurde eine Standard-IP6K-Reaktion (Volumen 100  $\mu\text{l}$ ) mit 1 nmol  $\text{InsP}_6$  und 0,5  $\mu\text{mol}$   $\gamma\text{-}[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  (Aktivität 200  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ) durchgeführt. Die Reaktion wurde 2,5 h bei 37 °C inkubiert und durch Erhitzen des Reaktionsansatzes für 6 min auf 45 °C gestoppt. ATP und  $\text{PP-InsP}_5$  wurden durch eine präparative HPLC getrennt. Der Ansatz wurde dafür halbiert und mit jeweils 1,5 nmol nichtradioaktivem  $\text{PP-InsP}_5$  und 2,5  $\mu\text{mol}$  EDTA versetzt und ohne C-Reagenz über die HPLC à 30 s fraktioniert (Gradient MQIP7-8.wash). Die Arbeiten erfolgten auf Eis und die Proben wurde

sofort nach der Fraktionierung mit LiOH neutralisiert. Die Radioaktivität der Fraktionen wurde im Flüssig-Scintillations-Zähler bestimmt. Aliquots der „Peakgrenzen“ wurden mit MDD-HPLC auf ihre Reinheit überprüft. Die ATP-freien radioaktiven PP-InsP<sub>5</sub>-Fraktionen wurden vereinigt, vollständig lyophilisiert und LiCl mit Ethanol abs. extrahiert (2.4.13.2.). Das gereinigte PP-InsP<sub>5</sub> wurde in 100 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen (spezifische Aktivität etwa 500 nCi/nmol). Die gewünschte spezifischen Aktivität wurde mit nichtradioaktivem PP-InsP<sub>5</sub> eingestellt.

### **2.4.14. Gewinnung gereinigter fetaler Rattenleberextrakte**

#### **2.4.14.1. Präparation der Lebern**

Wistar-Ratten wurden von der Tierhaltung des UKE geliefert. Tragende Weibchen wurden am 20. Tag der Schwangerschaft getötet. Dazu wurden die Tiere zuerst mit CO<sub>2</sub> betäubt und anschließend mit einer Guillotine dekapitiert. Der Uterus wurde geöffnet, die Feten nacheinander dekapitiert und die Körper sofort in Eiswasser gelegt. Auf Eis wurden nacheinander die Lebern aus den Rattenfeten präpariert. Die entnommenen Organe wurden sofort in eiskalte 50ml-BlueMax-Röhrchen gegeben und dreimal in eiskalter physiologischer Kochsalzlösung geschüttelt, um den Organen anhaftendes Blut zu entziehen. Die Lebern wurden à 1 g aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung in 14ml-Greiner-Röhrchen bei -80 °C gelagert.

#### **2.4.14.2. Herstellen der Leberextrakte: Gewebeaufschluss**

2,5 g Rattenleber wurden mit 20 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer (HP plus 0,5 mM Benzamidin, 0,4 mM PMSF und 1 µM Pepstatin) versetzt und 4mal 10 s auf Eis mit einem Ultra-Turrax dispergiert. Die Suspension wurde 5 min auf Eis gerührt. Die Ultra-Turrax-Behandlung und das Rühren auf Eis wurden einmal wiederholt.

#### **2.4.14.3. Trennen der Zellbestandteile: Differentielle Zentrifugation**

Das Leberhomogenat (2.4.14.2.) sollte in verschiedene Fraktionen zellulärer Komponenten getrennt werden. Eine einfache Methode ist die Trennung durch differentielle Zentrifugation, bei der die Zellbestandteile durch aufeinanderfolgende Zentrifugationsschritte nach Molekulargewichten separiert werden. 15 ml Homogenat wurden in einem 50ml-PP-Zentrifugenröhrchen bei 500 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert (SS-34-Rotor). Der Überstand wurde in ein frisches Zentrifugenröhrchen gegeben und für 20 min bei 2000 g und 4 °C erneut zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand in ein sauberes Zentrifugenröhrchen überführt. Nach weiteren 20 min Zentrifugation bei 10 000 g und 4 °C wurde der gewonnene

Überstand auf zwei 10ml-Ultrazentrifugen-Röhrchen (Beckman) aufgeteilt und bei 100 000 g und 4 °C für 90 min zentrifugiert (80-Ti Rotor).

Es wurden folgende Fraktionen erhalten:

- P0.5: Zelldebris und Zellkerne
- P2: schwere Membranen und Kerne
- P10: besonders Mitochondrien
- P100: Plasmamembranbestandteile
- S100: lösliche zytosolische Bestandteile

#### **2.4.14.4. Reinigen der Zellfraktionen: Ammoniumsulfatfällung**

Zur Abtrennung von endogenen Inositolphosphaten und Trinukleotiden wurden die durch differentielle Zentrifugation (2.4.14.3.) erhaltenen Pellets P0.5, P2 und P10 mit je 2 ml und P100 mit 1 ml 60%iger Ammoniumsulfatlösung (AS-Lösung) aufgenommen und 10 min auf Eis gerührt. Die S100-Fraktion und nicht fraktioniertes Leberhomogenat (Pges) wurden jeweils mit gesättigter AS-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 60 % AS versetzt und ebenfalls 10 min auf Eis gerührt. Die Proteine wurden in der Zentrifuge 15 min bei 13 300 g und 4 °C pelletiert (SS-34 Rotor). Danach wurde der Überstand abgenommen und die Pellets in 60%iger AS-Lösung erneut 10 min auf Eis gerührt. Die AS-Fällung wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Schließlich wurden die Membran-Pellets (P0.5-P100) in je 2 ml Homogenisierungspuffer plus 0,1 % Triton X-100 aufgenommen. Die S100-Fraktion wurde in 2 ml Homogenisierungspuffer ohne Triton X-100 resuspendiert.

#### **2.4.14.5. Entsalzen der Ammoniumsulfat-gefällten Proteine**

Die AS-gefällten und resuspendierten Pellets P2-, P10- und P100- sowie die S100-Fraktion (2.4.14.4.) wurden gelchromatographisch über PD-10-Säulen (Amersham) entsalzt, wobei auch die letzten Reste organischer Phosphate entfernt wurden. Die Elution erfolgte mit je 10 ml Homogenisierungspuffer plus 0,1 % Triton X-100 bzw. ohne Triton X-100 (S100) in 500 µl-Schritten. Die Chromatographie wurde bei 4 °C durchgeführt. Der Salzgehalt der Proben wurde durch Leitfähigkeitsmessung geprüft. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford (2.4.8.). Die salzfreien Proteinfractionen wurden vereinigt. Die S100-Fraktion wurde mit 20 % Glycerin (Endkonzentration) versetzt. Die vereinigten Fraktionen wurden à 200 µl aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die P0.5- und Pges-Fraktion wurden kräftig sonifiziert (5mal 30 s auf Eis) und in mit Homogenisierungspuffer equilibrierte Dialyseschläuche gefüllt. Es wurde 4mal gegen 500 ml Homogenisierungspuffer plus 0,1 % Triton X-100 dialysiert (dreimal à 1 h, der letzte Schritt über Nacht, 4 °C-Raum). Salz- und Proteingehalt der Proben wurden wie oben beschrieben bestimmt. Die gereinigten entsalzten Proben wurden als 200 µl Aliquots bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.4.15. Überprüfen der enzymatischen Aktivität der gereinigten Rattenleberextrakte

Die Qualität der enzymatischen Aktivität in den gereinigten Leberextrakten wurde anhand der IP3K-Aktivität überprüft. Dazu wurde für jede Fraktion aus der differentiellen Zentrifugation (2.4.14.3) eine IP3K-Reaktion durchgeführt. Da es Hinweise gibt, dass die IP6K-2 auf subzellulärer Ebene im Zellkern lokalisiert ist [Saiardi *et al.*, 2001<sup>b</sup>], wurde zusätzlich gereinigter Leberextrakt der P2-Fraktion verwendet, um eine IP6-Kinase-Aktivität zu untersuchen.

Reaktionsansatz zur Messung von IP-Kinase-Aktivität (2240 µl Volumen):

100 µg gereinigter Rattenleberextrakt (2.4.14.)  
50 mM KCl  
12,5 mM HEPES  
21 mM TEA  
8 mM MgCl<sub>2</sub>  
5 mM ATP  
4 mM NaF  
2 mM DTT  
1 mM PEP  
0,5 mM PMSF  
0,1 mM Benzamidin  
0,9 µM Pepstatin  
Pyruvatkinase 8 U/ml  
7,7 mM KOH zum Einstellen von pH 7,5

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 µM D-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> bzw. 5 µM InsP<sub>6</sub> gestartet. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 8 min und 30 min (Messung der IP3-Kinase-Aktivität) oder für 15 und 60 min (Messung der IP6-Kinase-Aktivität). Die Reaktionen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mit 10 % eiskalter TCE, 10 mM EDTA und 1,25 mM NaF gestoppt und für die Analyse mit MDD-HPLC aufgearbeitet (2.4.11.3.) und gemessen (Gradient MQIPFLKURZ). Zur Kontrolle, dass die gereinigten Leberextrakte grundsätzlich InsP-frei waren, wurden Aliquots jeder Fraktion noch vor Zugabe von D-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, bzw. InsP<sub>6</sub> mit TCE gefällt, ebenfalls für die MDD-HPLC vorbereitet und dann analysiert.

### 2.4.16. Markierung von fetalen Rattenleberextrakten mit 6<sup>[32P]</sup>-PP-InsP<sub>5</sub>/[<sup>32P</sup>]-InsP<sub>6</sub>

#### 2.4.16.1. Vorversuche zur Markierung von fetalen Rattenleberextrakten mit 6<sup>[32P]</sup>-InsP<sub>6</sub>/6<sup>[32P]</sup>-PP-InsP<sub>5</sub>

Es wurden Vorversuche durchgeführt, um zu testen, ob sich Bestandteile der gereinigten und fraktionierten Rattenleberextrakte mit 6<sup>[32P]</sup>-InsP<sub>6</sub>/6<sup>[32P]</sup>-PP-InsP<sub>5</sub> markieren lassen und ob eine solche vermeintliche Phytylierungsreaktion (beschrieben in 3.5.) eine Abhängigkeit von der Calcium- und Magnesium-Konzentration im Reaktionsansatz zeigt. Die Konzentration von freiem, d.h. nicht komplexiertem (z.B. mit ATP) Magnesium- oder Calcium könnte für die Aktivierung von Enzymen von Bedeutung sein, die eine putative Phytylierung katalysieren. Es sollte auch überprüft werden, ob es sich bei radioaktiv-markierten SDS-Gel-Banden um

Komplexe von  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  mit Kationen, also um reine Artefakte, handeln könnte. Außerdem wurde getestet, welchen Einfluss das Erhitzen einer solchen Probe vor dem Auftrag auf ein SDS-Gel hat und ob Unterschiede zwischen TCE-gefällten Proben und nichtgefällten Proben zu sehen sind. Auf diese Art könnten erste Erkenntnisse über die Art der Bindung des InsP an ein Biomolekül erhalten werden. Ein Erhitzen der Probe führt zum Aufbrechen von Wasserstoff- und Salzbrücken und durch TCE-Behandlung, also starke Protonierung, werden Bindungen geschwächt, die auf ionischen Anziehungen zwischen organischen Phosphaten oder Pyrophosphaten und Bindepartnern beruhen.

Basisreaktionsansatz:

- 82 mM KCl
- 20 mM HEPES
- 1,3 mM EDTA
- 0,6 mM  $\text{MgCl}_2$
- 0,5 mM ATP
- 0,1 mM PEP
- 0,2 U/ml Pyruvatkinase
- pH 7,5

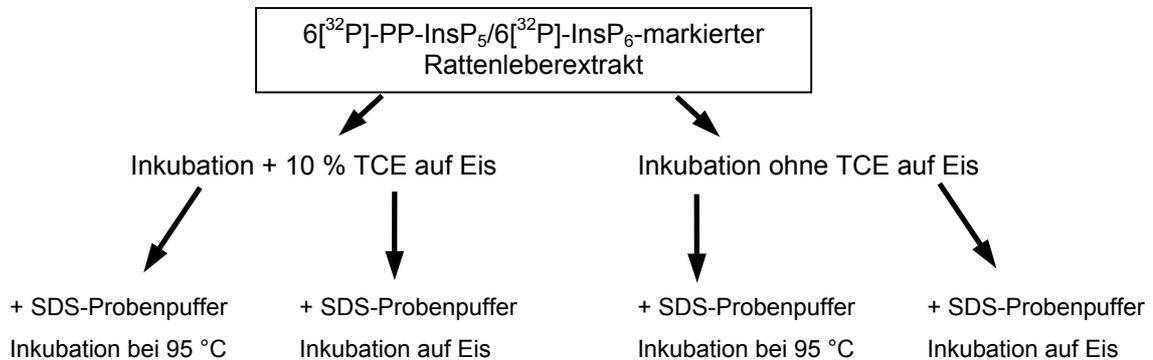
Die gereinigten Rattenleberextrakte (P0.5, P2, P10, P100 und S100) wurden mit HP auf 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Protein eingestellt. Es wurden in 1,5ml-Reaktionsgefäßen vier Reaktionsansätze à 200  $\mu\text{l}$  durchgeführt. Dabei wurden dem Basisreaktionsansatz 0,5 mU IP6K-2, 50  $\mu\text{g}$  gereinigter Rattenleberextrakt (2.4.14.) und 75-120 pmol radioaktives  $6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5/[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6$  (2.4.13.2.), sowie  $\text{MgCl}_2$ - und  $\text{CaCl}_2$ -Lösung in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf „freie“, d.h. nicht durch ATP oder EDTA-komplexierte Kationen:

1. 0,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$
2. 0,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$  + 20  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$
3. 2,0 mM  $\text{Mg}^{2+}$
4. 2,0 mM  $\text{Mg}^{2+}$  + 20  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$

Die Inkubation erfolgte 1 h bei 37 °C auf dem Heizblock. Viermal 25  $\mu\text{l}$  wurden von jedem Ansatz abgenommen und auf vier 1,5ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Jeder Probe wurde eine EDTA-Menge zugesetzt, die 10fach über der freien  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration im Reaktionsansatz lag. Alle Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt. Davon wurden die Hälfte der Proben 1 min bei 95 °C auf dem Heizblock inkubiert, kurz abzentrifugiert und auf ein SDS-Acrylamidgel aufgetragen. Die nichterhitzten Proben wurden ebenfalls auf das Gel aufgetragen. Als Kontrolle diente eine entsprechende Menge Basisreaktionsansatz plus radioaktives  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ , dem einmal 1  $\mu\text{g}$  rekombinante IP6K-2 zugesetzt wurde und einmal nicht.

Um physikalisch assoziierte InsP zu entfernen, wurden Aliquots der  $6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5/[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6$ -markierten gereinigten Rattenleberextrakte mit TCE gewaschen. Dazu wurde Aliquots mit 10 % TCE versetzt und die Proteine für 15 min auf Eis gefällt. Anschließend wurden die Proteine in der Tischzentrifuge für 15 min bei 13 000 UpM und RT sedimentiert. Die Proteinpellets wurden in 25  $\mu\text{l}$  20 mM Tris/HCl, pH 6,1 aufgenommen. Nicht mit TCE behandelte

Aliquots wurden solange auf Eis inkubiert. Alle Aliquots wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt. TCE-behandelte und unbehandelte Aliquots wurden 1 min auf 95 °C erhitzt oder direkt auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Arbeitsschritte sind in Abb. 2.4-4 schematisch dargestellt.



**Abb. 2.4-4: Arbeitsschema zur Vorbereitung der Proben für die SDS-PAGE.**

Es wurden weitere Versuche durchgeführt, bei denen die bei der TCE-Fällung zugesetzte EDTA-Menge und die für die Reaktion eingesetzte Menge radioaktiven InsP<sub>6</sub>/PP-InsP<sub>5</sub> variiert wurden. Außerdem wurde geprüft, ob die IP6K-2 einen Einfluss auf die Markierungsreaktion hat.

### 2.4.16.2. Standardreaktion zur Markierung von gereinigten fetalen Rattenleberextrakten mit 6[<sup>32</sup>P]-InsP<sub>6</sub>/6[<sup>32</sup>P]-PP-InsP<sub>5</sub>

Nach den Ergebnissen der Vorversuche wurde die Reaktion zur Markierung von Rattenleberextrakten mit 6[<sup>32</sup>P]-InsP<sub>6</sub>/6[<sup>32</sup>P]-PP-InsP<sub>5</sub> standardisiert. Es wurden 0,5 mg/ml Rattenleberprotein eingesetzt. Das Reaktions-Volumen betrug 400 µl. Die Magnesium-Konzentration wurde auf 1 mM „freies“ Mg<sup>2+</sup> und Calcium wurde auf 20 µM „freies“ Ca<sup>2+</sup> eingestellt. Die Konzentrationen von ATP, PEP, Pyruvatkinase, KOH, Glycerin und Triton X-100 sind abhängig von der eingesetzten Proteinsuspension und der Menge an radioaktivem InsP<sub>6</sub>/PP-InsP<sub>5</sub>.

Standardreaktionsansatz:

- 0,5 mg/ml gereinigter Rattenleberextrakt (2.4.14.)
- 97 mM KCl
- 25 mM HEPES
- 1,3 mM EDTA
- 2,9 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0,7 mM ATP
- 0,1 mM PEP
- 20 µM CaCl<sub>2</sub>
- 0,5 U/ml Pyruvatkinase
- 0-3 % Glycerin
- 0-0,08 % Triton X-100
- 0,31 -1,3 µM 6[<sup>32</sup>P]-InsP<sub>6</sub>/6[<sup>32</sup>P]-PP-InsP<sub>5</sub>
- 0,8 mM KOH zum Einstellen von pH 7,5

Die Inkubation erfolgte 1,5 h bei 37 °C auf dem Heizblock.

### **2.4.16.3. Vorbereiten von $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ -markiertem Rattenleberextrakt für die Analyse durch SDS-PAGE**

Die Proteinfällung wurde mit 10 % TCE-Endkonzentration und 20 mM EDTA (20fach über Magnesium-Konzentration) für 15 min auf Eis durchgeführt. Die gefällten Proteine wurden in der Tischzentrifuge für 15 min bei 13 000 UpM und Raumtemperatur sedimentiert und das Pellet dann in 20 mM Tris/HCl, pH 6,1 aufgenommen. Dabei wurde das Aufnahmevermögen so gewählt, dass etwa 100 µg Protein pro Geltasche aufgetragen werden konnten. Es wurde eine entsprechende Menge SDS-Probenpuffer zugegeben und die Proben bis zum Umschlagspunkt mit 1 M TEA versetzt. Dabei wurden dem Probenpuffer 8 mM DTT immer frisch zugesetzt. Da sich die TCE-gefällten Proteine nur sehr schwer resuspendieren ließen, wurden die Proben 5 min ins Ultraschallbad gestellt. Anschließend wurde 1 min bei 95 °C auf dem Heizblock inkubiert. Die für die Analyse verwendeten Gele waren 10%ige Acrylamidgele mit einer Dicke von 1,5 mm. Es wurden 20er-, 15er- und 10er-Kämme mit einer Stärke von 1,5 mm verwendet.

### **2.4.17. Chemische, biochemische und physikalische Eigenschaften der $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ -Markierung von Rattenleberextrakten**

#### **2.4.17.1. Zeit- und Temperaturabhängigkeit der Markierung von Rattenleberextrakten mit $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$**

Es wurde angenommen, dass es sich bei der putativen Phytylierung (3.5.) um eine enzymatische Reaktion handelt. Demnach sollte diese Reaktion zeit- und temperaturabhängig sein und sich über eine Veränderung der Stärke des radioaktiven Signals in den SDS-Gel-Banden über die Zeit bzw. in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur nachweisen lassen. Für diesen Test wurde eine Standardreaktion (2.4.16.2.) mit P100-Extrakt und nichtfraktioniertem Gesamtextrakt durchgeführt. Aliquots wurden unterschiedlich lange bei 37 °C auf dem Heizblock inkubiert. Die Inkubationszeit betrug 0 min, 5 min, 30 min und 90 min. Zusätzlich wurde ein Aliquot 90 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben mit 10 % TCE gefällt. Die Vorbereitung der Proben für die Analyse durch SDS-PAGE erfolgte wie unter 2.4.16.3. beschrieben. Das fertige, gefärbte Gel wurde auf Filterpapier vakuumgetrocknet. Von dem getrockneten Gel wurde durch Auflegen eines Röntgenfilms oder Phosphoimagerscreens ein Autoradiogramm erstellt.

### **2.4.17.2. Säurestabilität der radioaktiver Signale in $6[^{32}P]$ -InsP<sub>6</sub>/ $6[^{32}P]$ -PP-InsP<sub>5</sub>-markierten Rattenleberextrakten**

Es sollte getestet werden, wie stabil die vermeintliche Phytylierung (3.5.) ist. Unter sauren Inkubationsbedingungen werden Inositolphosphate protoniert und sollten sich bei rein physikalischer Bindung leicht von der makromolekularen Matrix ablösen. Gleichzeitig wird erwartet, dass PP-InsP<sub>5</sub> unter Umständen zu InsP<sub>6</sub> hydrolysiert. Es wurden Aliquots der P0.5-, P2-, P10-, P100- und S100-Fraktion unter Standardbedingungen (2.4.16.2.) inkubiert. Jeweils ein halbes Probenvolumen wurde nach Standardreaktionen mit 10 % TCE versetzt und 20 min bei 95 °C inkubiert. Dann wurden die Proteine wie üblich auf Eis gefällt. Die andere Probenhälfte wurde sofort auf Eis mit 10 % TCE gefällt. Die Vorbereitung der Proben für die Analyse durch SDS-PAGE erfolgte wie unter 2.4.16.3. beschrieben. Das fertige, gefärbte Gel wurde auf Filterpapier vakuumgetrocknet und ein Phosphoimagerscreen aufgelegt.

Die Überstände aus der Proteinfällung wurden wie üblich für den Auftrag auf die HPLC vorbereitet und dann analysiert (2.4.11.3.).

### **2.4.17.3. Stabilität der radioaktiver Signale in $6[^{32}P]$ -InsP<sub>6</sub>/ $6[^{32}P]$ -PP-InsP<sub>5</sub>-markierten Rattenleberextrakten gegenüber DNase, Proteasen und Alkali**

Grundsätzlich ist es möglich, dass eine Phytylierungsreaktion (3.5.) außer an Proteinen auch an Nukleinsäuren (DNA, RNA), an Zuckerresten (z.B. Glykoproteine) oder Lipiden erfolgen könnte. Um die zellulären Zielmoleküle für eine Bindung hochphosphorylierter InsP eingrenzen zu können, wurden verschiedene Versuche durchgeführt, bei denen diese Zielmoleküle zerstört wurden.

#### Test auf DNA als Zielmolekül für die Bindung von InsP<sub>6</sub>/PPInsP<sub>5</sub>

Bevor dieser Test durchgeführt wurde, wurde der DNA-Gehalt der gereinigten Proteinfractionen bestimmt. Dazu wurden 30-40 µl Proteinsuspension mit DNA-Probenpuffer versetzt und auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und densitometrisch auf dem UV-Tisch quantifiziert.

Folgende DNA-Konzentrationen wurden ermittelt:

P0.5:	0,2 µg/µl, entspricht	50 ng/µg Protein
P2:	0,01 µg/µl	5 ng/µg Protein
P10:	0,02 µg/µl	12 ng/µg Protein
P100:	0,2 µg/µl	44 ng/µg Protein
S100:	keine DNA detektierbar	

10fach DNase-I-Inkubationspuffer: 400 mM Tris/HCl, pH 7,5  
60 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM CaCl<sub>2</sub>

Es wurden Standardreaktionen (2.4.16.2.) mit P100-Extrakt durchgeführt. Je 100 µg radioaktiv-markierter P100-Extrakt wurden mit DNase-I-Inkubationspuffer und 5 U DNase I (Stratagene) versetzt und 30 min bei 37 °C und 10 min bei 45 °C auf dem Heizblock inkubiert. Anschließend wurde eine TCE-Fällung durchgeführt. Die Vorbereitung der Proben für die Analyse durch SDS-PAGE erfolgte wie unter 2.4.16.3. beschrieben.

### Test auf Protein als Zielmolekül für die Bindung von InsP<sub>6</sub>/PP-InsP<sub>5</sub>

10fach Pronase-Inkubationspuffer: 1 M Tris/HCl, pH 7,5  
5 % SDS (w/v)

100 µg 6[<sup>32</sup>P]-InsP<sub>6</sub>/6[<sup>32</sup>P]-PP-InsP<sub>5</sub>-markierter P100-Extrakt (2.4.16.2.) wurden mit Pronase-Inkubationspuffer und 1 mg/ml Pronase (Roche) versetzt und 30 min bei 37 °C auf dem Heizblock inkubiert. Anschließend wurde eine TCE-Fällung durchgeführt. Die Vorbereitung der Proben für die Analyse durch SDS-PAGE erfolgte wie unter 2.4.16.3. beschrieben.

### Alkalische Hydrolyse von 6[<sup>32</sup>P]-InsP<sub>6</sub>/6[<sup>32</sup>P]-PP-InsP<sub>5</sub>-markiertem Rattenleberextrakt

100 µg 6[<sup>32</sup>P]-InsP<sub>6</sub>/6[<sup>32</sup>P]-PP-InsP<sub>5</sub>-markierter gereinigter P100-Extrakt (2.4.16.2.) wurden mit 0,2 M NaOH und 0,1 % SDS versetzt und 30 min bei 95 °C auf dem Heizblock inkubiert. Unter diesen Bedingungen sollten Phosphodiesterbindungen, wie sie bei einer putativen Phytylierung aufträten (3.5.) hydrolysieren und so kovalent gebundene InsP aus dem Proteinmaterial freigesetzt werden. Nach der alkalischen Hydrolyse wurde eine TCE-Fällung mit 0,8 M TCE durchgeführt. Die Vorbereitung der Proben für die Analyse durch SDS-PAGE erfolgte wie unter 2.4.16.3. beschrieben. Das fertige, gefärbte SDS-Gel wurde auf Filterpapier vakuumgetrocknet. Auf das getrockneten Gel wurde ein Phosphoimagerscreen aufgelegt.

Da die Ergebnisse auf eine Markierung von Proteinen durch 6[<sup>32</sup>P]-InsP<sub>6</sub>/6[<sup>32</sup>P]-PP-InsP<sub>5</sub> hindeuteten, wurde dem enzymatischen Nachweis von Lipiden und Zuckerresten nicht weiter nachgegangen.

### **2.4.18. Markierung von Proteinextrakt aus fetalen Rattenlebern mit 5β[<sup>32</sup>P]-PP-InsP<sub>5</sub>**

Es sollte untersucht werden, ob die beobachtete putative Phytylierung (3.5.) eventuell durch Phosphorylierungen mit vom Inositolphosphatring abgespaltene Phosphatgruppen entsteht. Dazu wurden Markierungsversuche mit 5β[<sup>32</sup>P]-PP-InsP<sub>5</sub> durchgeführt, das über ein radioaktives Phosphat in relativ labiler β-Position verfügt (2.4.13.3.). Gleichzeitig könnten durch die-

sen Versuch auch Hinweise erzielt werden, ob eine putative Phytylierung durch Abspalten der Pyrophosphatgruppe im PP-InsP<sub>5</sub> und Übertragen des InsP-Restes auf das Zielmolekül funktioniert.

Reaktionsansatz: 100-200 µg gereinigter nicht fraktionierter fetaler Rattenleberextrakt bzw. P100-Extrakt (2.4.14.)  
10 mM HEPES, pH 7,5  
100 mM KCl  
0,2 mM EDTA  
1,3 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM NaF  
0,5 mM PMSF  
1 µM Pepstatin

Einigen Reaktionsansätzen wurden 5 mU/ml IP6K-2 zugesetzt.

Die Reaktion wurde gestartet mit:

0,5 µM 5β[ <sup>32</sup> P]-PP-InsP <sub>5</sub>	(spez. Aktivität: 500 nCi/nmol)
5 µM 5β[ <sup>32</sup> P]-PP-InsP <sub>5</sub>	(spez. Aktivität: 25 nCi/nmol)
5 µM 5β[ <sup>32</sup> P]-PP-InsP <sub>5</sub>	(spez. Aktivität: 50 nCi/nmol)
5 µM γ-[ <sup>32</sup> P]-ATP	(spez. Aktivität: 30 nCi/nmol)
5 µM γ-[ <sup>32</sup> P]-ATP	(spez. Aktivität: 370 nCi/nmol)
5 µM γ-[ <sup>32</sup> P]-ATP	(spez. Aktivität: 1 µCi/nmol)

Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 10 min, 20 min und 1 h. Die Proben wurden wie beschrieben (2.4.16.3.) für die Analyse durch SDS-PAGE vorbereitet.

### 2.4.19. Identifizierung und Prüfung potentieller Zielproteine für eine Bindung von hochphosphorylierten Inositolphosphaten

#### 2.4.19.1. Proteolyse von 6[<sup>32</sup>P]-InsP<sub>6</sub>/6[<sup>32</sup>P]-PP-InsP<sub>5</sub>-markiertem Rattenleberextrakten

Mit Hilfe eines limitierten tryptischen Verdaus von 6[<sup>32</sup>P]-InsP<sub>6</sub>/6[<sup>32</sup>P]-PP-InsP<sub>5</sub>-markiertem Rattenleberextrakt sollte versucht werden, in Acrylamidgelen nachweisbare radioaktive Peptidbanden zu erzeugen. Diese Banden könnten dann massenspektrometrisch analysiert werden.

Trypsin-Reaktionsansatz: 1 mg/ml 6[<sup>32</sup>P]-InsP<sub>6</sub>/6[<sup>32</sup>P]-PP-InsP<sub>5</sub>-markierter P100-Extrakt (2.4.16.2.)  
50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,8  
0,05 % SDS (w/v)  
0,1 mg/ml Trypsin (*modified sequencing grade*, Roche)

Inkubation bei 37 °C für 2 min, 5 min und 15 min.

Zu den angegebenen Zeiten wurden die Proben sofort TCE gefällt und wie beschrieben (2.4.16.3.) für die Analyse durch SDS-PAGE vorbereitet. Das fertige, gefärbte Gel wurde vakuumgetrocknet und danach mit einem Phosphoimagerscreen exponiert.

Zur Entfernung von möglicherweise physikalisch assoziierten InsP wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, wobei der  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ -markierte P100-Extrakt vor der Proteolyse mit 10 % TCE gefällt wurde. Das Pellet wurde in 60 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,8 resuspendiert und dann direkt für die Reaktion eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 15 min und 60 min.

Da sich durch die oben beschriebene Behandlung der Proben mit Trypsin keine neuen, im SDS-Gel nachweisbaren radioaktiven Abbaubanden generieren ließen und sich eine hochmolekulare radioaktive Bande als weitgehend stabil erwies, wurde der Rattenleberextrakt exzessiv mit Trypsin verdaut. Auf diese Art sollten nicht-markierte Proteine entfernt werden, die im SDS-Gel auf gleicher Molekulargewichtshöhe wie das radioaktiv-markierte Protein läuft. Diese proteolytisch „gereinigte“ Bande sollte dann massenspektrometrisch untersucht werden. Vermutlich wurden durch die Behandlung mit Trypsin aber niedermolekulare InsP-Peptid-Konjugate generiert, die sich nicht mit TCE fällen ließen und daher nach der TCE-Fällung im Überstand verblieben. Diese InsP-Peptid-Konjugate sollten über eine HPLC-Chromatographie isoliert und mit anschließender massenspektrometrischer Analyse der gesammelten HPLC-Fractionen identifiziert werden. Die Detektion sollte über das assoziierte radioaktive InsP erfolgen. Es wurden 1 mg  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ -markierter Rattenleberextrakt der P100-Fraktion für 2,5 h bei 37 °C mit Trypsin verdaut.

Eine Hälfte der proteolysierten Probe wurden ohne vorherige TCE-Fällung mit SDS-Probenpuffer versetzt und auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Geltasche wurde so groß gegossen, dass die gesamte Probe aufgetragen werden konnte. Außerdem wurden 350 µg nicht mit Trypsin behandelte  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ -markierter P100-Extrakt auf ein zweites Gel aufgetragen. Die fertigen Gele wurden gefärbt und zerteilt. Ein Teil jedes Gels wurde vakuumgetrocknet. Über ein Autoradiogramm der getrockneten Gelhälften wurden die radioaktiven Banden ermittelt und aus den frischen Gelen ausgeschnitten. Die ausgeschnittenen Banden wurden bis zur massenspektrometrischen Analyse bei -80°C gelagert.

Die andere Hälfte der proteolysierten Probe wurde mit der HPLC ohne C-Reagenz fraktioniert (Gradient IPFLKURZ7-8, mit verlängerter 5% Puffer B Waschphase). In 2ml-Eppendorf-Gefäßen wurden alle 30 s Fraktionen à 250 µl gesammelt. Davon wurden je 100 µl abgenommen und die Radioaktivität der 100 µl Aliquots im Flüssig-Scintillations-Zähler bestimmt. Die Proben innerhalb der so ermittelten radioaktiven *Peaks* wurden mit Tris-Base neutralisiert und bis zur massenspektrometrischen Analyse bei -80 °C eingefroren.

### **2.4.19.2. Massenspektrometrie**

Die massenspektrometrischen Analysen wurden von der Dipl.-Chemikerin Gudrun Franke der Gruppe von Prof. Dr. Helmut E. Meyer, Medizinisches Proteom-Center (MPC) Ruhr-Universität Bochum durchgeführt. Die ausgeschnittenen Gelbanden wurden vor Ort mit Trypsin verdaut und die Peptide über eine C18-Reversed Phase-HPLC getrennt. Die Peptide wurden dann mit Elektrospray-Ionisation-Ionenfallen-Massenspektrometrie (ESI-Ionenfallen-MS) analysiert. Es mussten mindestens drei Peptide eines Proteins mit guten Spektren zur Identifizierung gefunden werden. Der Sequenzvergleich der gefundenen Peptide erfolgte via SEQUEST gegen NCBI *mouserat*.

### **2.4.19.3. Bindung von hochphosphorylierten Inositolphosphaten an Ferritin**

Die Bindung von hochphosphorylierten InsP an Ferritin sollte *in vitro* nachgewiesen werden. Es wurden Standardreaktionen (2.4.16.2.) mit je 400 µg Protein durchgeführt:

1. Apoferritin, Pferdemilz (Calbiochem)
2. HoloFerritin, Pferdemilz, cadmiumfrei, chromatographisch gereinigt (Calbiochem)
3. gereinigter Rattenleberextrakt der P100-Fraktion
4. Rattenlebergesamtextrakt
5. Apoferritin + P100-Fraktion
6. HoloFerritin + P100-Fraktion

Die Proteine wurden wie beschrieben für die Analyse durch SDS-PAGE vorbereitet (2.4.16.3.) und auf ein 10%iges Acrylamidgel aufgetragen. Das Gel wurde gefärbt, entfärbt, danach vakuumgetrocknet und 1-22 h mit einem Phosphoimagerscreen exponiert.

### **2.4.19.4. Zeitabhängigkeit der Markierung von HoloFerritin mit $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$**

Es wurden Standardreaktionen (2.4.16.2.) mit  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  und je 400 µg HoloFerritin durchgeführt, Aliquots nach 10 min und 2 h genommen und diese nach entsprechender Behandlung (2.4.16.3.) auf ein 10%iges Acrylamidgel aufgetragen. Das Gel wurde gefärbt, entfärbt, danach vakuumgetrocknet und 4 h mit einem Phosphoimagerscreen exponiert. Die Radioaktivität der Banden wurde mittels eines Intensitätsscans (AIDA 2.31) bestimmt und verglichen.

### **2.4.19.5. Einfluss des Eisen-Chelators L1 auf die Markierung von Holo ferritin mit $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$**

Der Eisen-Chelator L1 (1,2-Dimethyl-3-hydroxy-4-pyridon, Siegfried Chemie) bindet bei neutralem pH-Wert Eisen mit einer Stöchiometrie von 3:1 (Hider & Liu, 2003). Durch Zusatz von L1 sollte geprüft werden, ob die Löslichkeit von Eisen einen Einfluss auf den Grad des an Ferritin gebundenen  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  nimmt. Der Chelator L1 wurde Standardreaktionen (2.4.16.2.) mit  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  und je 400  $\mu\text{g}$  Holo ferritin kurz vor Reaktionsstart zugesetzt oder eine entsprechend Menge Holo ferritin wurde für 48 h bei 4 °C mit L1 vorinkubiert. Der zugesetzte Chelator L1 (1,2 mM) sollte etwa 1/5 des im Holo ferritin enthaltenen Eisens (2 mM) komplexieren. Als Kontrolle wurden 2 mM Eisen(II)sulfat Heptahydrat unter Standardbedingungen mit  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ -Lsg. ohne oder unter Zusatz von 1,2 mM L1 inkubiert. Es wurden Aliquots nach 10 min und 2 h genommen und nach entsprechender Behandlung (2.4.16.3.) auf ein 10%iges Acrylamidgel aufgetragen. Das Gel wurde gefärbt, entfärbt, danach vakuumgetrocknet und 4 h mit einem Phosphoimagerscreen exponiert. Die Radioaktivität der Banden wurde mittels eines Intensitätsscans (AIDA 2.31) bestimmt und verglichen.

### **2.4.19.6. Bindung von hochphosphorylierten Inositolphosphaten an ribosomale Proteine**

Ribosomale Proteine wurden von Prof. Dr. J. Kruppa vom Institut für Biochemie und Molekularbiologie II der Universität Hamburg zur Verfügung gestellt. Die Proteine wurden aus  $1 \times 10^8$  HeLa-Zellen gewonnen. Dafür wurden die Zellen in RSB-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,4; 10 mM KCl; 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) suspendiert und nach 5 min mit 1 % Triton X-100 behandelt. Die Kerne wurden abzentrifugiert und das Zelllysate auf ein Kissen von 8 ml 2 M STKM (2 M Sucrose; 50 mM Tris/HCl, pH 7,4; 25 mM KCl; 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ) geladen. Es wurde für 16,5 h bei 40 000 UpM (60-Ti-Rotor) und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500  $\mu\text{l}$  RSB-Puffer resuspendiert und bei -20 °C gelagert. Folgende Standardreaktionen (2.4.16.2.) wurden mit je 400  $\mu\text{g}$  Protein durchgeführt: (1) Inkubation von ribosomalen Proteinen mit  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ , (2) Inkubation von ribosomalen Proteinen zusammen mit der gleichen Menge P100-Extrakt und  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  und (3) Inkubation von ribosomalen Proteinen zusammen mit  $\gamma\text{-}[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ . Hiervon wurden jeweils Aliquots nach 10 min und 2 h genommen und wie beschrieben (2.4.16.3.) für den Auftrag auf ein SDS-Gel vorbereitet.

### **2.4.20. Extraktion von Inositolphosphaten aus Ferritin**

Da angenommen wurde, dass eine Bindung von InsP und Ferritin entweder spezifisch oder sehr stark, aber unspezifisch erfolgt, wurden verschiedene Extraktionsmethoden angewandt. Die Extraktion erfolgte durch Proteolyse, durch alkalische oder saure Hydrolyse oder mit Triton X-100 im wässrigen pH-neutralen Milieu.

#### **2.4.20.1. Proteolyse von Ferritin**

30 mg Apoferritin  
100 mM Tris/HCl, pH 7,5  
0,5 % SDS  
10 mM CaCl<sub>2</sub>  
1,6 mg/ml Pronase (Roche)

Das Reaktionsvolumen betrug 600 µl. Die Inkubation erfolgte für 18 h bei 40 °C. Anschließend wurde der Proteolysegrad des Ferritins durch Analyse von Aliquots durch SDS-PAGE getestet. Da die Proteolyse unvollständig war, wurden erneut 1,7 mg/ml frische Pronase zugegeben. Es wurde erneut 1 h bei 50 °C inkubiert. Danach wurde der Reaktionsansatz für die Analyse mit MDD-HPLC aufgearbeitet (2.4.22.).

#### **2.4.20.2. Alkalische Hydrolyse von Ferritin zur Extraktion von Inositolphosphaten**

30 mg Apoferritin, bzw. 10 mg Holo ferritin wurden mit 0,8 M NaOH versetzt und 1–2,5 h auf 95 °C erhitzt. Das Reaktionsvolumen betrug 500 µl. Danach wurde der Reaktionsansatz für die Analyse mit MDD-HPLC aufgearbeitet (2.4.22.).

#### **2.4.20.3. Saure Extraktion von Inositolphosphaten aus Ferritin**

5 mg Holo ferritin  
10 % TCE  
7 mM L1

Das Reaktionsvolumen betrug 500 µl. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur (21 °C). Es wurden 150 µl Aliquots nach 1 h, 5 h und 200 µl nach 48 h entnommen und für die Analyse mit MDD-HPLC aufgearbeitet (2.4.22.).

#### **2.4.20.4. Extraktion von Inositolphosphaten aus Ferritin mit Triton X-100**

5 mg Holo ferritin  
0,2 % Triton X-100 (v/v)  
7 mM L1

Das Reaktionsvolumen betrug 500 µl. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur (21°C). Es wurden 150 µl Aliquots nach 1 h, 5 h und 200 µl nach 48 h entnommen und für die Analyse mit der MDD-HPLC (2.4.22.) aufgearbeitet.

### **2.4.21. Extraktion von Inositolphosphaten aus ribosomalen Proteinen**

#### **2.4.21.1. *Alkalische Hydrolyse von ribosomalen Proteinen zur Extraktion von Inositolphosphaten***

2 mg ribosomale Proteine wurden mit 0,8 M NaOH versetzt und 1 h auf 95 °C erhitzt. Das Reaktionsvolumen betrug 500 µl. Danach wurde der Reaktionsansatz für die Analyse mit MDD-HPLC aufgearbeitet (2.4.22.).

#### **2.4.21.2. *Saure Extraktion von Inositolphosphaten aus ribosomalen Proteinen***

2 mg ribosomale Proteine  
10 % TCE

Das Reaktionsvolumen betrug 150 µl. Die Inkubation erfolgte für 48 h bei Raumtemperatur (21°C). Die Aufarbeitung der Proben für die MDD-HPLC-Analyse erfolgte nach (2.4.22.).

### **2.4.22. Aufarbeitung der Ferritin- und Ribosomen-Proben für die Analyse mit MDD-HPLC**

Die Proteine wurden mit TCE und mit 15 mM (Ferritin) bzw. 2 mM (Ribosomen) EDTA für 15 min auf Eis gefällt (10 % Endkonzentration bzw. Überschuss gegen NaOH), und dann die gefällten Proteine in der Tischzentrifuge für 10 min bei 13 000 Upm und RT sedimentiert. Die Überstände wurden dreimal mit 2 ml wassergesättigtem Diethylether für je 2 min extrahiert. Anschließend wurde der pH-Wert der Proben mit 1 M TEA auf 6-7 eingestellt. Die Proben wurden in der Vakuumzentrifuge auf ein Volumen von < 1 ml eingeengt und danach filtriert (0,2 µm-Filter). Es wurde jeweils die ganze Probe mit MDD-HPLC analysiert (Gradient MQIPFLKURZ).

## **2.5. Zellbiologische Methoden**

Zellbiologischen Arbeiten wurden an der sterilen Werkbank durchgeführt. Alle verwendete Lösungen und Geräte wurden entweder steril vom Hersteller bezogen oder bei 121 °C und 1,2 bar für 35 min autoklaviert. Oberflächen wurden mit 80%igem Ethanol desinfiziert.

### 2.5.1. Zelllinien

NRK52E-Zellen („*Normal Rat Kidney*“, Cell Lines Service, Heidelberg), abgeleitet von epithelialen Rattenierenzellen, adhären

H1299-Zellen (ATCC) humane Adenokarzinomzellen der Lunge, adhären

### 2.5.2. Zellkultur: Medien und Lösungen

PBS (Phosphate-Buffered Saline) Puffer: 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
140 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
pH 7,3 (mit HCl eingestellt)

#### Kulturmedium für NRK52E-Zellen:

Dulbecco's *Modified Eagle Medium* (D-MEM), mit 4500 mg/l D-Glukose und L-Glutamin. Zugewetzt wurden 10% (v/v) fetales Kälberserum (Invitrogen) und 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin (Invitrogen).

#### Kulturmedium für H1299-Zellen:

D-MEM, mit 4500 mg/l D-Glukose und GlutaMAX™, ohne Natrium-Pyruvat (Invitrogen). Es wurden 10% (v/v) fetales Kälberserum (Invitrogen) und 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin (Invitrogen) zugewetzt.

#### Weitere Reagenzien:

OptiMEM I mit GlutaMAX™ (Invitrogen)

Trypsin-EDTA (Invitrogen)

### 2.5.3. Kontinuierliche Kultivierung von NRK52E- und H1299-Zellen

NRK52E- und H1299-Zellkulturen wurden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> gezogen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in den entsprechenden Medien in 250ml-Gewebekulturflaschen. Nach 3 Tage waren die Zellen vollständig konfluent und wurden passagiert. Alle verwendeten Lösungen wurden vorher auf 37 °C vorgewärmt. Das verbrauchte Medium wurde abgesaugt und der Zellrasen mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 3-5 min mit 1 ml Trypsin-EDTA behandelt, bis sie sich von der Flaschenoberfläche ablösten, und dann in 9 ml frischem Medium aufgenommen. Jeweils 3 ml der Zellsuspension wurden in eine neue Gewebekulturflasche überführt und mit Medium

auf 15 ml aufgefüllt. Bei Bedarf wurde die verbleibende Suspension für die Aussaat in Kammerdeckgläser verwendet.

### 2.5.4. Aussaat von Zellen in 4-Kammerdeckgläser

Es wurden  $4 \times 10^4$  Zellen in etwa 400  $\mu$ l Zellsuspension in 4-Kammerdeckgläser ausgesät und im Inkubator 24 h kultiviert.

### 2.5.5. Transiente Transfektion von NRK52E- und H1299-Zellen

Metafectene<sup>TM</sup> (Biontex) ist ein polykationisches Transfektionsreagenz, welches in Kombination mit einem neutralen Kolipid in liposomaler Form vorliegt. FuGENE 6 *Transfection Reagent* (Roche) ist eine Mischung verschiedener Lipide und anderer Komponenten, die in nicht-liposomaler Form vorliegen.

<u>Transfektion mit Metafectene:</u>	<u>Lösung A</u>	<u>Lösung B</u>
	50 $\mu$ l OptiMEM I, 37°C	50 $\mu$ l OptiMEM I, 37°C
	1 $\mu$ g DNA	6 $\mu$ l Metafectene

Lösung B wurde in Lösung A pipettiert und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Der Ansatz wurde 20 min bei RT inkubiert. Danach wurden je 25  $\mu$ l auf die Kammern im 4-Kammerdeckglas gegeben. Die Zellen wurden 24 h im Brutschrank bei 37 °C kultiviert.

#### Transfektion mit FuGENE

6  $\mu$ l Transfektionsreagenz und 4  $\mu$ g DNA wurden in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu$ l (aufgefüllt mit OptiMEM I) zusammenpipettiert und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Jeweils 50  $\mu$ l des Transfektionsansatzes wurden pro Kammer eingesetzt. Die Zellen wurden 24–72 h im Brutschrank bei 37 °C kultiviert.

### 2.5.6. Fixieren und Permeabilisieren von Zellen in Kammerdeckgläsern

Jede Kammer wurden dreimal mit 500  $\mu$ l 37°C-warmen PBS gewaschen. Danach wurden je 250  $\mu$ l eiskalter Methanol zugesetzt und die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen und mit je 250  $\mu$ l einer 5%igen BSA /PBS (w/v) geblockt. Nach einem erneuten Waschschrift mit dreimal 500  $\mu$ l PBS waren die Zellen für eine Markierung mit Antikörpern und DAPI-Färbung vorbereitet.

### 2.5.7. Nachweis der HsIP6K-2 durch Immunfluoreszenzmarkierung

#### Verwendete primäre Antikörper:

Kaninchen anti-Ratte-IP6K-2 IgG (Dianova), eingesetzte Konzentration 1:500 in 0,75 % BSA/PBS (w/v)

Maus anti-SC-35 igG<sub>1</sub> (PharMingen), eingesetzte Konzentration 1:500 in 0,75 % BSA/PBS (w/v)

#### Verwendete sekundäre Antikörper:

Ziege anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), eingesetzte Konzentration 1:2000 in 0,75 % BSA/PBS (w/v), Exzitation 495 nm, Emission 518 nm

Ziege anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor 568 (Molecular Probes), eingesetzte Konzentration 1:2000 in 0,75 % BSA/PBS (w/v), Exzitation: 578 nm, Emission: 603 nm

Ziege anti-Maus IgG Alexa Fluor 568 (Molecular Probes), eingesetzte Konzentration 1:2000 in 0,75 % BSA/PBS (w/v), Exzitation: 578 nm, Emission: 603 nm

Die Zellen wurden pro Kammer mit 250 µl Lösung des primären Antikörpers für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde dreimal mit 500 µl PBS gewaschen (zwischen- durch je 5 min in PBS inkubiert). Schließlich wurden je 250 µl Lösung des entsprechenden sekundären Antikörpers zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert. Es wurde erneut mit PBS gewaschen (s.o.). Zur Auswertung oder Aufbewahrung (bei 4 °C) wurden die Zellen mit 250 µl PBS pro Kammer überschichtet.

### 2.5.8. Färben der Zellkerne mit DAPI

DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid, Roche) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der spezifisch an AT-reiche Regionen der dsDNA bindet. Bei UV-Anregung (340 nm) fluoresziert er mit einer Wellenlänge von 488 nm [Hennig, 1995: S. 116]. Für die DAPI-Färbung wurden 250 µl DAPI (10 µg/ml in PBS) zu PBS-gewaschenen Zellen (2.5.6., 2.5.7) in jede Kammer gegeben. Dann wurde für 10 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS wurde jede Kammer mit 250 µl PBS überschichtet. Die Präparate konnten so am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet oder bei 4 °C aufbewahrt werden.

### 2.5.9. Präparation von Zelllysaten aus H1299-Zellen

H1299-Zellen wurden in 24-Loch-Gewebekulturplatten ausgesät und bis zur 70%igen Konfluenz kultiviert. Die Hälfte der Kulturen wurde mit dem EGFP-IP6K-2 Fusionsprotein transfi-

ziert (2.5.5.). Die Zellen wurden für 4 Tage bei 37 °C weiterkultiviert. Danach wurden 6 Kulturvertiefungen mit transfizierten Zellen und die gleiche Anzahl mit untransfizierten Zellen für einen *Western-Blot* aufgearbeitet. Dafür wurde zuerst dreimal mit 37°C-warmen PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschen wurden alle Kulturvertiefungen mit 500 µl PBS überschichtet und jeweils 4 zusätzlich mit 8 µg/ml Digitonin versetzt. Digitonin löst erst die Plasmamembran und dann die Kernmembran der Zellen auf. Nach etwa 5 min Inkubation bei RT waren die Membranen zerstört (Kontrolle mit Binokular) und die Reste hafteten noch auf der Platte. Die Überstände wurden in 1,5ml-Reaktionsgefäße pipettiert und die darin enthaltenen Proteine durch Zugabe von 250 µl 30 % TCE für 10 min auf Eis gefällt. Der Zelldebris in den Kulturvertiefungen wurden ebenfalls mit 500 µl TCE überschichtet und für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden der Zelldebris gründlich mit einem Zellschaber von der Plattenoberfläche gelöst und in 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt. Alle Proben wurden in der Tischzentrifuge für 10 min bei 13 000 UpM und 4 °C pelletiert. Jeweils zwei gleichbehandelte, gleichartige Proben wurden vereinigt und die Pellets in 24 µl Solubilisierungspuffer resuspendiert, danach mit Probenpuffer versetzt und für 6 min auf 95 °C erhitzt. Danach wurden die Proben auf ein 10 %iges Acrylamidgel aufgetragen und nach der Gelelektrophorese geblottet (2.4.2.). Der Nachweis von IP6K-2 erfolgte mit dem IP6K-Antikörper.

### 2.6. Fluoreszenzmikroskopie

Die Präparate wurden am inversen Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 25 CFL; Zeiss) ausgewertet. Mikroskopiert wurde bei 1000facher optischer Vergrößerung (100x Ölimmersions-Objektiv, 10x Okular). Für den Nachweis spezifischer Fluoreszenz wurden folgende Filteraufsätze verwendet:

FITC-Filter (Exzitationsfilter 450-490, Strahlteiler FT-510, Emissionsfilter LP 520)

DAPI-Filter (Exzitationsfilter G365, Strahlteiler FT-395, Emissionsfilter LP 420)

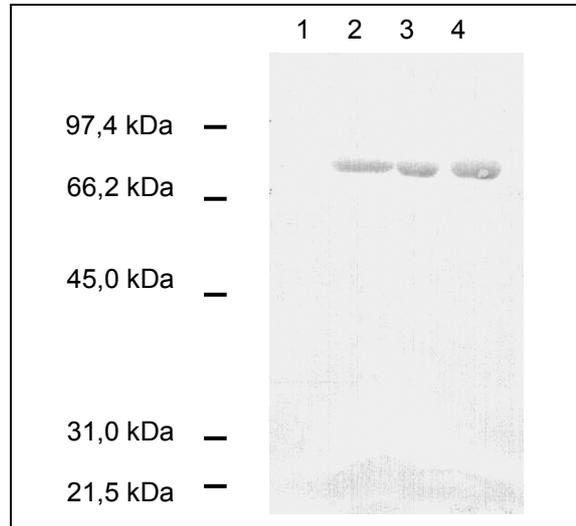
Rhodamin-Filter (Exzitationsfilter BP 546 Strahlteiler FT 580, Emissionsfilter LP 590)

Die Bilddokumentation erfolgte durch eine digitale Kamera (Kappa DX30; Kappa). Die Aufnahmen wurden mit der Software Kappa ImageBase erstellt und mit Micrografx Picture Publisher 8 additive Überlagerungsbilder erzeugt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Charakterisierung enzymatischer Eigenschaften der humanen IP6K-2

In dieser Arbeit wurde ein rekombinant hergestelltes Fusionsprotein aus der Volllänge der humanen Inositolhexakisphosphat-Kinase 2 (HsIP6K-2) mit N-terminalem Glutathion-S-Transferase (GST) Anhang verwendet.

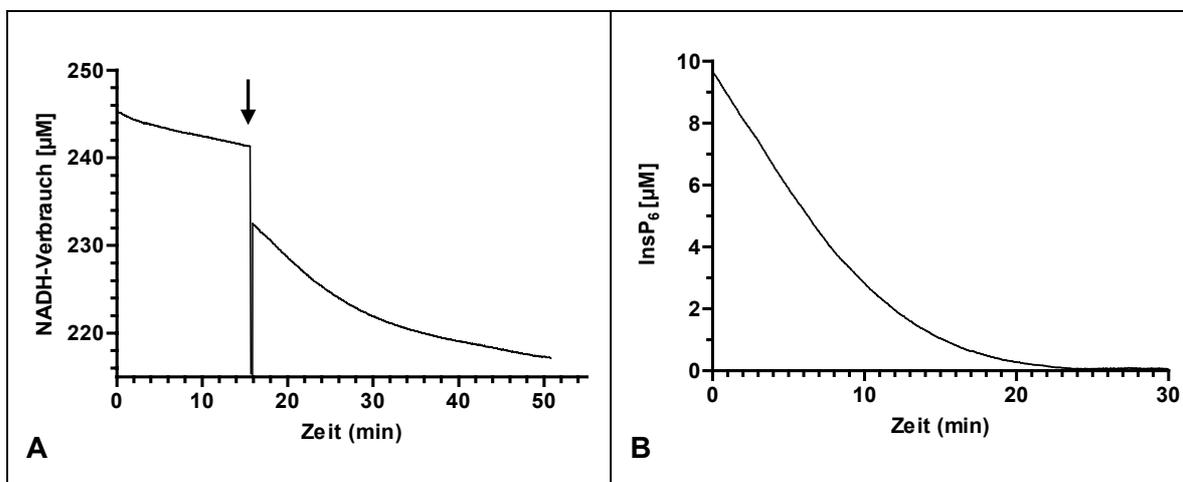


**Abb. 3.1-1: Immunologischer Nachweis rekombinanter GST-IP6K-2 durch Western-Blot.** Zum Nachweis wurde der Kaninchen anti-Ratte-IP6K-2-Antikörper verwendet, der gegen die zwischen Ratte und Mensch konservierte katalytische Domäne des Enzyms gerichtet ist [Saiardi *et al.*, 2001<sup>b</sup>]. Aufgetragen wurden Aliquots des Expressionsansatzes vor Induktion (1), nach Induktion (2), der vereinigten Eluate aus der Affinitätschromatographie über Glutathion-Sepharose (3) und einem Eluat aus der Ionenaustauschchromatographie über DEAE Sephacel (4). Der Größenstandard ist der LMW-Marker. Das Fusionsprotein hat ein Molekulargewicht von 75 kDa (26 kDa GST plus 49 kDa IP6K-2).

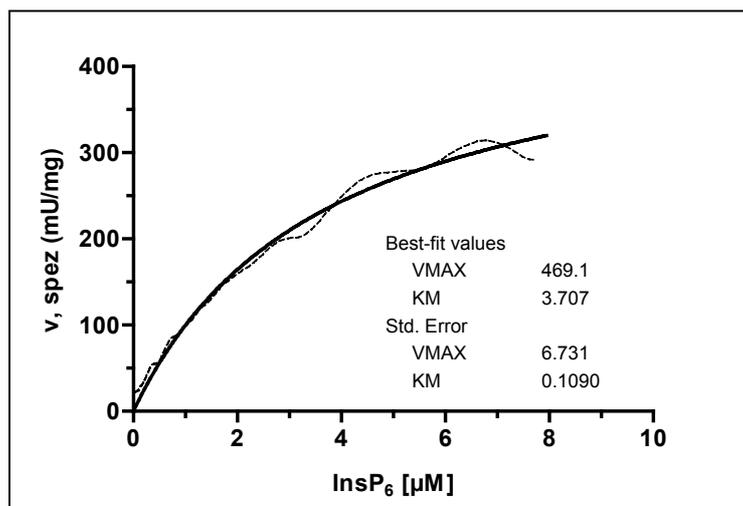
##### 3.1.1. Bestimmung der $K_m$ -Werte für $\text{InsP}_6$ und ATP

Die apparenten  $K_m$ -Werte ( $K_{m,app}$ ) für  $\text{InsP}_6$  und ATP wurden mit einem gekoppelten optischen Test (2.4.10.1. und 2.4.10.2.) durch sogenannte *Single Transient*-Messungen [Gutfreund, 1971: 189-203] bestimmt. Dafür wurden dem Reaktionsansatz bei konstanter ATP-Konzentration (5 mM) verschiedene Konzentrationen  $\text{InsP}_6$  (0,315-10  $\mu\text{M}$ ) bzw. bei konstanter  $\text{InsP}_6$ -Konzentration (5  $\mu\text{M}$ ) verschiedene ATP-Konzentrationen (1-10 mM) zugefügt. Für  $\text{InsP}_6$  als Substrat wurden weitere Messreihen unter „physiologischen“ Hochsalzbedingungen (Standardreaktionsansatz mit 100 mM KCl) und unter niedrigen ATP-Konzentrationen (Standardreaktionsansatz mit 1 mM ATP) durchgeführt, um den Einfluss dieser beiden Faktoren auf die  $K_m$ -Werte zu untersuchen. Für die Reaktionsgeschwindigkeiten  $v$  und  $V_{max}$  wurden im Folgenden immer die spezifischen Reaktionsgeschwindigkeiten (mU/mg) als Einheit angegeben. Dies ist möglich, da die Reaktionsgeschwindigkeiten in ( $\text{pmol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ ) gemessen und auf ein Volumen des Reaktionsansatzes berechnet wurden, dass 1 ml entspricht. Die spezifische Aktivität ( $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) oder (mU/mg)) entspricht damit dem  $V_{max}$ - bzw.  $v$ -Wert ( $\text{nM min}^{-1} \text{l}^{-1}$ ).

Die IP6K-2-Reaktionen wurden bis zum vollständigen Substratumsatz verfolgt (Abb. 3.1-2 A) und die initialen Substratkonzentrationen und die spezifischen Reaktionsgeschwindigkeiten (spez.  $v$ ) bestimmt (Abb. 3.1-2 B und Abb. 3.1-3). Die so ermittelten Werte wurden nach Michaelis-Menten aufgetragen und der apparente  $K_m$ -Wert sowie die initialen Reaktionsgeschwindigkeit ( $v$ , initial) für jede Messung bestimmt. Die Auswertung einer Messreihe ist exemplarisch in Tab. 3.1-1 gezeigt. Hier wird deutlich, dass die aus den Michaelis-Menten-Auftragungen berechneten  $K_m$ -Werte und initialen Reaktionsgeschwindigkeiten abhängig von der Substratkonzentration zunehmen. Durch doppelt-reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk aller ermittelten initialen Reaktionsgeschwindigkeiten gegen die initialen Substratkonzentrationen (Abb. 3.1-4 und Abb. 3.1-6) wurde der spezifische  $V_{max}$ -Wert (spez.  $V_{max}$ ) und ein apparenter  $K_m$ -Wert ermittelt. Bei dem gefundenen  $K_m$ -Wert handelt es sich ebenfalls um einen apparenten  $K_m$ -Wert ( $K_{m,app}$ ), weil die IP6K-2 offenbar einer Produkt- hemmung durch PP-InsP<sub>5</sub> unterliegt. Ein Hinweis auf eine Produkthemmung durch PP-InsP<sub>5</sub> zeigt sich in der Zunahme der apparenten  $K_m$ -Werte bei hoher Substratkonzentration (5-10  $\mu\text{M}$  InsP<sub>6</sub>), wobei die Reaktionsgeschwindigkeiten offenbar nicht in gleichem Maß beeinflusst werden (Tab. 3.1-1), was dem Schema einer kompetitiven Hemmung entspricht (siehe auch 3.3.2.).



**Abb. 3.1-2: Beispiel für *Single Transient*-Messung mit dem gekoppelten optischen Test zur Bestimmung apparenter  $K_m$ -Werte.** Dargestellt ist der Reaktionsverlauf vor Substratzugabe (Vorlauf) und nach Starten der IP6K-2-Reaktion mit 10  $\mu\text{M}$  InsP<sub>6</sub> (A). Der Pfeil markiert das Starten der Reaktion durch Substratzugabe. Die so gewonnenen Rohdaten wurden in MS Excel übertragen und ausgewertet (B). Die Steigung des Vorlaufs wurde durch lineare Regression ermittelt und von der Steigung der IP6K-2 Kinetik abgezogen. Außerdem wurde die Kinetik normiert, d.h. der NADH-Verbrauch wurde in InsP<sub>6</sub>-Verbrauch umgewandelt und der Startpunkt der IP6K-2-Reaktion wurde auf null Minuten gesetzt.



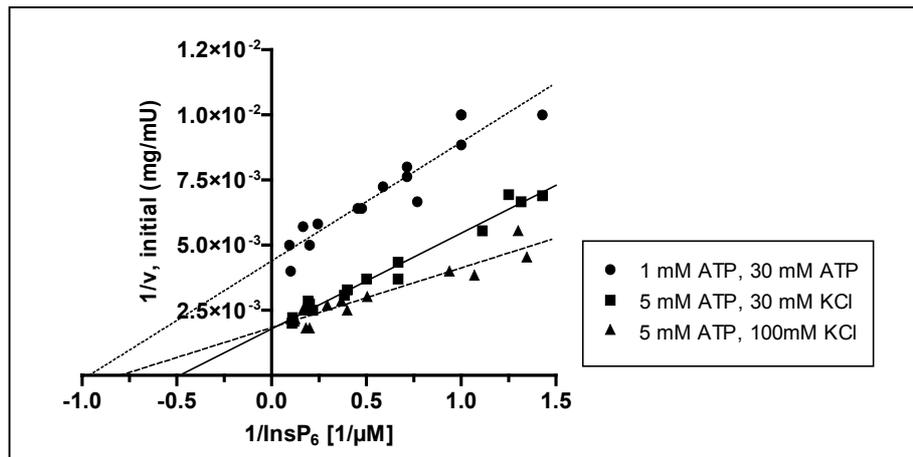
**Abb. 3.1-3: Beispiel für die Auswertung der IP6K-2-Kinetiken in GraphPad Prism 4.** Der in MS Excel bestimmte Substratverbrauch pro Zeiteinheit wurde in mU/mg Enzym (spez. v) umgerechnet und nach Michaelis-Menten gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Die initiale maximale Reaktionsgeschwindigkeit (v, initial hier als Vmax bezeichnet) und der  $K_{m_{app}}$ -Wert wurden durch das Programm berechnet.

**Tab. 3.1-1: Auswertung der IP6K-2-Kinetiken.** Die initiale Substratkonzentration wurde in MS Excel bestimmt.  $K_{m_{app}}$  und v, initial wurden aus den Michaelis-Menten-Auftragungen berechnet. Die PP-InsP<sub>5</sub>-Konzentrationen bei  $K_{m_{app}}$  ergeben sich durch Subtraktion der InsP<sub>6</sub>-Konzentration bei  $K_{m_{app}}$  von den initialen InsP<sub>6</sub>-Konzentrationen.

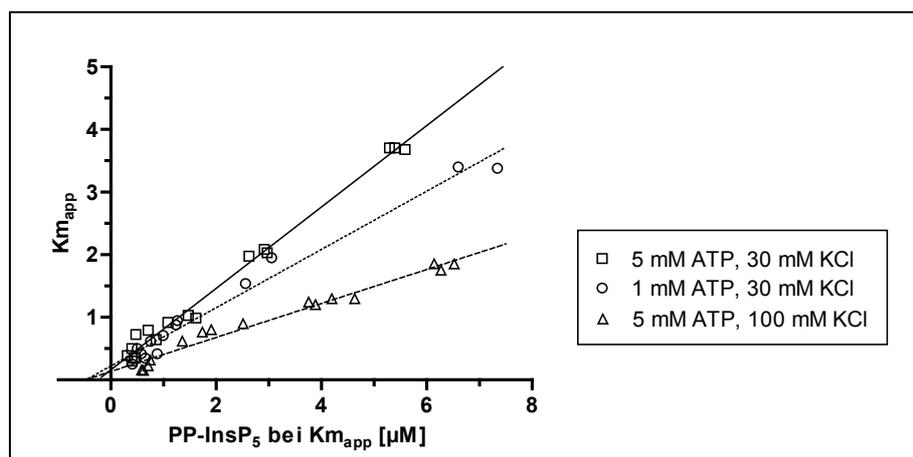
InsP <sub>6</sub> nominal [µM]	InsP <sub>6</sub> initial [µM]	$K_{m_{app}}$ [µM]	PP-InsP <sub>5</sub> bei $K_{m_{app}}$ [µM]	v, initial (mU/mg)
0,315	0,7	0,388	0,312	145
0,500	0,9	0,501	0,399	180
1,250	1,5	0,643	0,857	270
2,500	2,5	1,032	1,468	304
5,000	4,6	1,977	2,623	400
10,000	9,0	3,707	5,293	469

Damit der eigentliche Km-Wert ermittelt werden konnte, wurde die Inhibitor-Konzentration, also [PP-InsP<sub>5</sub>], bei  $K_{m_{app}}$  für jede Messung mit InsP<sub>6</sub> als variiertes Substrat berechnet (Tab. 3.1-1) und die  $K_{m_{app}}$ -Werte gegen die Inhibitor-Konzentration aufgetragen (Abb. 3.1-5, nach Segel, 1968: S. 251). Aus dem Graphen wurden der „wahre“ Km-Wert und die Inhibitor-Konstante (Ki-Wert) bestimmt. Der Ki-Wert beschreibt die Effektivität eines Inhibitors und ist äquivalent zu der Inhibitor-Konzentration, die in der Auftragung von  $1/v$  vs.  $1/[S]$  nach Line-

Lineweaver-Burk bei verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen zu einer Verdoppelung der Steigung der Regressionsgeraden führt. Je kleiner  $K_i$  ist, desto effektiver wirkt ein Hemmstoff. Für das Substrat  $\text{InsP}_6$  wurde zudem die Konstante  $k_{\text{cat}}$  ( $V_{\text{max}}/K_m$  in  $(\text{min}^{-1})$ ) berechnet, die bei Reaktionen erster Ordnung die Affinität eines Enzyms zu einem Substrat beschreibt. Ist die Substratkonzentration viel kleiner als  $K_m$ , also  $[S] \ll K_m$ , dann bedeutet ein  $k_{\text{cat}}$ -Wert von  $> 1$ , dass bei konstanter Umsatzgeschwindigkeit mehr als 100 % des Substrates in einer Minute umgesetzt werden. Die so ermittelten enzymatischen Daten sind in Tab. 3.1-2 und Tab. 3.1-3 zusammengefasst.



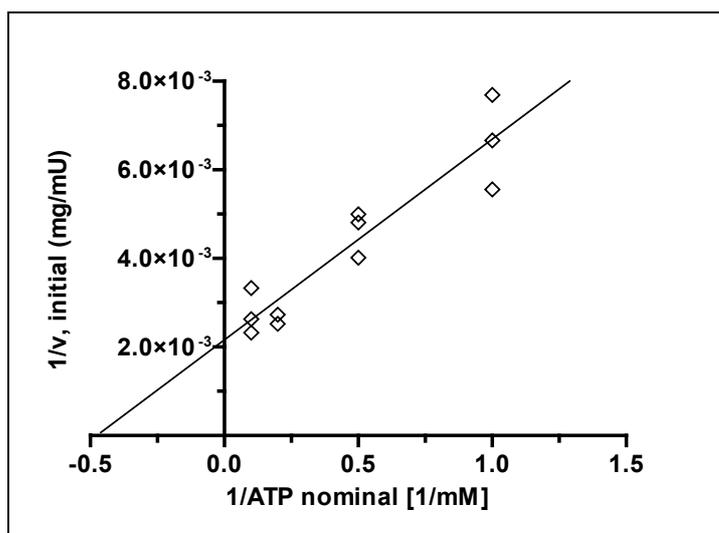
**Abb. 3.1-4: Bestimmung von spez.  $V_{\text{max}}$  für  $\text{InsP}_6$  durch doppelt-reziproke Darstellung nach Lineweaver-Burk.** Es wurden die reziproken Werte der rechnerisch bestimmten initialen Reaktionsgeschwindigkeiten gegen den reziproken Wert der jeweiligen nominalen Substratkonzentration aufgetragen.  $1/(\text{spez. } V_{\text{max}})$  ergibt sich dann aus dem Schnittpunkt der Ordinate. Es sind die Daten für drei Messreihen dargestellt, bei denen die KCl bzw. die ATP-Konzentration variiert wurde. Jeder Datenpunkt entspricht einer Transienten.



**Abb. 3.1-5: Bestimmung des  $K_m$ -Wertes für das Substrat  $\text{InsP}_6$  und des  $K_i$ -Wertes für  $\text{PP-InsP}_5$ .** Die aus den Kinetiken ermittelten apparenten  $K_m$ -Werte wurden gegen die an diesen Punkten vorliegenden  $\text{PP-InsP}_5$ -Konzentrationen (Inhibitor-Konzentration bei Produkthemmung) aufgetragen. Auf diese Weise lässt sich der wahre  $K_m$ -Wert aus dem Ordinaten-Schnittpunkt und der  $K_i$ -Wert aus dem Abzissen-Schnittpunkt ablesen [Segel, 1976: S. 251]. Es sind die Daten für drei Messreihen dargestellt, bei denen die KCl- bzw. die ATP-Konzentration variiert wurde. Jeder Datenpunkt entspricht einer Transienten.

**Tab. 3.1-2: Ermittelte maximale Reaktionsgeschwindigkeiten, Km- und Ki-Werte für die IP6K-2-Reaktion unter Standard- und Hochsalzbedingungen sowie bei niedriger ATP-Konzentration.**

Reaktionsbedingungen	spez. Vmax (mU/mg)	Km <sub>app</sub> [μM]	Km [μM]	Ki [μM]	k <sub>cat</sub> (min <sup>-1</sup> )
5 mM ATP, 30 mM KCl	560,54 ± 33,61	1,79	0,16 ± 0,05	0,25	3,5
5 mM ATP, 100 mM KCl	543,48 ± 41,77	1,25	0,14 ± 0,05	0,51	3,9
1 mM ATP, 30 mM KCl	235,85 ± 20,15	1,03	0,22 ± 0,07	0,48	1,1



**Abb. 3.1-6: Bestimmung des spezifischen Vmax- und des apparenten Km-Werts für das Substrat ATP durch doppelt-reziproke Darstellung nach Lineweaver-Burk.** Aufgetragen wurden die reziproken Werte der rechnerisch bestimmten initialen Reaktionsgeschwindigkeiten gegen den reziproken Wert der jeweiligen nominalen Substratkonzentration. 1/(spez. Vmax) ergibt sich dann aus dem Schnittpunkt der Ordinate und 1/Km<sub>app</sub> aus dem Schnittpunkt der Abzisse. Jeder Datenpunkt entspricht einer Transienten.

**Tab. 3.1-3: Ermittelte maximale Reaktionsgeschwindigkeit und Km<sub>app</sub>-Wert für ATP bei Substratsättigung.**

Reaktionsbedingungen	spez. Vmax (mU/mg)	Km <sub>app</sub> [mM]
5 μM InsP <sub>6</sub>	453,7±79,93	1,96

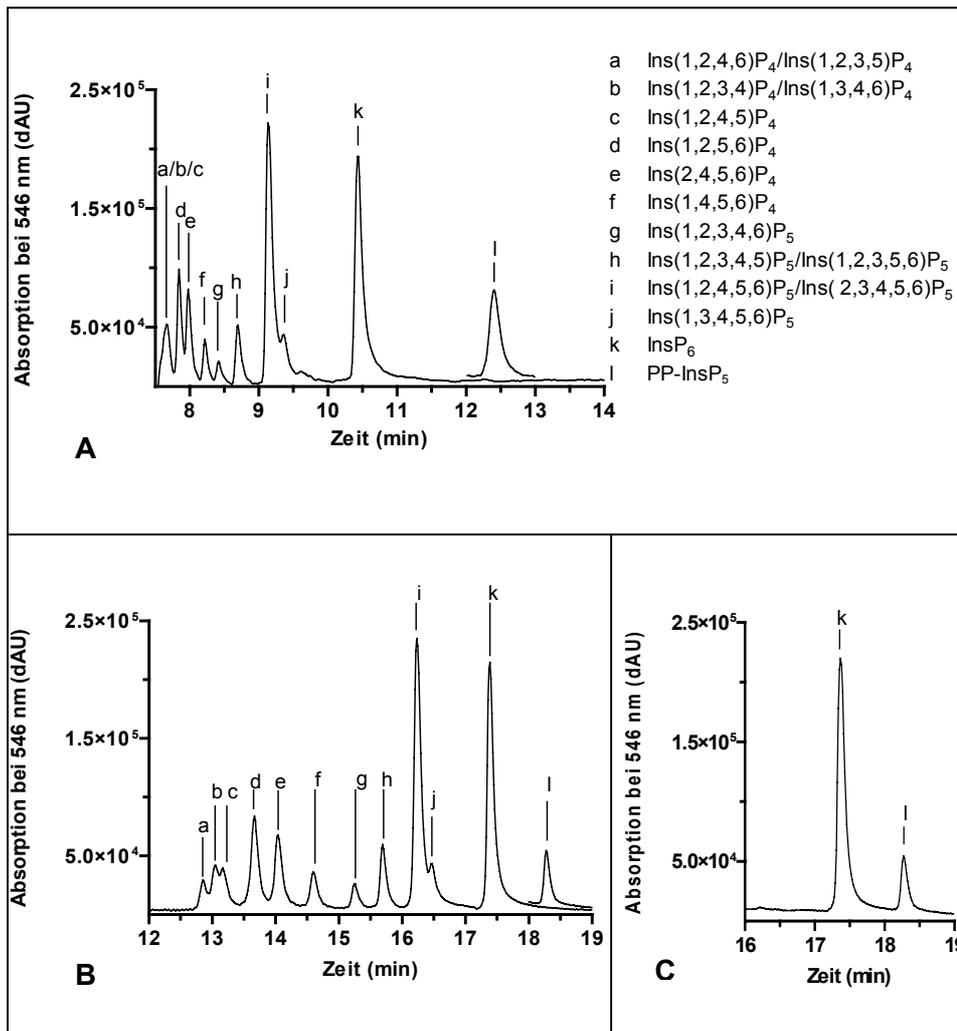
Für die IP6K-2-Reaktionen unter Standardbedingungen (5 mM ATP, 30 mM KCl) mit InsP<sub>6</sub> als Substrat wurde ein spezifischer Vmax-Wert von 560,54 ± 33,61 mU/mg, ein Km-Wert von 0,16 ± 0,05 μM, ein Ki-Wert von 0,25 μM und k<sub>cat</sub>= 3,5 min<sup>-1</sup> bestimmt. Der k<sub>cat</sub>-Wert zeigt, dass die IP6K-2 das Substrat InsP<sub>6</sub> mit hoher Effektivität umsetzt. Hohe Salzkonzentrationen (100 mM KCl) beeinflussen die Konstante nicht signifikant, während eine niedrige ATP-Konzentration (1 mM) den k<sub>cat</sub>-Wert verringert. Hier nimmt aber nicht die eigentliche Affinität

der IP6K-2 gegenüber InsP<sub>6</sub> ab, sondern es wird nur die verringerte Reaktionsaktivität durch eine geringere Konzentration des zweiten Substrates ATP deutlich. Diese verringerte Reaktionsaktivität zeigt sich sowohl in einer leichten Erhöhung des Km-Werts für InsP<sub>6</sub> als auch in einer deutlichen Erniedrigung von V<sub>max</sub>. Die Salzkonzentration im Reaktionsansatz beeinflusst den Km-Wert nicht signifikant. Eine Produkthemmung durch PP-InsP<sub>5</sub> konnte insofern bestätigt werden, dass sich die „wahren“ Km-Werte für InsP<sub>6</sub> unter den verschiedenen Reaktionsbedingungen etwa 5-10fach gegenüber den apparenten Km-Werten erniedrigt sind. Diese Erniedrigung ist unter Standard- und Hochsalzbedingungen stärker (etwa 10fach) als bei niedrigen ATP-Konzentrationen. Die gefundenen Ki-Werte liegen zwischen 0,25 und 0,51 µM.

Der apparente Km-Wert für ATP als Substrat wurde mit 1,96 µM und der spezifische V<sub>max</sub>-Wert mit 453,7 ± 79,93 mU/mg bestimmt. Der wahre Km-Wert liegt wahrscheinlich, wie für das Substrat InsP<sub>6</sub> beobachtet, deutlich niedriger, wurde aber aus technischen Gründen nicht bestimmt.

### 3.2. Substratselektivität der HsIP6K-2

Es sollte geklärt werden, welche InsP-Isomere sich als Substrate für die IP6K-2 eignen und ein Substratselektivitätsprofil für das Enzym erstellt werden. Über ein Substratselektivitätsprofil kann die minimale und maximale Anzahl von Phosphatgruppen eines InsP-Substrates sowie die notwendige räumliche Ausrichtung seiner Phosphatgruppen bestimmt werden, damit es durch IP6K-2 phosphoryliert wird. Durch Substrat-Produkt-Analysen kann die Position, an der die Phosphorylierung erfolgt, überprüft werden. Auf diesem Weg gefundene alternative Substrate der IP6K-2 könnten weiteren Aufschluss über den Inositolphosphat-Metabolismus *in vivo* geben, da z.B. von S. Haverland [2001] nach Inkubation von Rattenleberextrakt mit verschiedenen InsP-Isomeren Reaktionsprodukte gefunden wurden, für die bis dato keine IP-Kinase-Aktivität bekannt war. Für die Substrat-Produkt-Analysen wurden verschiedene InsP-Isomere unter Standardbedingungen (2.4.10.) auf ihre Substrateignung für die IP6K-2 getestet. Die entstandenen Produkte wurden mit MDD-HPLC analysiert.

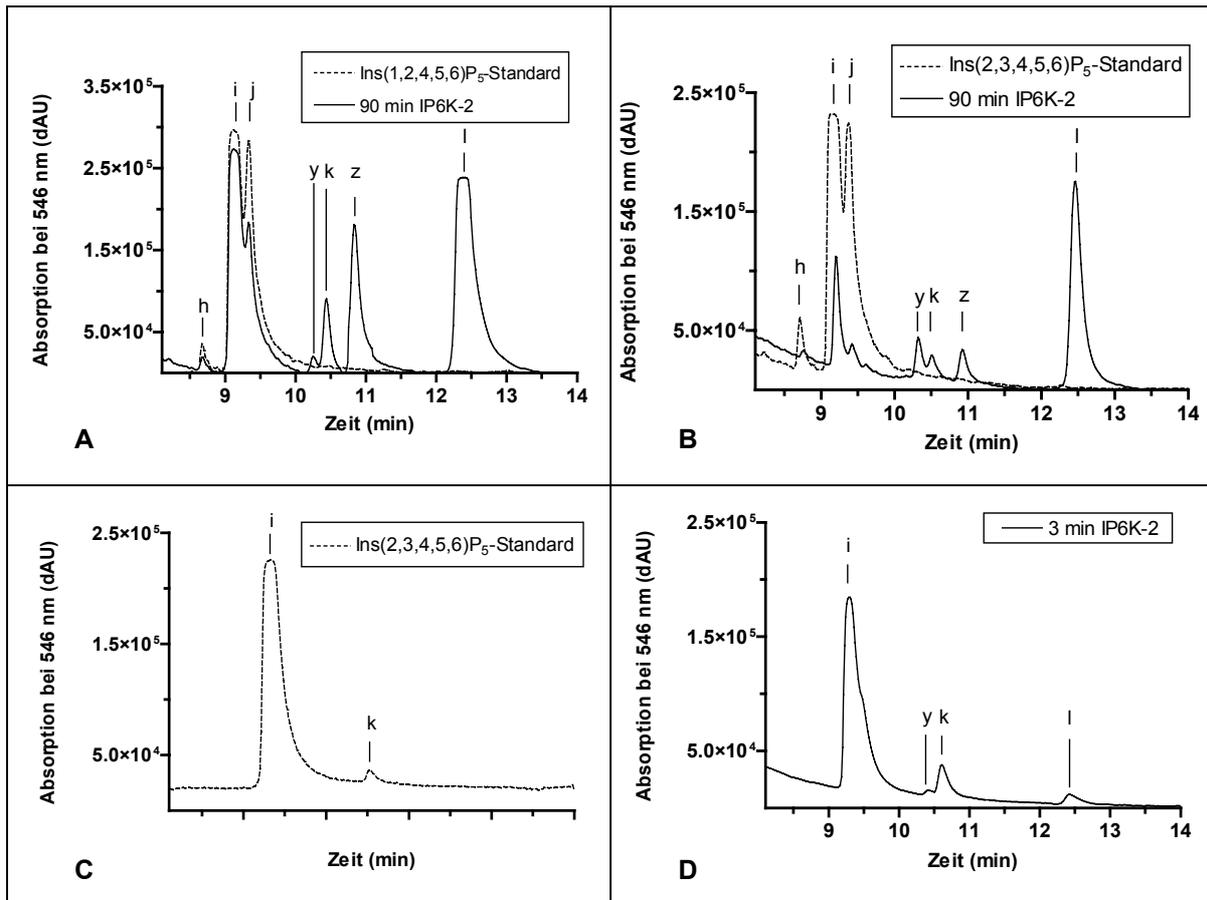


**Abb. 3.2-1: MDD-HPLC Chromatogramme der InsP<sub>x</sub>-Standards bei verschiedenen Gradienten. A:** Gradient MQIP7-8; **B:** Gradient MQIPFLKURZ. In **C** ist der Umsatz von InsP<sub>6</sub> durch IP6K-2 gezeigt (Standardbedingungen mit 5 μM Substrat, 3 min Inkubationszeit).

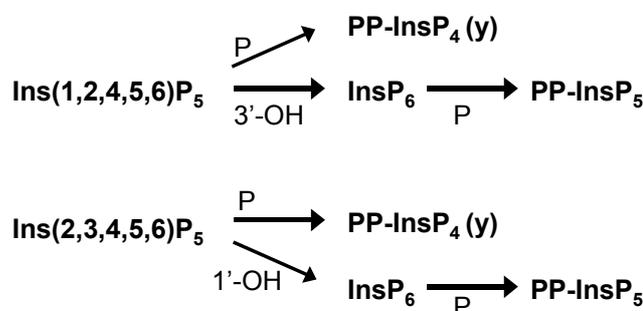
### 3.2.1. Umsatz der InsP<sub>5</sub>-Enantiomere D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> und D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub> durch IP6K-2

Produktanalysen mit MDD-HPLC von IP6K-2-Umsätzen beider Enantiomere ergaben, dass InsP<sub>6</sub>, PP-InsP<sub>5</sub> sowie ein pyrophosphoryliertes Produkt, wahrscheinlich ein PP-InsP<sub>4</sub>, welches vor InsP<sub>6</sub> eluiert (y), entstanden sind (Abb. 3.2-2 A, B und D).

Die für die Produktanalysen in Abb. 3.2-2 A und B eingesetzten Standards waren nicht isomeren- und enantiomerenrein. Es waren daher noch Produkte aus den Reaktionen mit anderen Substraten (D-Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> und D-Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> bzw. D-Ins(1,2,3,5,6)P<sub>5</sub>) entstanden. Da nicht genau bekannt war, wie hoch der Anteil des jeweiligen anderen Enantiomers in den D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> und D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-Standards war, konnten die Reaktionsprodukte in diesem Fall nicht genau nur einem Enantiomer zugeordnet werden.



**Abb. 3.2-2: Produktanalysen der IP6K-2-Umsätze der Enantiomere D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> und D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub>.** IP6K-2 wurde unter Standardbedingungen mit 5 µM D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> (A) und D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub> (B, D) verschieden lange inkubiert. Dargestellt sind die Chromatogramme aus MDD-HPLC-Analysen der Isomeren-Standards und je eine repräsentative Produktanalyse. Die D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub>- (A) und D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-Standards (B) sind stark mit dem jeweils anderen Enantiomer verunreinigt. Damit die entstehenden Produkte einem Enantiomer zugeordnet werden können, wurde enantiomerenreines D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub> (C) enzymatisch mit IPMK hergestellt und chromatographisch gereinigt (2.4.13.1.). Die Produktanalyse ist in (D) gezeigt. Die Bezeichnung der Peaks erfolgte nach den Angaben in Abb. 3.2-1. (h): D-Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub>/D-Ins(1,2,3,5,6)P<sub>5</sub>; (i): D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub>/D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub>; (j): D-Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>; (k): InsP<sub>6</sub>; (l): PP-InsP<sub>5</sub>; (y) und (z): unbekannte Inositolpyrophosphate, wahrscheinlich verschiedene PP-InsP<sub>4</sub>.

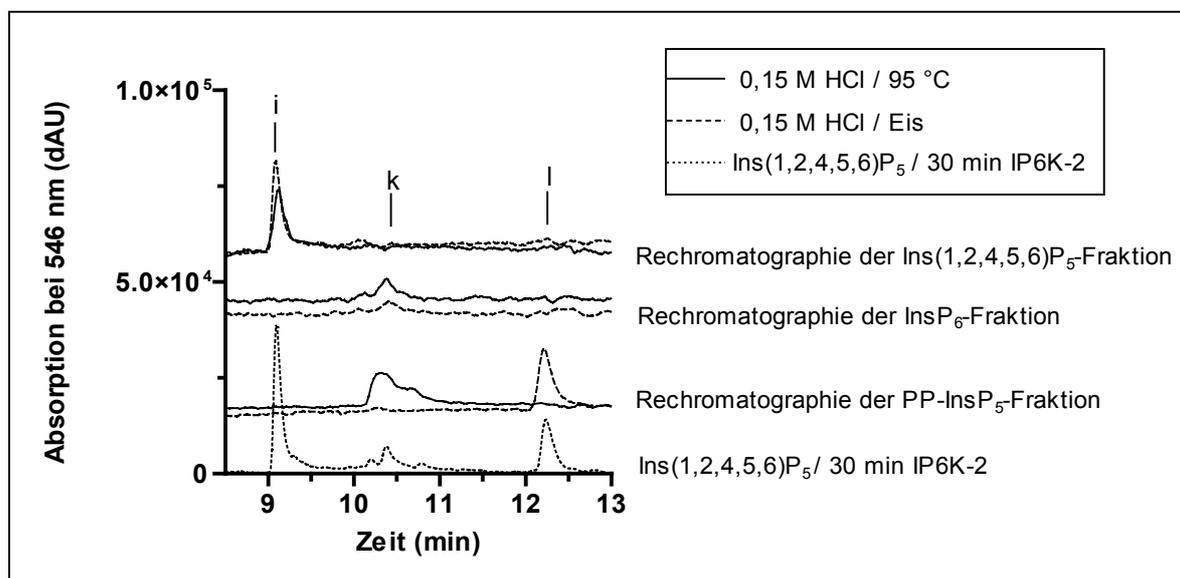


**Abb. 3.2-3: Schematische Darstellung der vermutlichen Reaktionswege der IP6K-2 ausgehend von den Substraten D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> und D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub>.** Die IP6K-2 hat demnach eine D-1'- und D-3'-OH-Kinase-Aktivität (1'- bzw. 3'-OH) und Pyrophosphokinase-Aktivität (P). Die Stärke der Reaktionspfeile orientiert sich an den spezifischen Reaktionsgeschwindigkeiten, mit denen ein Produkt gebildet wird. (y) bezeichnet das PP-InsP<sub>4</sub>-Isomer aus den Produktanalysen (Abb. 3.2-2).

Mit Hilfe der D-Ins(2,4,5,6)P<sub>4</sub>-3-Kinaseaktivität der IPMK ließ sich ein enantiomerenreines D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub> aus Ins(2,4,5,6)P<sub>4</sub> herstellen (2.4.13.1.; Abb. 3.2-2 C), das chromatographisch von nicht umgesetztem Substrat gereinigt wurde. Als Kontamination enthielt es 3,5 % InsP<sub>6</sub>, das durch eine Nebenreaktion der IPMK mit D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub> entstanden war. Mit diesem Substrat wurden die Produktanalysen wiederholt (Abb. 3.2-2 D). Der Anteil der Produkte InsP<sub>6</sub> und PP-InsP<sub>5</sub> an der Gesamtinositolphosphatmenge betrug nach 2 min IP6K-2-Reaktion 4 % und nach 5 min 10,9 %, was für eine Phosphorylierung von D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub> zu InsP<sub>6</sub> spricht. Die Phosphorylierung von D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> zu InsP<sub>6</sub> läuft jedoch offenbar mit einer wesentlich höheren Reaktionsgeschwindigkeit ab. Vergleicht man die Reaktionsgeschwindigkeiten mit denen die nicht-enantiomerenreinen D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub>- und D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-Standards und der vermutlich enantiomerenreine D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-Standard (Tab. 3.2-2) bei verschiedenen Substratkonzentrationen umgesetzt werden, so wird der D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub>-reichere Standard mit 459 mU/mg bei 10 µM Substrat, der D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-reichere Standard mit nur 142 mU/mg bei etwa 5 µM Substrat und der enantiomerenreine D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-Standard mit 92 mU/mg bei etwa 5 µM Substrat und mit 149 mU/mg bei 10 µM Substrat zu InsP<sub>6</sub> und PP-InsP<sub>5</sub> phosphoryliert bzw. pyrophosphoryliert. Die spezifische Reaktionsgeschwindigkeit (spez. v), mit der das Substrat D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> umgesetzt wird, liegt damit nur knapp unterhalb von spez. V<sub>max</sub> für das Substrat InsP<sub>6</sub> (etwa 540 mU/mg, vergleiche Tab. 3.1-2). Von den beiden Enantiomeren wird also D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> mit einer höheren spezifischen Aktivität an der OH-Gruppe phosphoryliert. Demnach hat die IP6K-2 eine ausgeprägte D-3'-OH-Kinase-Aktivität für 5fach phosphoryliertes InsP<sub>5</sub>. Wie bereits erwähnt, werden wahrscheinlich beide Enantiomere auch zu einem PP-InsP<sub>4</sub> pyrophosphoryliert, wobei bei letzterer Reaktion offenbar das D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub> bevorzugt wird, d.h. mit einer höheren spezifischen Aktivität umgesetzt wird (Tab. 3.2-2). Das heißt, ein und dasselbe Substrat kann jeweils einmal an einer OH-Gruppe und einmal an einer α-[PO<sub>4</sub>]-Gruppe phosphoryliert bzw. pyrophosphoryliert werden, wobei die Isomerie der Substrate die relativen Raten der Reaktion bestimmt (Abb. 3.2-3).

Ob die Produkte tatsächlich InsP<sub>6</sub>, PP-InsP<sub>5</sub> und PP-InsP<sub>4</sub> sind oder ob es sich um andere Isomere mit sehr ähnlichen Retentionszeiten handelt, wurde mittels einer säurekatalysierten Hydrolyse der Reaktionsprodukte überprüft (2.4.12.). Pyrophosphate sind unter sauren Bedingungen labil, InsP<sub>6</sub> und InsP<sub>5</sub> dagegen relativ stabil. PP-InsP<sub>5</sub> sollte demnach nach saurer Hydrolyse zu InsP<sub>6</sub> dephosphorylieren, was dann auch mit MDD-HPLC nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.2-4). Das putative PP-InsP<sub>4</sub> sollte nach saurer Hydrolyse zu dem Substrat D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> bzw. D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub> dephosphorylieren. Da jedoch nur sehr geringe Mengen des putativen PP-InsP<sub>4</sub> aus der Reaktion der IP6K-2 mit D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> und D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub> entstehen und die Methode der sauren Hydrolyse aufgrund der Rechromatographie von MDD-HPLC-Fraktionen gewissen Materialverlusten unterliegt, konnte

sehr wahrscheinlich aus diesem Grund kein D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> bzw. D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub> nach Hydrolyse des PP-InsP<sub>4</sub> detektiert werden und die Daten sind daher nicht gezeigt.



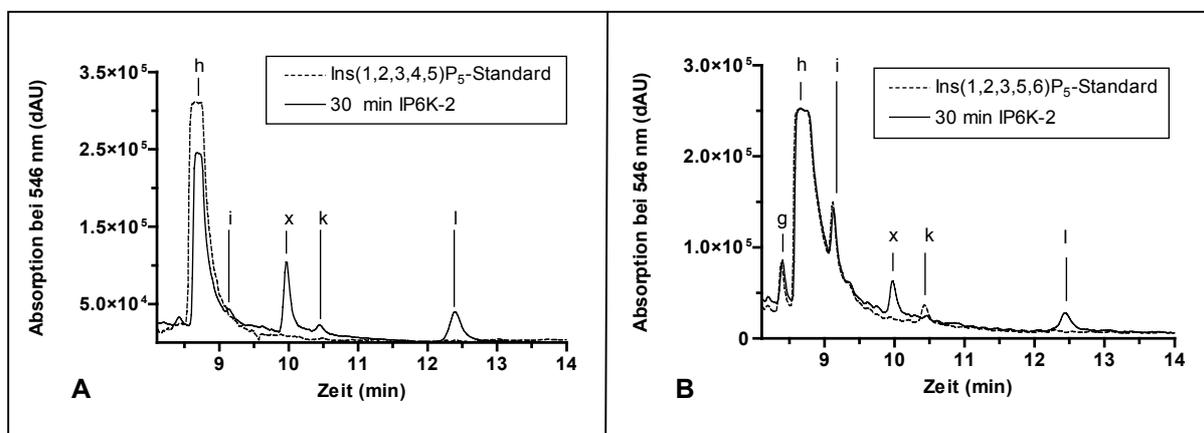
**Abb. 3.2-4: Säurekatalysierte Hydrolyse von PP-InsP<sub>5</sub>.** D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> wurde mit IP6K-2 unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurden das Substrat und die einzelnen Reaktionsprodukte chromatographisch voneinander getrennt und im sauren Eluenten entweder 15 min bei 95 °C erhitzt oder solange auf Eis gelagert. Die so behandelten Proben wurden mit MDD-HPLC analysiert und miteinander verglichen. Die Bezeichnung der *Peaks* erfolgte nach den Angaben in Abb. 3.2-1. (i): D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub>/D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub>; (k): InsP<sub>6</sub>; (l): PP-InsP<sub>5</sub>.

Für das enantiomerenreine Substrat D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub> wurde ein  $K_{m,app}$  von  $5,9 \pm 0,7 \mu\text{M}$  und spez.  $V_{max}$  von  $378 \pm 36 \text{ mU/mg}$  bestimmt. Die Messungen wurden unter Standardbedingungen mit Substratkonzentrationen von  $0,313\text{--}20 \mu\text{M}$  durchgeführt (2.4.11.2.). Der  $K_{m,app}$  und spez.  $V_{max}$  für D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> wurden nicht bestimmt, weil die entstehenden Produkte, InsP<sub>6</sub>, PP-InsP<sub>5</sub> und das putative PP-InsP<sub>4</sub>, offenbar bei Reaktionen mit beiden Enantiomeren auftreten und die prozentuale Enantiomeren-Zusammensetzung im Substrat-Standard nicht genau bekannt war.

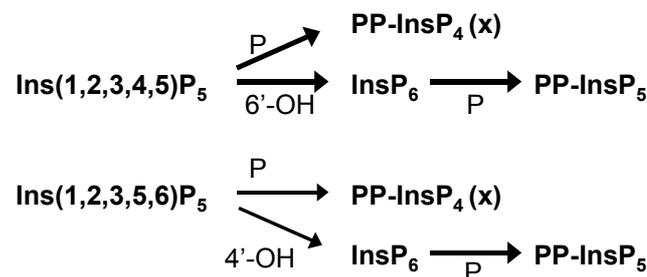
### 3.2.2. Umsatz der InsP<sub>5</sub>-Enantiomere D-Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> und D-Ins(1,2,3,5,6)P<sub>5</sub> durch IP6K-2

Mittels Produktanalysen mit MDD-HPLC von IP6K-2-Reaktionen mit D-Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> (Abb. 3.2-5 A) und D-Ins(1,2,3,5,6)P<sub>5</sub> (Abb. 3.2-5 B) wurde die Enantiomeren-Selektivität der IP6K-2 getestet. D-Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> wurde bei einer Konzentration von  $3,5 \mu\text{M}$  mit  $25 \text{ mU/mg}$  zu InsP<sub>6</sub> und PP-InsP<sub>5</sub> und mit  $33 \text{ mU/mg}$  zu einem Inositolpyrophosphat, wahrscheinlich einem PP-InsP<sub>4</sub>, phosphoryliert bzw. pyrophosphoryliert und D-Ins(1,2,3,5,6)P<sub>5</sub> bei einer Konzentration von etwa  $4 \mu\text{M}$  mit  $17 \text{ mU/mg}$  ebenfalls zu einem putativen PP-InsP<sub>4</sub> umgesetzt (Tab.

3.2-2). Die IP6K-2 zeigt demnach eine bessere 6'-OH-Kinase-Aktivität gegenüber der D-4'-OH-Kinase-Aktivität und damit wieder eine Enantiomeren-Selektivität für ein weiteres InsP<sub>5</sub>-Substrat-Paar (Abb. 3.2-6). Das entstandene putative PP-InsP<sub>4</sub> (Abb. 3.2-5 A und B: (x)) ist ein anderes PP-InsP<sub>4</sub> als durch Reaktion mit Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub>/Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub> entsteht, da es bei MDD-HPLC-Analysen eine andere Retentionszeit zeigt. Möglicherweise entstehen durch Phosphorylierung von D-Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> und D-Ins(1,2,3,5,6)P<sub>5</sub> zwei unterschiedliche PP-InsP<sub>4</sub>-Isomere (Enantiomere) mit identischen Retentionszeiten. Genauso gut ist es denkbar, dass der D-Ins(1,2,3,5,6)P<sub>5</sub>-Standard nicht enantiomerenrein ist und das beobachtete Produkt auf eine Kontamination des Standards mit D-Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> zurückzuführen ist, also nur eines der beiden InsP<sub>5</sub>-Isomere pyrophosphoryliert wird.



**Abb. 3.2-5: Produktanalysen der IP6K-2-Umsätze der Enantiomere D-Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> und D-Ins(1,2,3,5,6)P<sub>5</sub>.** IP6K-2 wurde unter Standardbedingungen mit 5 μM D-Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> (A) und D-Ins(1,2,3,5,6)P<sub>5</sub> (B) verschieden lange inkubiert. Dargestellt sind die Chromatogramme aus MDD-HPLC-Analysen der Isomeren-Standards und je einer repräsentative Produktanalyse. Die Bezeichnung der Peaks erfolgte nach den Angaben in Abb. 3.2-1. (g): D-Ins(1,2,3,4,6)P<sub>5</sub>; (h): D-Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub>/D-Ins(1,2,3,5,6)P<sub>5</sub>; (i): D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub>/D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub>; (k): InsP<sub>6</sub>; (l): PP-InsP<sub>5</sub>; (x): unbekanntes Inositolpyrophosphat, wahrscheinlich ein PP-InsP<sub>4</sub>.



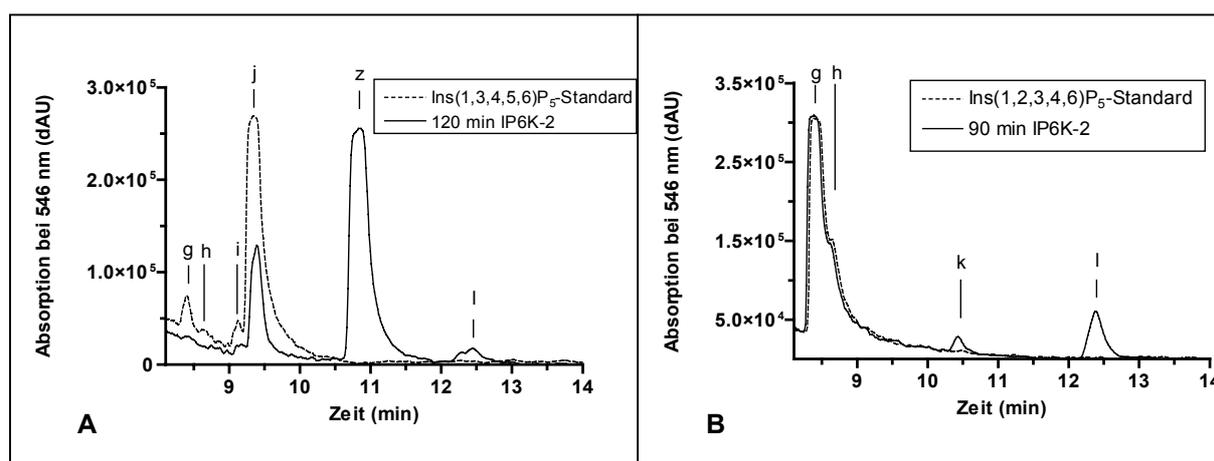
**Abb. 3.2-6: Schematische Darstellung der vermutlichen Reaktionswege der IP6K-2 ausgehend von den Substraten D-Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> und D-Ins(1,2,3,5,6)P<sub>5</sub>.** Die IP6K-2 hat demnach eine D-4'- und D-6'-OH-Kinase-Aktivität (4'- bzw. 6'-OH) und Pyrophosphokinase-Aktivität (P). Die Stärke der Reaktionspfeile orientiert sich an den spezifischen Reaktionsgeschwindigkeiten, mit denen ein Produkt gebildet wird. (x) bezeichnet das PP-InsP<sub>4</sub>-Isomer aus den Produktanalysen (Abb. 3.2-5).

Für D-Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> wurde ein K<sub>m,app</sub> von 1,3 ± 0,4 und spez. v von 26 ± 2 bestimmt. Die Messungen wurden unter Standardbedingungen mit Substratkonzentrationen von 0,313-20

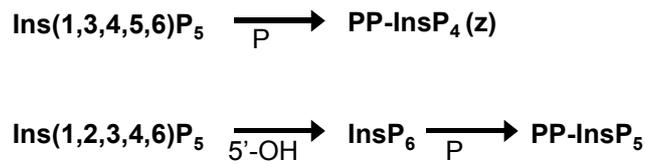
$\mu\text{M}$  durchgeführt (2.4.11.2.). Für D-Ins(1,2,3,5,6) $\text{P}_5$  wurden keine entsprechenden Messungen durchgeführt, da dieses Isomer aufgrund der niedrigen spezifischen Umsatzgeschwindigkeiten nicht weiter kinetisch analysierbar war. Es ist nicht auszuschließen, dass hier nur eine Kontamination mit dem anderen Isomer zu überhaupt messbaren Umsätzen geführt hat.

### 3.2.3. Umsatz der Ins $\text{P}_5$ -Isomere D-Ins(1,3,4,5,6) $\text{P}_5$ und D-Ins(1,2,3,4,6) $\text{P}_5$ durch IP6K-2

Die Isomere D-Ins(1,3,4,5,6) $\text{P}_5$  und D-Ins(1,2,3,4,6) $\text{P}_5$  sind *meso*-Formen. Sie unterscheiden sich in der räumlichen Ausrichtung der OH-Gruppe. Die Ausrichtung der OH-Gruppe an D-2'-Position ist in Sesselkonformation des InsP axial und die OH-Gruppe an D-5'-Position ist äquatorial angeordnet. D-Ins(1,3,4,5,6) $\text{P}_5$  wurde ausschließlich zu einem Produkt umgesetzt, bei dem es sich vermutlich um ein Inositolpyrophosphat, also abermals PP-Ins $\text{P}_4$  handelt. Dieses Inositolpyrophosphat (Abb. 3.2-7 A: (z)) eluiert nach Ins $\text{P}_6$  und ist damit ein anderes Produkt, als die bisher für andere Umsätze von Ins $\text{P}_5$ -Isomeren gefundenen PP-InsP (3.2.1. und 3.2.2.). Allerdings konnte (z)-PP-Ins $\text{P}_4$  bereits bei der IP6K-2-Reaktion mit D-Ins(1,2,4,5,6) $\text{P}_5$  bzw. D-Ins(2,3,4,5,6) $\text{P}_5$  beobachtet werden und entstammte hier einer Kontamination der Substrat-Standards mit D-Ins(1,3,4,5,6) $\text{P}_5$  (Abb. 3.2-2 A und B). Ins $\text{P}_6$  und das hieraus gebildete PP-Ins $\text{P}_5$ , die im Chromatogramm zu sehen sind, stammen wahrscheinlich aus Reaktionen der IP6K-2 mit Ins(1,2,4,5,6) $\text{P}_5$ , D-Ins(1,2,3,4,5) $\text{P}_5$  und/oder D-Ins(1,2,3,4,6) $\text{P}_5$ , die als Kontaminationen im Standard enthalten waren. Die spezifische Reaktionsgeschwindigkeit betrug bei 5  $\mu\text{M}$  Substrat 171 mU/mg. Der apparente  $K_m$ -Wert liegt bei  $5,2 \pm 0,7 \mu\text{M}$  und spez.  $V_{\text{max}}$  bei  $351 \pm 63 \text{ mU/mg}$ .



**Abb. 3.2-7: Produktanalysen der IP6K-2-Umsätze der Ins $\text{P}_5$ -Isomere D-Ins(1,3,4,5,6) $\text{P}_5$  und D-Ins(1,2,3,4,6) $\text{P}_5$ .** IP6K-2 wurde unter Standardbedingungen mit 5  $\mu\text{M}$  D-Ins(1,3,4,5,6) $\text{P}_5$  (A) oder D-Ins(1,2,3,4,6) $\text{P}_5$  (B) verschieden lange inkubiert. Dargestellt sind die Chromatogramme aus MDD-HPLC-Analysen der Isomeren-Standards und je einer repräsentative Produktanalyse. Die Bezeichnung der *Peaks* erfolgte nach den Angaben in Abb. 3.2-1. (g): D-Ins(1,2,3,4,6) $\text{P}_5$ ; (h): D-Ins(1,2,3,4,5) $\text{P}_5$ /D-Ins(1,2,3,5,6) $\text{P}_5$ ; (i): D-Ins(1,2,4,5,6) $\text{P}_5$ /D-Ins(2,3,4,5,6) $\text{P}_5$ ; (j): D-Ins(1,3,4,5,6) $\text{P}_5$ ; (k): Ins $\text{P}_6$ ; (l): PP-Ins $\text{P}_5$ ; (z): unbekanntes Inositolpyrophosphat, wahrscheinlich ein PP-Ins $\text{P}_4$ .



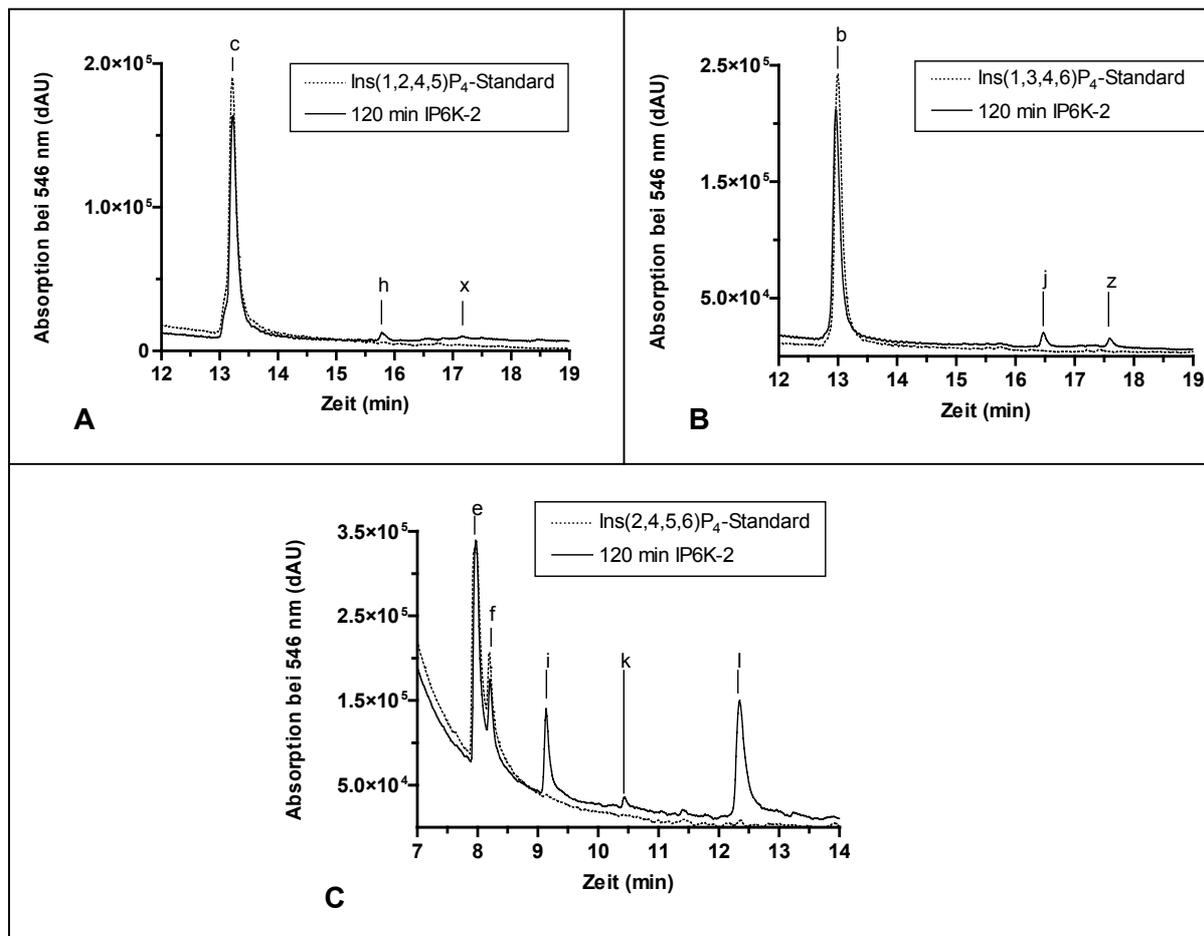
**Abb. 3.2-8: Schematische Darstellung der vermutlichen Reaktionswege der IP6K-2 ausgehend von den Substraten D-Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> und D-Ins(1,2,3,4,6)P<sub>5</sub>.** Die IP6K-2 hat demnach eine D-5'-OH-Kinase-Aktivität (5'-OH) und Pyrophosphokinase-Aktivität (P). Die Stärke der Reaktionspfeile orientiert sich an den spezifischen Reaktionsgeschwindigkeiten, mit denen ein Produkt gebildet wird. (z) bezeichnet das PP-InsP<sub>4</sub>-Isomer aus den Produktanalysen (Abb. 3.2-9).

D-Ins(1,2,3,4,6)P<sub>5</sub> wurde bei einer Konzentration 5 µM mit einer spezifischen Reaktionsgeschwindigkeit von 18 mU/mg zu InsP<sub>6</sub> und PP-InsP<sub>5</sub> umgesetzt (Abb. 3.2-7 B). Die Bestimmung von spez. V<sub>max</sub> ergab jedoch einen Wert von 9 ± 1 mU/mg und einen K<sub>m<sub>app</sub></sub>-Wert von 3,4 ± 0,9 µM. Die niedrige maximale Reaktionsgeschwindigkeit deutet daraufhin, dass es sich bei D-Ins(1,2,3,4,6)P<sub>5</sub> wahrscheinlich um kein gutes alternatives Substrat für die IP6K-2 handelt. Die IP6K-2 hat demnach jedoch auch eine relativ niedrige D-5'-OH-Aktivität.

### 3.2.4. Substrateignung verschiedener InsP<sub>4</sub>- und InsP<sub>3</sub>-Isomere

Es wurden die InsP<sub>4</sub>-Isomere D-Ins(1,2,4,5)P<sub>4</sub>, D-Ins(1,2,5,6)P<sub>4</sub>, D-Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub>, D-Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub>, D-Ins(2,3,4,5)P<sub>4</sub> und D-Ins(2,4,5,6)P<sub>4</sub> sowie die InsP<sub>3</sub>-Isomere D-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> und D-Ins(2,4,5)P<sub>3</sub> als mögliche Substrate für die IP6K-2 getestet. Dabei zeigte sich, dass auch D-Ins(1,2,4,5)P<sub>4</sub>, D-Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub> und D-Ins(2,4,5,6)P<sub>4</sub> durch das Enzym umgesetzt werden (Abb. 3.2-9 A-C). Ein Vergleich der spezifischen Aktivitäten bei einer Substratkonzentration von 5 µM zeigt, dass D-Ins(2,4,5,6)P<sub>4</sub> mit 30 mU/mg und damit am besten durch die IP6K-2 umgesetzt wird. Für D-Ins(2,4,5,6)P<sub>4</sub> wurde ein K<sub>m<sub>app</sub></sub>-Wert von 4,7 ± 0,7 und spez. V<sub>max</sub> von 80 ± 14 mU/mg bestimmt. Die spezifischen Aktivitäten für die anderen beiden InsP<sub>4</sub>-Substrate liegen bei 2 mU/mg (Tab. 3.2-2). Damit sind diese beiden Isomere *in vivo* vermutlich keine relevanten Substrate der IP6K-2.

Offenbar wird D-Ins(1,2,4,5)P<sub>4</sub> an D-3'-Position zu D-Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub>, D-Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub> an D-5'-Position zu D-Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> und D-Ins(2,4,5,6)P<sub>4</sub> ebenfalls an D-3'-Position zu D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub> oder an D-1'-Position zu D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> phosphoryliert (Abb. 3.2-10).



**Abb. 3.2-9: Produktanalysen der IP6K-2-Umsätze verschiedener InsP<sub>4</sub>-Isomere.** IP6K-2 wurde unter Standardbedingungen mit 5 μM D-Ins(1,2,4,5)P<sub>4</sub> (A), D-Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub> (B) oder D-Ins(2,4,5,6)P<sub>4</sub> (C) verschieden lange inkubiert. Dargestellt sind die Chromatogramme aus MDD-HPLC-Analysen der Isomeren-Standards und je einer repräsentative Produktanalyse. Die Bezeichnung der Peaks erfolgte nach den Angaben in Abb. 3.2-1. (b): D-Ins(1,2,3,4)P<sub>4</sub>/D-Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub>; (c): D-Ins(1,2,4,5)P<sub>4</sub>; (e): D-Ins(2,4,5,6)P<sub>4</sub>; (f): D-Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub>; (h): D-Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub>/D-Ins(1,2,3,5,6)P<sub>5</sub>; (i): D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub>/D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub>; (j): D-Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>; (k): InsP<sub>6</sub>; (l): PP-InsP<sub>5</sub>; (x) und (z): unbekannte Inositolpyrophosphate, wahrscheinlich verschiedene PP-InsP<sub>4</sub>.



**Abb. 3.2-10: Schematische Darstellung der vermutlichen Reaktionswege der IP6K-2 ausgehend von den Substraten D-Ins(1,2,4,5)P<sub>4</sub>, D-Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub> und D-Ins(2,4,5,6)P<sub>4</sub>.** Die IP6K-2 hat demnach eine D-1'-, D-3'-, D-5'-OH-Kinase-Aktivität (1'-, 3'- bzw. 5'-OH) und Pyrophosphokinase-Aktivität (P). Die Stärke der Reaktionspfeile orientiert sich an den spezifischen Reaktionsgeschwindigkeiten, mit denen ein Produkt gebildet wird. (z) bezeichnet das PP-InsP<sub>4</sub>-Isomer aus den Produktanalysen (Abb. 3.2-9).

## 3.2.5. Zusammenfassung der Substratelektivitäten

Die IP6K-2 zeigt sowohl OH- als auch P-Kinase-Aktivität, d.h. sie kann OH-Gruppen am Inositolring phosphorylieren und an vorhandene Phosphatgruppen eine weitere (Pyro-)Phosphatgruppe anhängen. Dabei ist die Position der Phosphorylierungsstelle am Inositolring wichtig. Wie Produktanalysen zeigen, wird die D-3'-Position von D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> unter den InsP<sub>5</sub>-Isomeren und wahrscheinlich von D-Ins(2,4,5,6)P<sub>4</sub> unter den InsP<sub>4</sub>-Isomeren phosphoryliert. Die D-1'-, D-5'- und D-6'-Positionen können bei InsP<sub>5</sub>-Isomeren grundsätzlich auch phosphoryliert werden. Die axial stehende OH-Gruppe an D-2'-Position wird nicht phosphoryliert, wie den Produktanalysen des D-Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>- und des D-Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub>-Umsatzes zu entnehmen ist. Hier war nur ein Inositolpyrophosphat detektierbar. Eine Phosphorylierung an D-4'-Position scheint ebenfalls eher ausgeschlossen zu sein. Das Entstehen unterschiedlicher Inositolpyrophosphate bei Umsätzen verschiedener InsP<sub>5</sub>-Isomere zeigt, dass die Pyrophosphorylierung der InsP an verschiedenen positionierten Phosphatgruppen stattfindet. Eine Zusammenfassung der Phosphorylierungen der verschiedenen Isomere durch IP6K-2 zeigt Tab. 3.2-2. Für einige ausgewählte Isomere wurden der apparente Km-Wert sowie die spezifische maximale Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt. Die ermittelten apparenten Km-Werte (Tab. 3.2-1) liegen meist deutlich über dem für InsP<sub>6</sub> unter Standardbedingungen bestimmten Km<sub>app</sub> von 1,79 µM (Tab. 3.1-2). Die berechneten k<sub>cat</sub>-Werte (vergleiche 3.1.1.) liegen alle unter 0,1 min<sup>-1</sup> und zeigen, dass die getesteten InsP<sub>5</sub> schlechte Substrate gegenüber InsP<sub>6</sub> sind (3,5 min<sup>-1</sup> bzw. 0,3 min<sup>-1</sup>, wenn mit Km<sub>app</sub> gerechnet und die Produkthemmung nicht berücksichtigt wurde (Tab. 3.2-1).

**Tab. 3.2-1: Spezifische Aktivitäten, apparente Km-Werte und k<sub>cat</sub> ausgewählter alternative Substrate der IP6K-2.** Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus jeweils drei Messreihen.

Substrat	spez. Vmax (mU/mg)	Km <sub>app</sub> [µM]	k <sub>cat</sub> (min <sup>-1</sup> )
D-Ins(1,2,3,4,5)P <sub>5</sub>	26 ± 2	1,3 ± 0,4	0,02
D-Ins(1,2,3,4,6)P <sub>5</sub>	9 ± 1	3,4 ± 0,9	0,003
D-Ins(1,3,4,5,6)P <sub>5</sub>	351 ± 63	5,2 ± 0,7	0,07
D-Ins(2,3,4,5,6)P <sub>5</sub>	378 ± 36	5,9 ± 0,7	0,06
D-Ins(2,4,5,6)P <sub>5</sub>	80 ± 14	4,7 ± 0,7	0,02

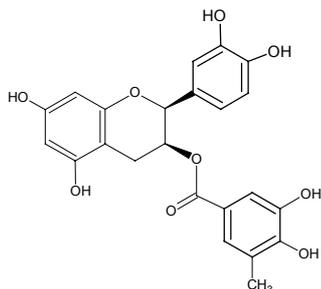
**Tab. 3.2-2: Umsatz verschiedener InsP.** Angegeben sind die spezifischen Aktivitäten, mit denen ein Substrat zu einem Produkt oder einer Produktgruppe umgesetzt wird, die initiale Substratkonzentration, die Inkubationszeit sowie die beobachtete Kinase-Aktivität. Die mit \* gekennzeichneten Aktivitäten sind Gesamtaktivitäten aus zwei bzw. drei aufeinanderfolgende Phosphorylierungsreaktionen. Da die Phosphorylierung von InsP<sub>6</sub> zu PP-InsP<sub>5</sub> schnell erfolgt, ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Reaktion vom InsP<sub>5</sub> zum InsP<sub>6</sub> und wahrscheinlich vom InsP<sub>4</sub> zum InsP<sub>5</sub> und die angegebenen Aktivitäten gelten jeweils für den ersten Reaktionsschritt.

Substrat	Produkt(e)	initiale Substrat-Konz. [μM]	Zeit (min)	Spez. Aktivität (mU/mg)	Kinase-Aktivität
InsP <sub>6</sub>	→ D-5-PP-InsP <sub>5</sub>	5	0,5	480	5'-P-Kinase
D-Ins(1,2,4,5,6)P <sub>5</sub> / D-Ins(2,3,4,5,6)P <sub>5</sub>	→ InsP <sub>6</sub> → D-5-PP-InsP <sub>5</sub>	10,5	30	459*	3'-OH-Kinase/ 5'-P- Kinase
D-Ins(2,3,4,5,6)P <sub>5</sub> / D-Ins(1,2,4,5,6)P <sub>5</sub>	→ InsP <sub>6</sub> → D-5-PP-InsP <sub>5</sub>	5,3	30	142*	1'-OH-Kinase/ 5'-P- Kinase
D-Ins(2,3,4,5,6)P <sub>5</sub>	→ InsP <sub>6</sub> → D-5-PP-InsP <sub>5</sub>	4,5	3	92*	1'-OH-Kinase/ 5'-P- Kinase
D-Ins(2,3,4,5,6)P <sub>5</sub>	→ InsP <sub>6</sub> → D-5-PP-InsP <sub>5</sub>	10,3	3	149*	1'-OH-Kinase/ 5'-P- Kinase
D-Ins(1,2,3,4,5)P <sub>5</sub>	→ InsP <sub>6</sub> → D-5-PP-InsP <sub>5</sub>	3,5	5	25*	6'-OH-Kinase/ 5'-P- Kinase
D-Ins(1,2,3,5,6)P <sub>5</sub>	→ InsP <sub>6</sub> → D-5-PP-InsP <sub>5</sub>	4,2	30	2*	4'-OH-Kinase/ 5'-P- Kinase
D-Ins(1,2,3,4,6)P <sub>5</sub>	→ InsP <sub>6</sub> → D-5-PP-InsP <sub>5</sub>	4	30	18*	5'-OH-Kinase/ 5'-P- Kinase
D-Ins(1,2,4,5,6)P <sub>5</sub> / D-Ins(2,3,4,5,6)P <sub>5</sub>	→ PP-InsP <sub>4</sub> (y)	10,5	30	7	P- Kinase
D-Ins(2,3,4,5,6)P <sub>5</sub> / D-Ins(1,2,4,5,6)P <sub>5</sub>	→ PP-InsP <sub>4</sub> (y)	5,3	30	51	P- Kinase
D-Ins(2,3,4,5,6)P <sub>5</sub>	→ PP-InsP <sub>4</sub> (y)	4,5	3	9	P- Kinase
D-Ins(2,3,4,5,6)P <sub>5</sub>	→ PP-InsP <sub>4</sub> (y)	10,3	3	12	P- Kinase
D-Ins(1,2,3,4,5)P <sub>5</sub>	→ PP-InsP <sub>4</sub> (x)	3,5	5	33	P- Kinase
D-Ins(1,2,3,5,6)P <sub>5</sub>	→ PP-InsP <sub>4</sub> (x)	4,2	30	17	P- Kinase
D-Ins(1,3,4,5,6)P <sub>5</sub>	→ PP-InsP <sub>4</sub> (z)	5	30	171	P- Kinase
D-Ins(2,4,5,6)P <sub>4</sub>	→ D-Ins(2,3,4,5,6)P <sub>5</sub> → InsP <sub>6</sub> → D-5-PP-InsP <sub>5</sub>	5	30	30*	3'-OH-Kinase/ 5'-P- Kinase
D-Ins(1,2,4,5)P <sub>4</sub>	→D-Ins(1,2,3,4,5)P <sub>5</sub> →PP-InsP <sub>4</sub> (x)	5	120	2*	3'-OH-Kinase/ P- Kinase
D-Ins(1,3,4,6)P <sub>4</sub>	→D-Ins(1,3,4,5,6)P <sub>5</sub> →PP-InsP <sub>4</sub> (z)	5	120	2*	5'-OH-Kinase/ P- Kinase
D-Ins(1,2,5,6)P <sub>4</sub>	kein Umsatz	5	120		
D-Ins(1,4,5,6)P <sub>4</sub>	kein Umsatz	5	120		
D-Ins(2,3,4,5)P <sub>4</sub>	kein Umsatz	5	120		
D-Ins(2,4,5)P <sub>3</sub>	kein Umsatz	5	120		
D-Ins(1,4,5)P <sub>3</sub>	kein Umsatz	5	120		

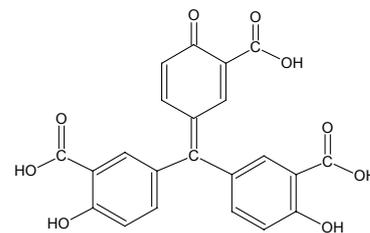
### 3.3. Inhibitoren der IP6K-2-Aktivität

#### 3.3.1. Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte für ausgewählte polyphenolische Inhibitoren

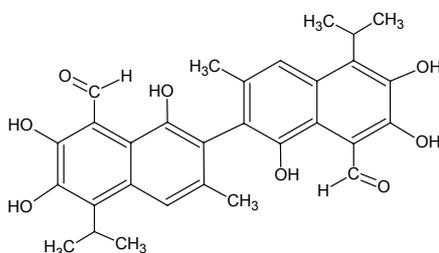
Basierend auf den Ergebnissen von Mayr *et al.* [2004] wurden sechs polyphenolische Substanzen ausgewählt, die sich gegenüber der IP3K-A, -B und -C oder der IPMK als potente Inhibitoren erwiesen hatten und ihre Hemmeffekte auf die IP6K-2 untersucht. Auf diese Art sollten spezifische IP6K-2 Inhibitoren gefunden werden. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Hemmstoffe sind Aurintricarbonsäure (ATA; Abb. 3.3-2), Hypericin (Abb. 3.3-4), Gossypol (Abb. 3.3-3), (-)-Epicatechin-3-gallat (ECG; Abb. 3.3-1), 3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon (THF; Abb. 3.3-5) und Quercetin (Abb. 3.3-6).



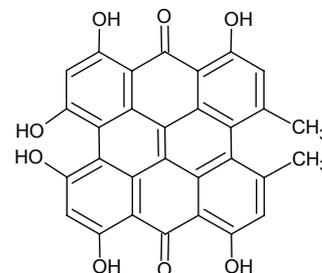
**Abb. 3.3-1: Struktur von Epicatechingallat (ECG).** ECG ist ein Catechin-Derivat mit einem Gallussäuresubstituenten. Von allen getesteten Hemmstoffen war ECG der potenteste Inhibitor der IP6K-2-Aktivität (IC<sub>50</sub> = 0,12 μM).



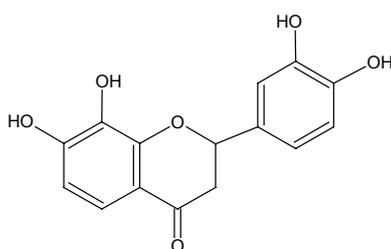
**Abb. 3.3-2: Struktur von Aurintricarbonsäure (ATA).** ATA ist ein Triphenylmethan-Analog mit sehr guter Hemmwirkung auf die IP6K-2 (IC<sub>50</sub> = 0,18 μM).



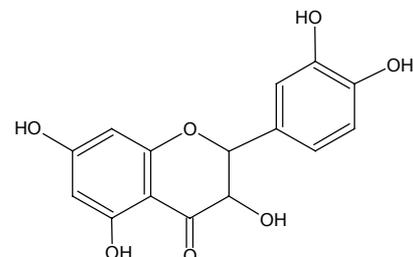
**Abb. 3.3-3: Struktur von Gossypol.** Gossypol ist ein Triterpen mit guter Hemmwirkung auf die IP6K-2 (IC<sub>50</sub> = 0,55 μM).



**Abb. 3.3-4: Struktur von Hypericin.** Hypericin ist ein Naphthodianthron, das lichtaktiviert wird. Es zeigt einen im Vergleich mit den anderen Inhibitoren eher niedrigen Hemmeffekt auf die IP6K-2-Aktivität (IC<sub>50</sub> = 0,72 μM).

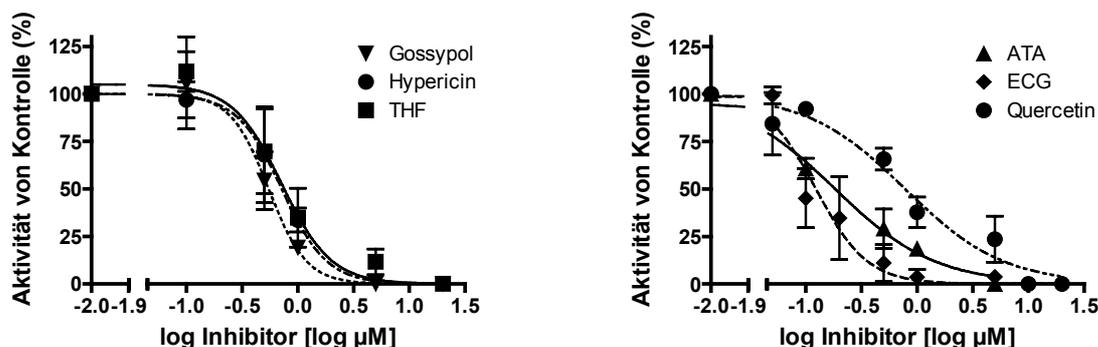


**Abb. 3.3-5: Struktur von 3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon (THF).** THF gehört zur Gruppe der Flavone. Der Effekt von THF auf die IP6K-2 ist vergleichbar mit dem von Hypericin (IC<sub>50</sub> = 0,72 μM).



**Abb. 3.3-6: Struktur von Quercetin.** Quercetin ist ein Flavonol. Von den getesteten Inhibitoren zeigte es den niedrigsten Hemmeffekt auf die IP6K-2-Aktivität (IC<sub>50</sub>=0,78 μM).

Für die ausgewählten Hemmstoffe wurden die halbmaximalen Inhibitor-Konzentrationen (IC<sub>50</sub>-Werte) bestimmt. Dazu wurden Messungen mit dem gekoppelten optischen Test unter Substratsättigung durchgeführt und die Hemmstoffkonzentration stufenweise erhöht, bis ein maximaler Hemmeffekt eintrat (2.4.10.3.). Die Konzentrations-Wirkungskurven sind in Abb. 3.3-7 dargestellt.



**Abb. 3.3-7: Konzentrations-Wirkungskurven für verschiedene polyphenolische Substanzen.** Die Inhibierung der IP6K-2 wurde unter Substratsättigung durchgeführt. Es wurde die IP6K-2-Aktivität mit dem gekoppelten optischen Test bei verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen gemessen. Die so ermittelten Aktivitäten wurden auf die Aktivität von Kontrollmessungen ohne Inhibitor bezogen. Jeder Datenpunkt ist ein Mittelwert aus drei unterschiedlichen Messungen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Alle ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte liegen im nanomolaren Bereich (Tab. 3.3-1). Als potenteste Inhibitoren der IP6K-2 erwiesen sich das Catechin-Derivat ECG mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0,12 µM und das Triphenylmethan-Analog ATA mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0,18 µM. Mit IC<sub>50</sub>-Werten von 0,55 µM für das Triterpen Gossypol, 0,72 µM für das Flavon THF sowie das Naphtodianthron Hypericin und 0,78 µM für das Flavonol Quercetin zeigten sich diese Substanzen ebenfalls als potente Hemmstoffe.

**Tab. 3.3-1: Zusammenfassung der IC<sub>50</sub>-Werte mit Standardabweichungen für verschiedene Inhibitoren der IP6K-2.**

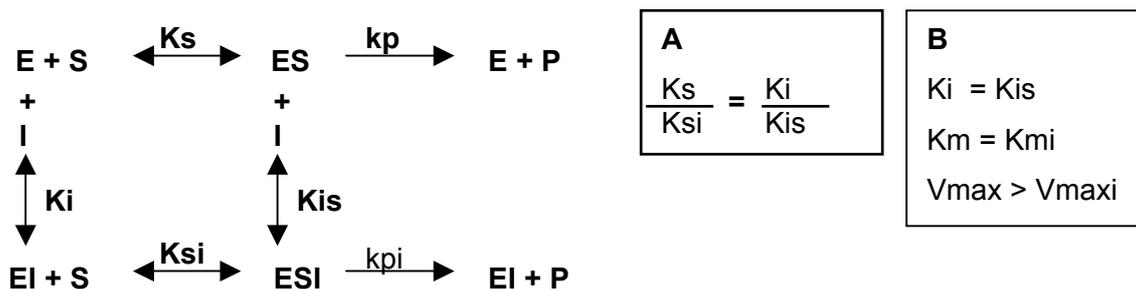
Hemmstoff	IC <sub>50</sub> [µM]	SD± [µM]
ECG	0,12	0,02
ATA	0,18	0,03
Gossypol	0,55	0,03
THF	0,72	0,08
Hypericin	0,72	0,03
Quercetin	0,78	0,15

## 3.3.2. Messung des Hemmstoffeinflusses auf die $K_m$ -Werte von $\text{InsP}_6$ und ATP

Die Hemmeffekte von ECG, Quercetin und THF wurden auf eine mögliche Konkurrenz gegenüber den Substraten  $\text{InsP}_6$  und ATP untersucht (2.4.10.4.). Hierbei wurde der Hemmeffekt bei IC60-Konzentrationen gemessen, während die  $\text{InsP}_6$ - bzw. die ATP-Konzentrationen variiert wurden. Die ermittelten Werte wurden nach Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk und Dixon aufgetragen und die spezifische maximale Reaktionsgeschwindigkeit,  $K_{m,app}$  sowie die Inhibitorkonstante  $K_i$  bestimmt (Tab. 3.3-2 und Tab. 3.3-3).

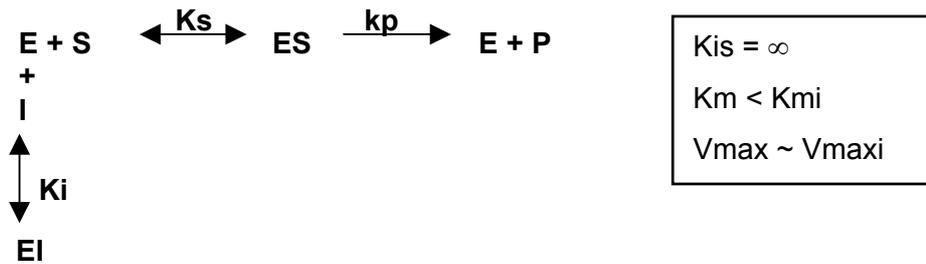
Die Hemmtypen wurden nach verschiedenen Kriterien bestimmt: Die wahrscheinlichsten graphischen Modelle wurden für die verschiedenen Auftragungen mit dem Kinetikmodul für Sigma Plot 8.0 ermittelt. Die Veränderungen der gefundenen  $K_{m,app}$ - und spezifischen  $V_{max}$ -Werte gegenüber Kontrollmessungen ohne Hemmstoff wurden ebenfalls berücksichtigt.

Beim nicht-kompetitiven Hemmtyp binden Inhibitor und Substrat an unterschiedlichen Stellen am Enzym. Der  $K_m$ -Wert für das Substrat wird also nicht beeinflusst. Unter Inhibitoreinfluss ist  $V_{max}$  aber niedriger und kann auch durch hohe Substratkonzentrationen nicht gesteigert werden (Abb. 3.3-8).



**Abb. 3.3-8: Allgemeine Geschwindigkeitsgleichung für die reversible Enzymhemmung.** Ein Hemmstoff I bindet an ein Enzym E und beeinflusst dessen Reaktionsgeschwindigkeit mit einem Substrat S. Bei einer partiellen Hemmung behält das Enzym katalytische Aktivität und kann S weiter zu dem Produkt P umsetzen. Bei einer vollständigen Hemmung bilden I und E einen inaktiven *Dead-End*-Komplex. In diesem Fall kann die Dissoziationskonstante  $k_{pi}$  vernachlässigt werden. Die beiden Dissoziationskonstanten für das Substrat  $K_s$  und  $K_{si}$  stehen in gleichem Verhältnis zueinander wie die Dissoziationskonstanten  $K_i$  und  $K_{is}$  (**A**). Bei der nicht-kompetitiven Hemmung eines Enzyms durch einen Hemmstoff bindet dieser an anderer Stelle als das Substrat und unabhängig davon an das Enzym und die Dissoziationskonstanten beeinflussen sich gegenseitig nicht (**B**). Da sich die Substrataffinität des Enzyms unter Hemmstoffeinfluss nicht ändert, bleibt der  $K_m$ -Wert unverändert. Die Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{max}$  nimmt jedoch ab, da ein Anteil des Enzyms im inaktiven ESI-Komplex vorliegt.

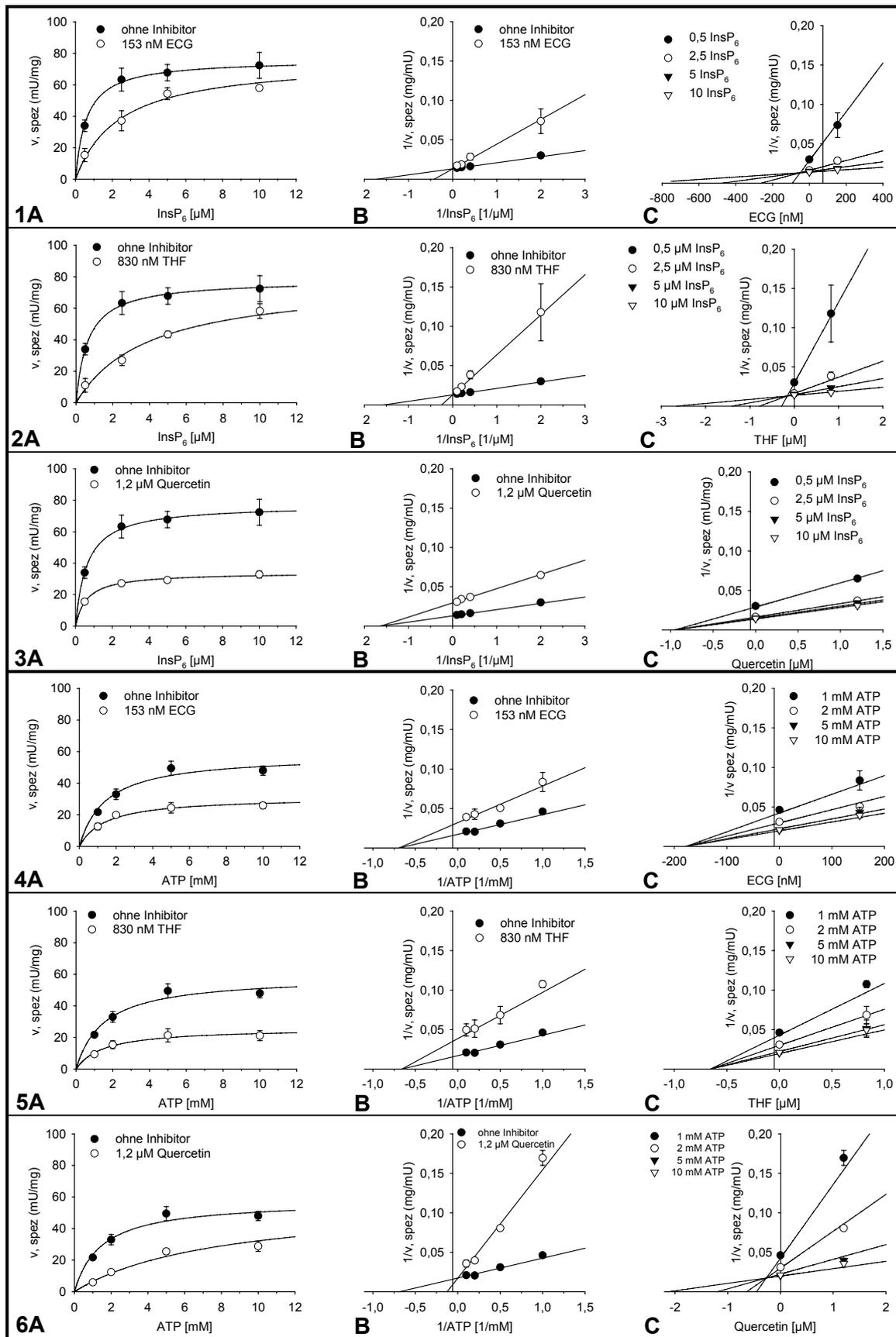
Dagegen konkurriert beim kompetitiven Hemmtyp der Inhibitor mit dem Substrat um die gleiche Bindungsstelle am Enzym, dadurch erhöht sich der  $K_m$ -Wert für das Substrat. Bei genügend hoher Substratkonzentration bleibt  $V_{max}$  jedoch gleich (Abb. 3.3-9).



**Abb. 3.3-9: Mechanismus der kompetitiven Hemmung.** Der Hemmstoff I konkurriert mit dem Substrat S um dieselbe Bindungsstelle am Enzym E, und vermindert dadurch die Substrataffinität des Enzyms. Der  $K_m$ -Wert erhöht sich also unter Hemmstoffeinfluss, während  $V_{max}$  bei genügend hoher Substratkonzentration gleich bleibt. Die Dissoziationskonstante  $K_{is}$  (Abb. 3.3-8) kann bei diesem Hemmtyp vernachlässigt werden.

Im Michaelis-Menten-Diagramm nähern sich beim kompetitiven Hemmtyp die Kurven der Enzymaktivitäten unter Hemmstoffeinfluss bei hohen Substratkonzentrationen der Normalaktivität der Kontrollen an (z.B. Abb. 3.3-10 1A). Bei einer nicht-kompetitiven Hemmung verlaufen die Kurven der Enzymaktivitäten unter Hemmstoffeinfluss auch bei hohen Substratkonzentrationen weitgehend parallel und unterhalb der Normalaktivität (z.B. Abb. 3.3-10 3A). Da die Kurvenverläufe im Michaelis-Menten-Diagramm z.T. keinen eindeutigen Schluss auf den Hemmtyp zuließen, wurden die Daten zusätzlich doppelt-reziprok nach Lineweaver-Burk und nach Dixon aufgetragen. Im Lineweaver-Burk-Diagramm wird ein kompetitiver Hemmtyp durch einen Schnittpunkt der Regressionsgeraden auf der Ordinate (z.B. Abb. 3.3-10 1B) und ein nicht-kompetitiver Hemmtyp durch einen Schnittpunkt auf der Abszisse (z.B. Abb. 3.3-10 3B) dargestellt. Dagegen liegen im Dixon-Diagramm die Schnittpunkte der Regressionsgeraden beim kompetitiven Hemmtyp nicht auf der Ordinate, aber oberhalb der Abszisse (z.B. Abb. 3.3-10 1C) und beim nicht-kompetitiven Hemmtyp genau auf der Abszisse (z.B. Abb. 3.3-10 3C).

ECG und THF erwiesen sich in ihrer Art der Hemmung ähnlich zueinander, während Quercetin andere Hemmtypen zeigte. Bezogen auf das Substrat  $\text{InsP}_6$  wirkten ECG und THF kompetitiv (Abb. 3.3-10 1 und 2), während sich gegenüber ATP ein nicht-kompetitiver Hemmtyp als am wahrscheinlichsten erwies (Abb. 3.3-10 4 und 5). Quercetin dagegen wirkt offenbar genau umgekehrt, d.h. nicht-kompetitiv gegenüber  $\text{InsP}_6$  (Abb. 3.3-10 3) und kompetitiv zu ATP (Abb. 3.3-10 6).



**Abb. 3.3-10: Graphische Darstellung der Hemmwirkung durch ECG, THF und Quercetin. 1-3:** Hemmtypen in Bezug auf das Substrat InsP<sub>6</sub>; **4-6:** Hemmtypen in Bezug auf das Substrat ATP; **A:** Michaelis-Menten-Diagramm; **B:** doppelt-reziproke Darstellung nach Lineweaver-Burk. Die Schnittpunkte der Regressionsgeraden ergeben die reziproken  $K_{m,app}$ -Werte; **C:** Replot nach Dixon. Die Schnittpunkte der Regressionsgeraden ergeben die  $K_i$ -Werte.

**Tab. 3.3-2: Zusammenfassung der Wirkung der Hemmstoffe auf die IP6K-2-Aktivität bezüglich dem Substrat InsP<sub>6</sub>.**

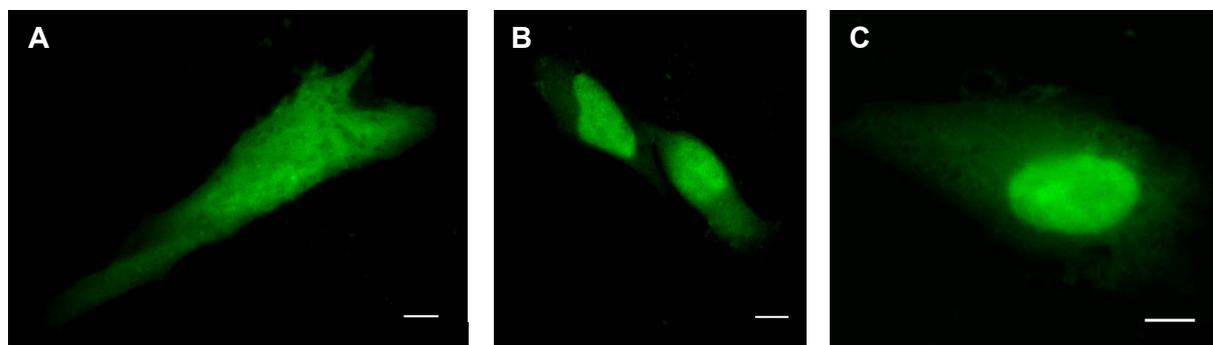
Hemmstoff	Hemmtyp	IC60 [nM]	spez. Vmax (mU/mg)	Km <sub>app</sub> [μM]	Ki [nM]
ECG	kompetitiv	153	71 ± 7	2,0 ± 0,6	50 ± 17
Quercetin	nicht-kompetitiv	1200	34 ± 1	0,6 ± 0,1	946 ± 139
THF	kompetitiv	830	81 ± 8	4,7 ± 1,0	160 ± 48
Kontrolle		0,2 % DMSO	82 ± 5	0,7 ± 0,2	

**Tab. 3.3-3: Zusammenfassung der Wirkung der Hemmstoffe auf die IP6K-2-Aktivität bezüglich dem Substrat ATP.**

Hemmstoff	Hemmtyp	IC60 [nM]	spez. Vmax (mU/mg)	Km <sub>app</sub> [μM]	Ki [nM]
ECG	nicht-kompetitiv	153	30 ± 2	1,2 ± 0,3	178 ± 28
Quercetin	kompetitiv	1200	45 ± 6	4,8 ± 1,4	269 ± 63
THF	nicht-kompetitiv	830	26 ± 3	1,4 ± 0,6	656 ± 109
Kontrolle		0,2 % DMSO	59 ± 4	1,5 ± 0,4	

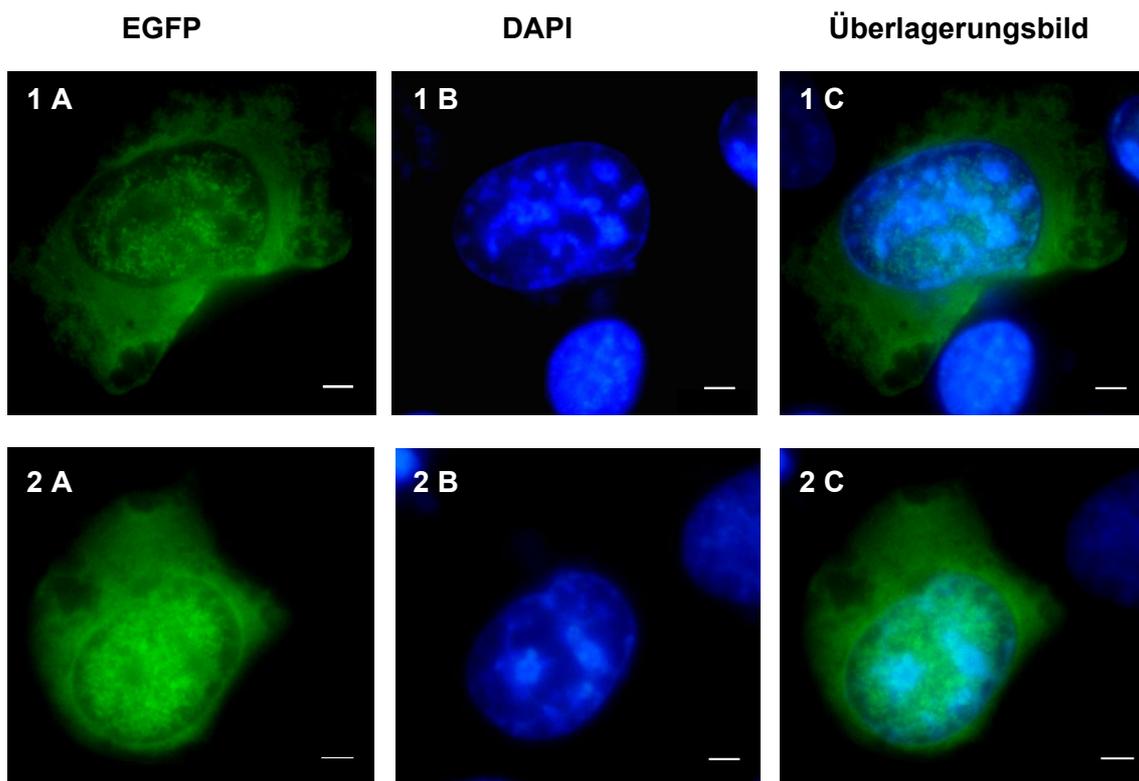
### 3.4. Lokalisation der HsIP6K-2

Saiardi und Mitarbeiter [2001<sup>b</sup>] zeigten, dass das EGFP-IP6K-2-Fusionsprotein in HEK293-Zellen überwiegend im Zellkern lokalisiert ist. Diese Aussage wurde in der vorliegenden Arbeit durch Transfektion einer menschlichen (H1299) und einer Ratten-Zelllinie (NRK52E) mit dem EGFP-IP6K-2-Fusionsprotein überprüft.



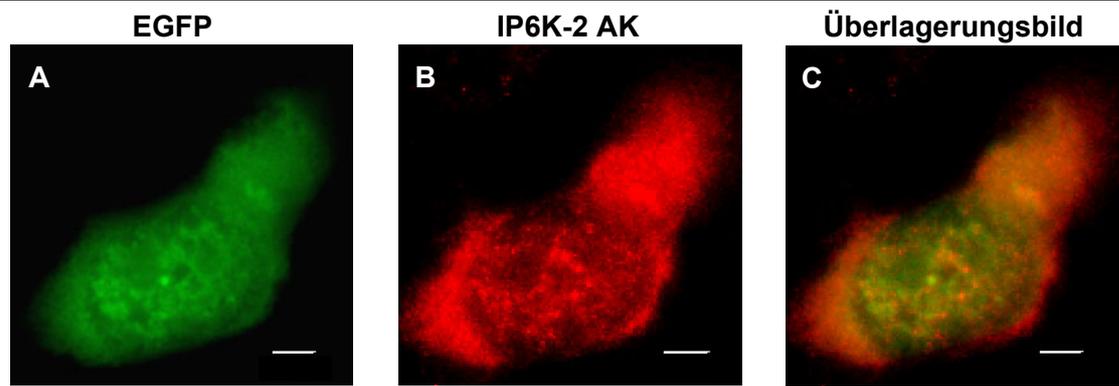
**Abb. 3.4-1: Lokalisation von EGFP und des EGFP-IP6K-2-Fusionsproteins in NRK52E-Zellen.** NRK52E-Zellen wurden mit dem Plasmid EGFP-N1 (A) oder dem EGFP-IP6K-2-Fusionsprotein transfiziert (B und C). Nach 24stündiger Expression wurden die Zellen fixiert und mit dem Fluoreszenzmikroskop bei 1000facher optischer Vergrößerung betrachtet. Der weiße Balken zeigt 10 μm.

Zumindest für die NRK52E-Zellen konnte bei 85 % der transfizierten Zellen eine solche subzelluläre Lokalisation des Fusionsproteins gefunden werden (Abb. 3.4-1). Allerdings war die Transfektionsrate sehr gering ( $< 5\%$ ). In H1299-Zellen war die EGFP-IP6K-2 ubiquitär über den gesamten Zellkörper verteilt (Abb. 3.4-2). Im Zellkern war eine „Strukturierung“ der Fluoreszenz erkennbar. Bereiche mit kondensiertem Chromatin, das wahrscheinlich Heterochromatin ist und das durch DAPI stark angefärbt wird, zeigten keine oder nur geringe EGFP-Fluoreszenz. Auch in H1299-Zellen war die Transfektionsrate mit dem EGFP-IP6K-2-Fusionsprotein gering (5%).

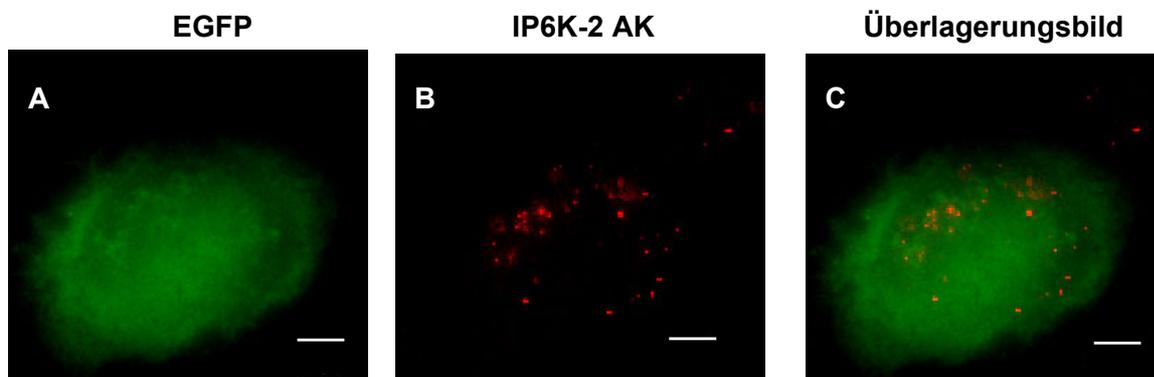


**Abb. 3.4-2: Lokalisation des EGFP-IP6K-2-Fusionsproteins in H1299-Zellen.** H1299-Zellen wurden mit dem EGFP-IP6K-2-Fusionsprotein transfiziert. Nach 24stündiger Expression wurden die Zellen fixiert, mit DAPI gefärbt und mit dem Fluoreszenzmikroskop bei 1000facher optischer Vergrößerung betrachtet. 1 A und 2 A: EGFP-Fluoreszenz; 1 B und 2 B: DAPI-Färbung der DNA; 1 C und 2 C: Überlagerungsbilder der EGFP- und DAPI-Fluoreszenz. Der weiße Balken zeigt 10 µm.

Da sich das EGFP-Fusionsprotein bezüglich der subzellulären Lokalisation unterschiedlich in den verschiedenen Ziellinien verhielt, wurde versucht, endogene IP6K mit Hilfe des IP6K-2-Antikörpers nachzuweisen. Zuvor wurde festgestellt, dass das Antikörpersignal in mit EGFP-IP6K-2 transfizierten Zellen mit dem EGFP-Signal kolokalisiert (Abb. 3.4-3). Um auszuschließen, dass der Antikörper unspezifisch an EGFP bindet, wurde H1299-Zellen mit einem EGFP-IPMK-Fusionsprotein transfiziert, das ein IPMK-Fragment enthielt (Abb. 3.4-4; kloniert und zur Verfügung gestellt von M. Nalaskowski). Hier konnte nur eine Antikörperfluoreszenz im Zellkern festgestellt werden, die der von untransfizierten Zellen ähnelte.

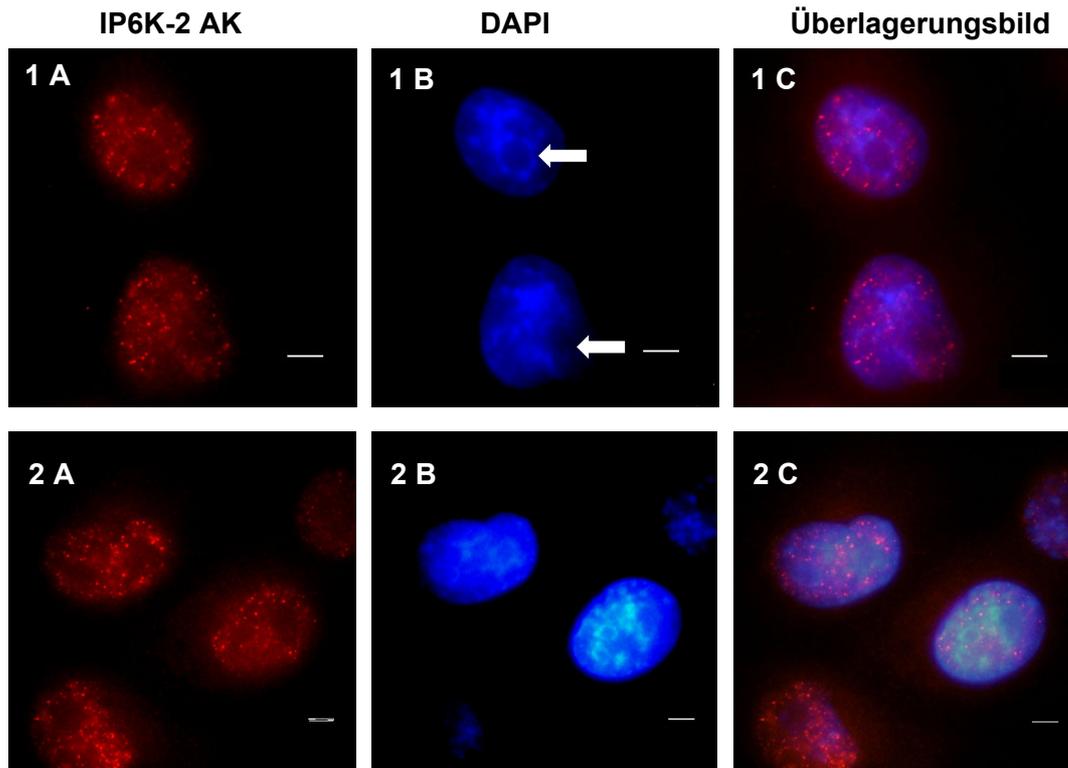


**Abb. 3.4-3: Überprüfung des IP6K-2-Antikörpers mit Hilfe des EGFP-IP6K-2-Fusionsproteins in H1299-Zellen.** H1299-Zellen wurden mit dem EGFP-IP6K-2-Fusionsprotein transfiziert. Nach 24stündiger Expression wurden die Zellen fixiert und mit dem Fluoreszenzmikroskop bei 1000facher optischer Vergrößerung betrachtet. **A:** EGFP-Fluoreszenz; **B:** Markierung des EGFP-IP6K-2-Fusionsproteins mit dem IP6K-2-Antikörper; **C:** Überlagerungsbild aus A und B. Bereiche stärkerer Grünfluoreszenz deuten auf proteolytischen Spaltung des EGFP von der IP6K-2 oder allgemein auf proteolytische Degradierung der IP6K-2 hin, welche die AK-Erkennungssequenz betrifft. Der weiße Balken zeigt 10  $\mu\text{m}$ .



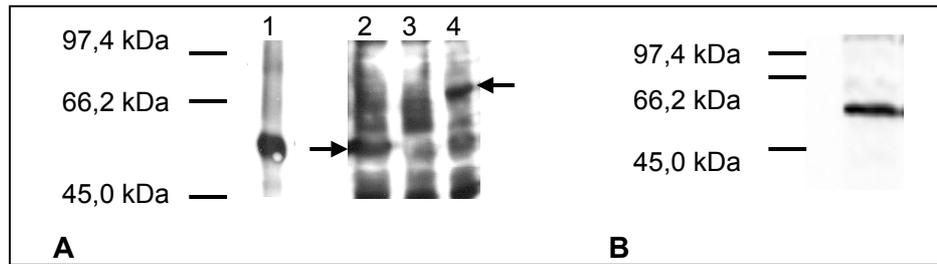
**Abb. 3.4-4: Überprüfung des IP6K-2-Antikörpers mit Hilfe eines EGFP-IPMK-Fusionsproteins in H1299-Zellen.** H1299-Zellen wurden mit dem EGFP-IPMK-Fusionsprotein transfiziert. Nach 24stündiger Expression wurden die Zellen fixiert und mit dem Fluoreszenzmikroskop bei 1000facher optischer Vergrößerung betrachtet. **A:** EGFP-Fluoreszenz; **B:** Markierung des EGFP-IP6K-2-Fusionsproteins mit dem IP6K-2-Antikörper; **C:** Überlagerungsbild aus A und B. Der weiße Balken zeigt 10  $\mu\text{m}$ .

In untransfizierten H1299-Zellen konnte eine Markierung der gesamten Zelle, aber besonders des Zellkerns durch den IP6K-2-Antikörper beobachtet werden (Abb. 3.4-5). Im Zellkern konnte eine ähnliche Verteilung wie für das EGFP-Fusionsprotein nachgewiesen werden. Auch hier ist die Lokalisation offenbar auf putativ euchromatische Bereiche beschränkt (Abb. 3.4-5 C). Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die Bereiche der Nukleoli (Abb. 3.4-5 Pfeile) im Zellkern offenbar keine IP6K beinhalten. Da die beobachteten punktförmigen Ansammlungen der IP6K-2 Teil subnukleärer Strukturen, wie z.B. *Speckles* sein könnten, wurde versucht, eine Kolokalisation der IP6K-2 und prä-messenger RNA *Splicing*-Faktoren mit einer Doppelmarkierung durch den IP6K-2- und den SC-35-Antikörper nachzuweisen. Der SC-35-Antikörper ist gegen SC-35, einen prä-messenger RNA *Splicing*-Faktor, gerichtet. Eine Kolokalisation konnte nicht gefunden werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Die beobachteten punktförmigen IP6K-2-Strukturen sind demnach kein Bestandteil von nukleären *Speckles*.



**Abb. 3.4-5: Lokalisation endogener IP6K in H1299-Zellen.** H1299-Zellen wurden fixiert, mit DAPI gefärbt und dem IP6K-2-Antikörper markiert. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte bei 1000facher optischer Vergrößerung. **1 A** und **2 A**: Markierung des EGFP-IP6K-2-Fusionsproteins mit dem IP6K-2-Antikörper; **B**: DAPI-Färbung der DNA; **C**: Überlagerungsbilder aus A und B. Der IP6K-2-Antikörper wurde ursprünglich mit einem grün-fluoreszierenden sekundären Antikörper markiert. Um diese Markierung gegenüber dem blau-fluoreszierenden DAPI besser hervorzuheben, wurde das grüne Signal digital in ein rotes Signal konvertiert. Die weißen Pfeile in 1 B markieren exemplarisch Bereiche der Zellkerne in denen Nukleoli liegen. Der weiße Balken zeigt 10  $\mu\text{m}$ .

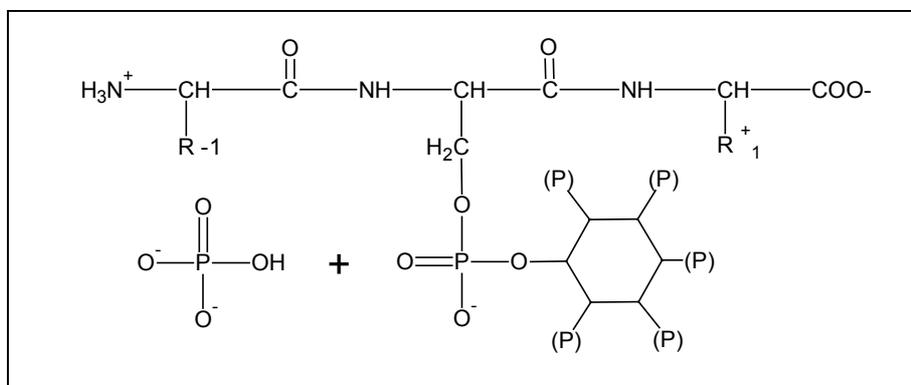
Um die Spezifität des IP6K-2-Antikörpers für endogene IP6K zu überprüfen, wurde ein *Western-Blot* mit Lysaten (2.5.9.) von EGFP-IP6K-2 transfizierten und untransfizierten H1299-Zellen durchgeführt (Abb. 3.4-6 A). In Überständen von Lysaten aus mit dem Fusionsprotein transfizierten Zellen war eine Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht des Fusionsproteins nachweisbar. In untransfizierten Zellen konnte eine Bande bei etwa 50 kDa beobachtet werden, die dem Molekulargewicht einer endogenen IP6K entspricht. Zusätzlich traten sowohl bei Lysaten aus transfizierten sowie untransfizierten Zellen eine Reihe von unspezifischen Signalen auf, die auf einen degradierten Sekundär-Antikörper zurückzuführen waren. Eine Wiederholung des Experiments mit untransfizierten H1299-Zellen und „frischen“ Antikörpern zeigte eine dominante Bande von etwa 50 kDa, die damit der Größe einer endogenen IP6K entspricht (Abb. 3.4-6 B).



**Abb. 3.4-6: Immunologischer Nachweis von HsIP6K-2 in Lysaten von H1299-Zellen durch Western-Blot.** **A:** Spur 1: 5 µg rekombinante His-HsIP6K-2 (49 kDa). Ins Spur 2-4 wurden Lysate eines Zellrasens von je zweimal 1,9 cm<sup>2</sup> Kulturfläche aufgetragen. Spur 2: unfraktioniertes Lysat untransfizierter Zellen. Spur 3: Pellet nach Lyse von EGFP-HsIP6K-2 transfizierten Zellen. Spur 4: Überstand nach Lyse von EGFP-HsIP6K-2 transfizierten Zellen. **B:** Wiederholung des *Western-Blots* mit untransfizierten H1299-Zellen (Der *Blot* wurde von S. Windhorst zur Verfügung gestellt.). Die His-HsIP6K-2 hat ein Molekulargewicht von 49 kDa und die EGFP-HsIP6K-2 von 75 kDa (49 kDa IP6K-2 plus 26 kDa EGFP). Es wurde der anti-Ratte-IP6K-2-Antikörper verwendet. Die Spuren 1-4 entstammen dem selben SDS-Gel, wurden aber unterschiedlich lange (1, 2-4) mit einem ECL-Film exponiert und sind aus diesem Grund getrennt dargestellt. Die schwarzen Pfeile markieren die IP6K bzw. EGFP-IP6K-Banden.

### 3.5. Markierung gereinigter fetaler Rattenleberextrakten mit InsP<sub>6</sub>/PP-InsP<sub>5</sub>

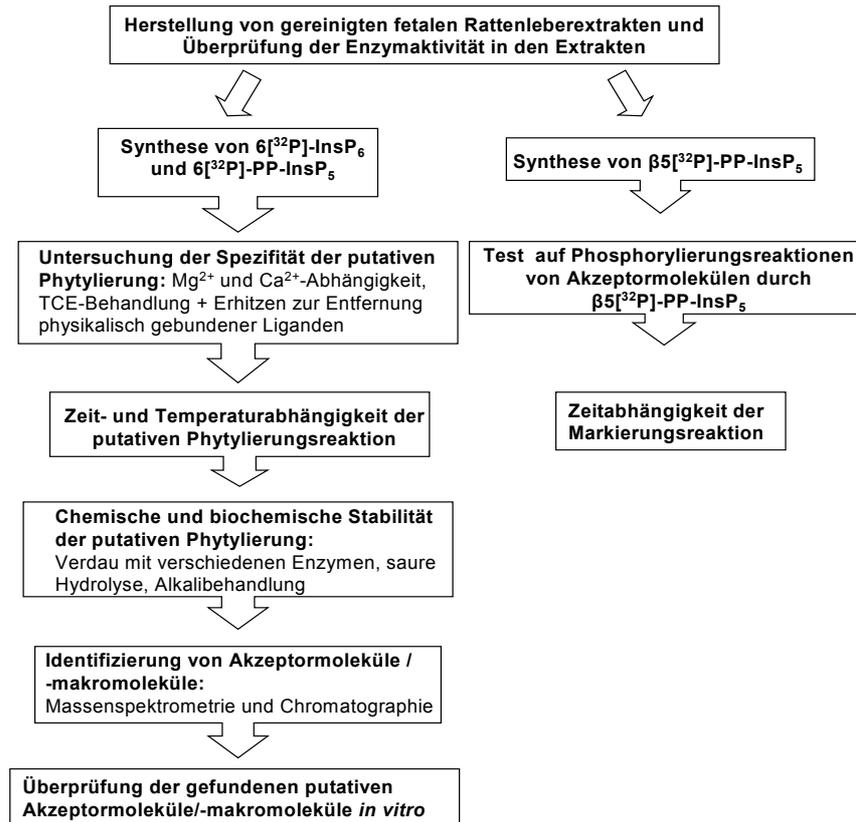
Es sollte im zweiten Teil der Arbeit zur Funktion vor allem der pyrophosphorylierten Produkte der IP6K-2 (PP-InsP<sub>4</sub>- und PP-InsP<sub>5</sub>-Derivate) untersucht werden, ob sich Proteine oder andere zelluläre Moleküle selektiv mit hochphosphorylierten Inositolphosphaten markieren lassen. Ansatzpunkt für diese Idee waren Versuche von S. Haverland [2001], der durch Proteolyse Inositolphosphate aus hochsalzgewaschenen fetalen Rattenleber- und Rattenherzextrakten freisetzen konnte. Er postulierte eine kovalente Bindung von InsP an Proteine, eine sogenannte „Phytylierung“ (Abb. 3.5-1), die eine posttranslationale Modifizierung von Proteinen darstellen könnte. Bei dieser Bindung sollte es sich um ein Phosphodiesterkonjugat handeln, das über eine Phosphatgruppe des InsP und die Hydroxygruppe einer Aminosäure (Serin, Threonin oder Tyrosin) gebildet wird.



**Abb. 3.5-1: Mögliche Phytylierungsreaktion von PP-InsP<sub>5</sub> über die Aminosäure Serin an ein Peptid.** Bei dieser Reaktion würde eine Phosphatgruppe vom InsP-Gerüst abgespalten. Phosphatgruppen werden vereinfacht mit (P) dargestellt, R+1 und R-1 stehen für beliebigen Aminosäuregruppe. Abbildung vereinfacht nach S. Haverland [2001].

Da Ergebnisse von Haverland auf Extraktion von Rattenlebern und -herzen beruhen, muss der Nachweis erbracht werden, dass sich solche Gewebe auch mit hochphosphorylierten InsP markieren lassen. Für diese Markierungsversuche wurden hochsalzgewaschene, also von unspezifisch gebundenen InsP befreite, Gewebeextrakte verwendet (2.4.14.). Die Extrakte entstammten fetalen Rattenlebern, da sich aus diesen nach Haverland deutlich mehr InsP extrahieren ließen als aus Herzen und adultem Gewebe. Außerdem wurden diese Extrakte mittels differentieller Zentrifugation grob nach Zellbestandteilen fraktioniert. Als Detektionsmethode für eine putative Phytylierung wurde eine Markierung von InsP<sub>6</sub> und PP-InsP<sub>5</sub> mit <sup>32</sup>P etabliert, die sich in α-Position am Inositolring befand (3.5.2.), um unspezifische Phosphorylierungen nach einer Abspaltung der Pyrophosphatgruppe im PP-InsP<sub>5</sub> zu vermeiden. Die Markierungsreaktionen wurden anfangs in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen „freier“, d.h. nicht gebundener Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-Ionen durchgeführt, um zu überprüfen, ob die in SDS-Gelen detektierten putativen Phytylierungsbanden auf eine Komplexierung der InsP mit zweiwertigen Kationen zurückzuführen sind und ob möglicherweise Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-aktivierte Enzyme in die Markierungsreaktion involviert sind. Markierte Rattenleberextrakte wurden anschließend mit TCE gefällt, um physikalisch assoziierte InsP zu entfernen. Zusätzlich wurde untersucht, ob durch Erhitzen der markierten Rattenleberextrakte vor dem Auftrag auf ein SDS-Gel die radioaktive Markierung physikalisch entfernt werden kann und welchen Einfluss diese Behandlung auf das Laufverhalten der Probe im SDS-Gel hat. Da angenommen wurde, dass es sich bei der putativen Phytylierung um eine enzymatisch katalysierte kovalente Transferase-Reaktion handelt, wurde die Zeit- und Temperaturabhängigkeit der Markierungsreaktion getestet. Zur Identifizierung von möglichen Akzeptormolekülen für eine Phytylierung wurden markierte Rattenleberextrakte mit Proteasen und DNase I verdaut, da neben einer posttranslationalen Modifizierung von Proteinen auch eine Bindung an andere Zellstrukturen mit Hydroxygruppen, wie z.B. DNA denkbar ist. Da die Ergebnisse auf eine Modifizierung von Proteinen durch InsP<sub>6</sub>/PP-InsP<sub>5</sub> hindeuteten, wurden radioaktiv-markierte SDS-Gelbanden massenspektrometrisch untersucht und die so identifizierten putativen Akzeptormoleküle *in vitro* analysiert. Ursprünglich war geplant, mögliche Phetylpeptide chromatographisch über das gebundene InsP zu isolieren und die so gewonnenen Peptide ebenfalls massenspektrometrisch zu untersuchen. Aus technischen Gründen war dies leider nicht möglich, daher sind die Ergebnisse der Chromatographie im Anhang der Arbeit gezeigt.

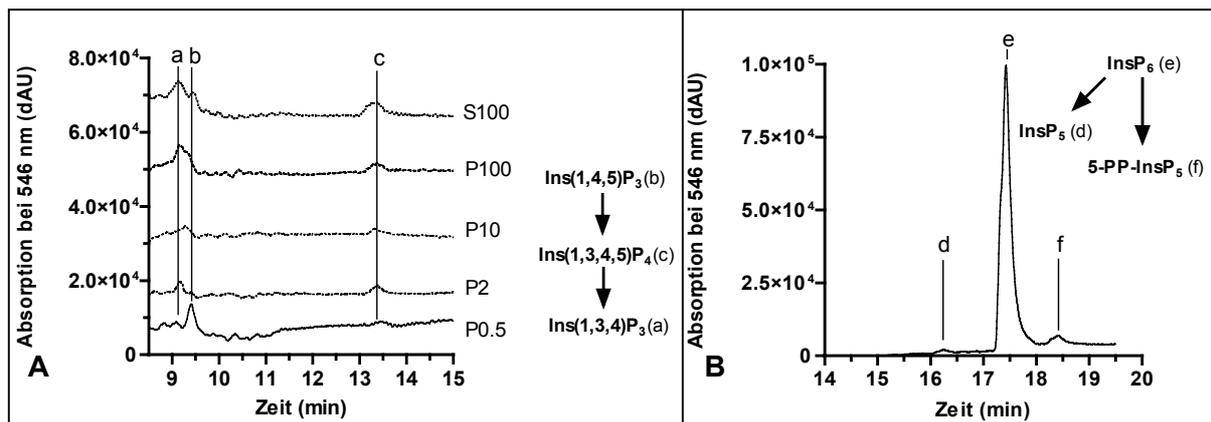
Eine weitere Versuchsreihe zur Markierung von Rattenleberextrakten wurde mit 5β[<sup>32</sup>P]-PP-InsP<sub>5</sub> durchgeführt. Hier sollte geklärt werden, ob die putative kovalente Markierung von Akzeptormolekülen möglicherweise auf normale Phosphorylierungsreaktionen mit PP-InsP<sub>5</sub> als energiereichem Phosphat-Donator zurückzuführen ist und ob die Markierungsreaktion, wie angenommen, über die Abspaltung der Pyrophosphatgruppe erfolgt. Eine Übersicht der durchgeführten Arbeitsschritte ist in Abb. 3.5.-2 gezeigt.



**Abb. 3.5-2: Flussdiagramm der Arbeitsschritte zur Identifizierung von Akzeptormolekülen für hochphosphorylierte InsP.**

### 3.5.1. Enzymatische Aktivität der gereinigten Rattenleberextrakte

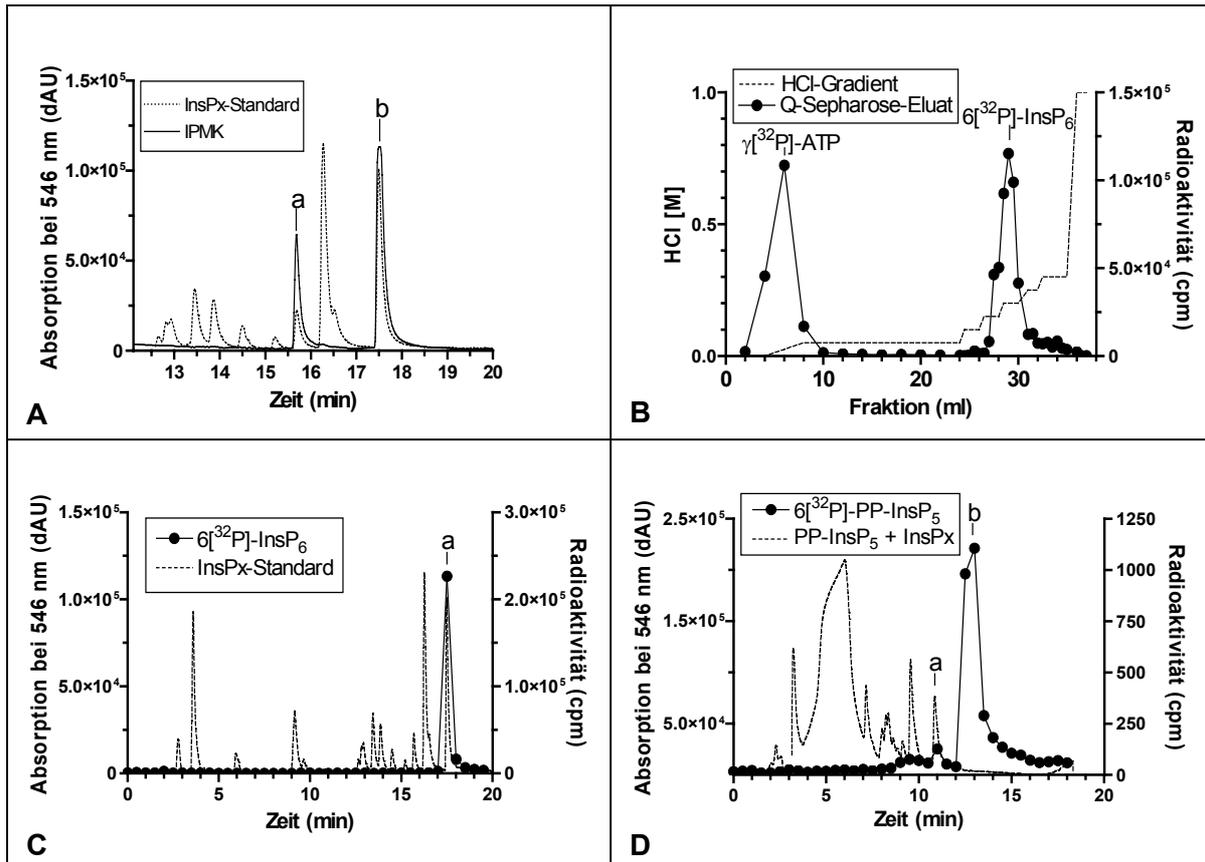
Die gereinigten Extrakte aus fetalen Rattenlebern (2.4.14.) wurden vor Beginn auf IP-Kinase-Aktivität überprüft (2.4.15.). Da bisher kein Enzym bekannt ist, das PP-InsP<sub>5</sub> oder andere hochphosphorylierte Inositolphosphate auf Proteine oder andere zelluläre Zielmoleküle überträgt, wurden die IP3K- und die IP6K-Reaktionen als Maß für enzymatische Aktivität, also die biochemische Qualität der Extrakte (Abwesenheit von Proteolyse), gewählt. Leberextrakte, die mit differentieller Zentrifugation fraktioniert wurden, wurden mit 4 µM D-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> bzw. Extrakt der P2-Fraktion mit 5 µM InsP<sub>6</sub> inkubiert. Die P2-Fraktion soll hauptsächlich Zellkerne und schwere Membranen enthalten und wurde daher für eine Überprüfung der IP6-Kinase-Reaktion ausgewählt, denn rekombinante GFP-IP6K-2-Fusionsproteine sowie endogene IP6K-2 sind überwiegend im Zellkern lokalisiert [Saiardi *et al.*, 2001<sup>b</sup> und eigene Ergebnisse 3.4.]. Die Inkubationszeiten betragen 8 min und 30 min für D-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> und 15 min und 60 min für InsP<sub>6</sub>. In allen Extrakten konnte über das Produkt D-Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> eine IP3K-Aktivität und für den P2-Extrakt über das Produkt PP-InsP<sub>5</sub> eine IP6K-Aktivität nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der MDD-HPLC-Analyse sind in Abb. 3.5-3 A und B dargestellt.



**Abb. 3.5-3: Umsatz von Inositolphosphaten *in vitro* durch gereinigte fetale Rattenleberextrakte.** **A:** Umsatz von 4 μM D-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> durch je 100 μg gereinigten Rattenleberextrakt der P0.5-, P2-, P10-, P100- und S100-Fraktion nach 8 min. **B:** Umsatz von 5 μM InsP<sub>6</sub> durch 100 μg gereinigten Rattenleberextrakt der P2-Fraktion nach 60 min. Gezeigt sind die Chromatogramme der Analyse mit MDD-HPLC. D-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> (b) wurde zu D-Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> (c) bzw. InsP<sub>6</sub> (e) zu PP-InsP<sub>5</sub> (f) umgesetzt. Die Dephosphorylierungsprodukte von InsP-Phosphatase-Aktivitäten waren wahrscheinlich D-Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> (a) und D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> oder D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub> (d).

### 3.5.2. Enzymatische Synthese von 6[<sup>32</sup>P]-PP-InsP<sub>5</sub>

Mit <sup>32</sup>P-markiertes InsP<sub>6</sub> und PP-InsP<sub>5</sub> wurden durch enzymatische Synthese mit den Enzymen IPMK und IP6K-2 hergestellt (2.4.13.2.). Die einzelnen Synthese- und Reinigungsschritte wurden mit MDD-HPLC überprüft. In Abb. 3.5-4 A ist ein repräsentatives Chromatogramm der InsP<sub>6</sub>-Synthese mit IPMK dargestellt. Nach Beenden der enzymatischen Reaktion wurden die InsP über einen Anionenaustauscherchromatographie (Abb. 3.5-4 B) im Minimaßstab vom restlichen γ-[<sup>32</sup>P]-ATP getrennt. Die Reinheit der so gewonnenen radioaktiven InsP<sub>6</sub>-Fraktionen wurde durch Kochromatographie mit einem InsP<sub>x</sub>-Standard über MDD-HPLC und anschließender Bestimmung der Radioaktivität in den gesammelten Fraktionen überprüft (Abb. 3.5-4 C). Auf diese Art war es möglich, nahezu ATP-freies radioaktives InsP<sub>6</sub> zu erhalten (etwa 1 % γ-[<sup>32</sup>P]-ATP-Kontamination), das anschließend mit IP6K-2 zu 6[<sup>32</sup>P]-PP-InsP<sub>5</sub> umgesetzt wurde. Die Zusammensetzung der radioaktiv-markierten InsP wurde ebenfalls durch Fraktionierung über MDD-HPLC überprüft (Abb. 3.5-4 D).



**Abb. 3.5-4: Synthese von  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6$  und  $6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ .** **A:** Repräsentatives Chromatogramm einer HPLC-Analyse der IPMK-Reaktion. D-Ins(1,2,3,4,5) $\text{P}_5$  (a) wurde mit  $\gamma\text{-}[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  zu  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6$  (b) umgesetzt. **B:** Chromatographie des IPMK-Reaktionsansatzes über eine Q-Sepharose-Säule. Dargestellt sind Elutionsgradient (----) und -profil (•). Das entstandene  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6$  wurde stufenweise über einen HCl-Gradienten von  $\gamma\text{-}[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  getrennt. **C:** Analyse der vereinigten  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6$ -Fraktionen aus der Q-Sepharose-Chromatographie. Ein Aliquot wurde zusammen mit einem  $\text{InsP}_x$ -Standard über MDD-HPLC chromatographiert. Es wurden alle 30 s Fraktionen gesammelt und deren Radioaktivität bestimmt (•). (a):  $\text{InsP}_6$ . **D:** Synthese von  $6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ . Ein Aliquot des IP6K-2-Reaktionsansatzes wurde zusammen mit einem  $\text{InsP}_x$ -Standard an der MDD-HPLC chromatographiert. Es wurden alle 30 s Fraktionen gesammelt, deren Radioaktivität (•) bestimmt wurde. (a)  $\text{InsP}_6$  und (b)  $\text{PP-InsP}_5$ .

Die erhaltenen radioaktiven  $\text{InsP}$  waren immer Gemische aus  $\text{InsP}_6$  und  $\text{PP-InsP}_5$  und der Anteil von  $\text{PP-InsP}_5$  in diesen Gemischen schwankte zwischen 30-90 %. Offenbar verlief die IP6K-2-Reaktion unter den Versuchsbedingungen nicht vollständig, d.h.  $\text{InsP}_6$  wurde nicht komplett umgesetzt. Eine verlängerte Inkubationszeit lieferte ebenfalls keine besseren Resultate, was auf eine Inhibierung der Kinase-Reaktion oder deren kinetische Reversibilität schließen lässt. Das Produkt  $\text{PP-InsP}_5$  ist ein energiereicher Phosphat-Donator und kann in Abwesenheit von ATP zumindest *in vitro* ADP phosphorylieren [Voglmaier *et al.*, 1996].

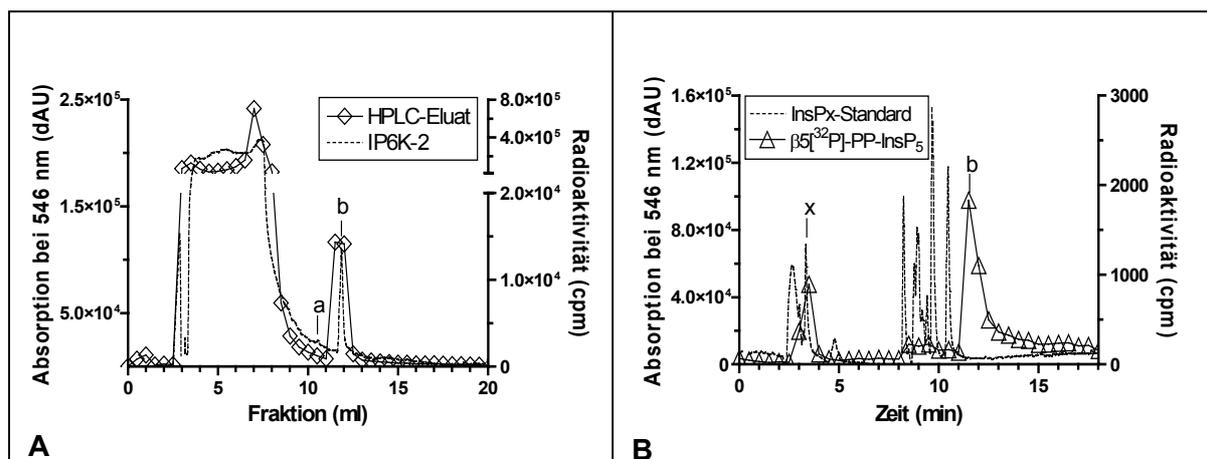


Möglicherweise war das in den Proben verbliebende Lithium aus der Reinigung von  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6$  für eine Hemmung der enzymatischen Aktivität verantwortlich. Um das zu Überprüfen, wurde die IP6K-2-Aktivität mit dem optischen Test (2.4.10.1.) in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  LiCl

überprüft. Unter diesen Bedingungen konnte kein Hemmeffekt festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Wahrscheinlich lag die Lithium-Konzentration in den  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6$ -Proben weit- aus höher und die Inhibierung der IP6K-2 ist auf einen unspezifischen Salzeffekt zurückzu- führen, der die Enzym-Substrat-Bindung beeinträchtigt.

### 3.5.3. Enzymatische Synthese von $5\beta[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$

Radioaktives PP-InsP<sub>5</sub>, dessen Pyrophosphatgruppe endständig mit <sup>32</sup>P markiert war ( $5\beta[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ ) wurde mit IP6K-2 durch Phosphorylierung von InsP<sub>6</sub> mit  $\gamma\text{-}[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  her- gestellt (2.4.13.3.). Zur Trennung von InsP<sub>6</sub>, PP-InsP<sub>5</sub> und ATP wurde eine präparative HPLC durchgeführt (Abb. 3.5-5 A), wodurch sich nahezu ATP-freies  $5\beta[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  erzie- len ließ (Abb. 3.5-5 B). In der Präparation wurde dennoch ein zweiter radioaktiver Peak de- tektiert, der wahrscheinlich auf radioaktives anorganisches Phosphat zurückzuführen ist. Auf eine Rechromatographie des PP-InsP<sub>5</sub> zur Entfernung dieser Reste radioaktiven anorgani- schen Phosphats wurde verzichtet, da die Ausbeuten nur niedrig waren und eine weitere Elution mit HCl eine weitere Dephosphorylierung des PP-InsP<sub>5</sub> begünstigen würde.



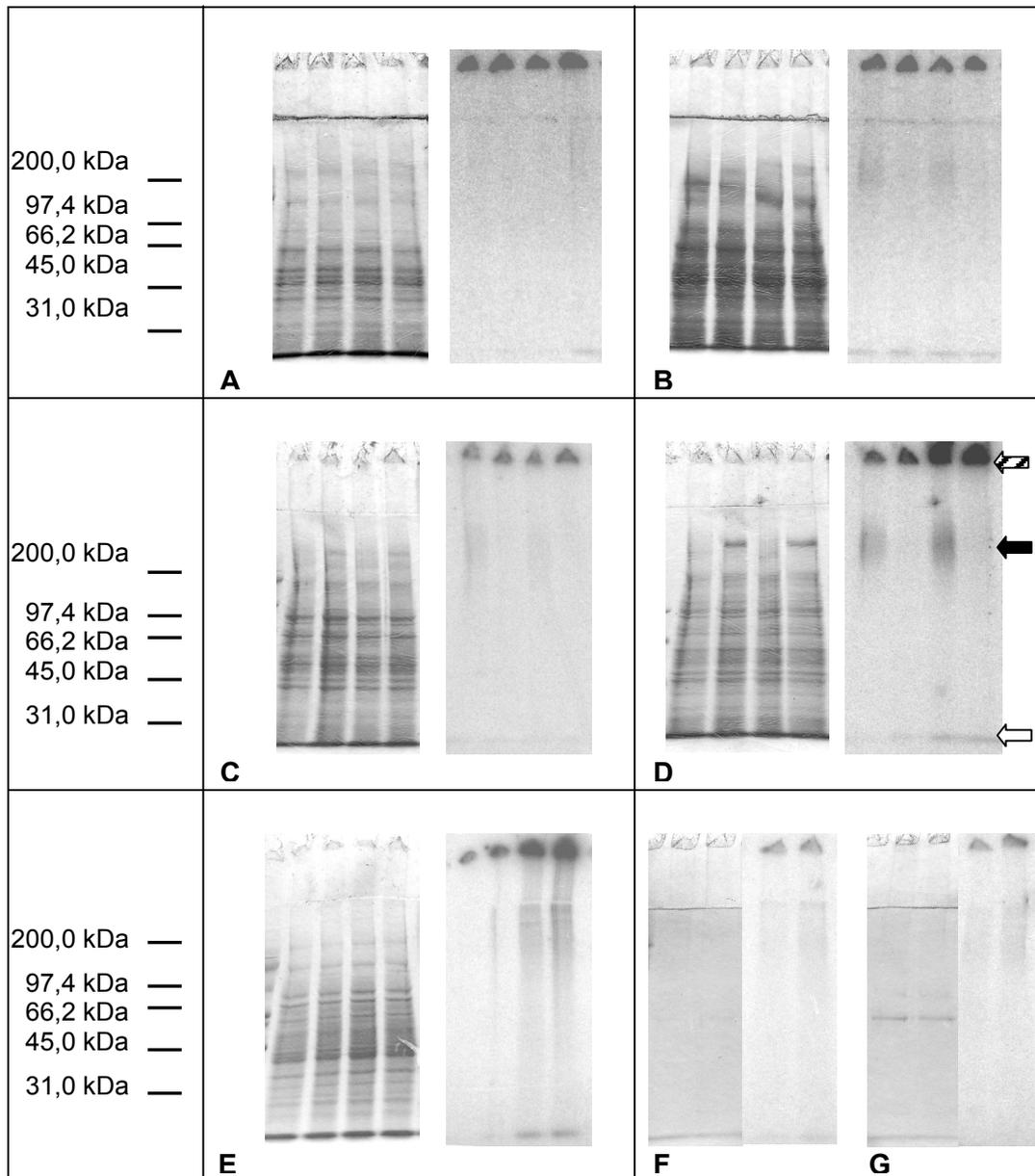
**Abb. 3.5-5: Synthese von  $5\beta[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ .** **A:** Ein Aliquot des IP6K-2-Reaktionsansatzes wurde à 30 s über die HPLC fraktioniert und die Radioaktivität ( $\diamond$ ) in den Fraktionen bestimmt. **B:** Die radioaktiven PP-InsP<sub>5</sub>-Fraktionen wurden vereinigt und ein Aliquot wurde zusammen mit einem InsP<sub>x</sub>-Standard an der MDD-HPLC kochromatographiert. Es wurden alle 30 s Fraktionen gesammelt, und deren Radioaktivität ( $\triangle$ ) bestimmt. (x) <sup>32</sup>P und (b)  $6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ .

### 3.5.4. Markierung von Extrakten aus fetalen Rattenlebern mit $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$

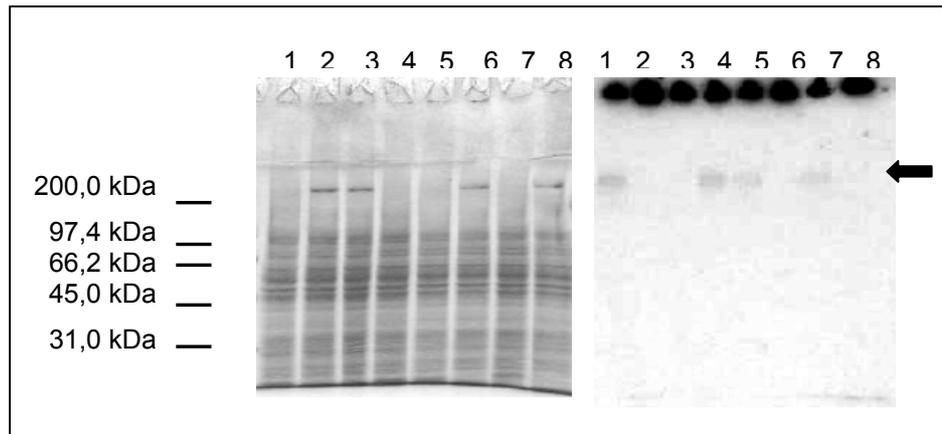
#### 3.5.4.1. *Einfluss der Calcium- und Magnesium-Konzentration, Hitze und TCE-Fällung auf die Markierung von fetalen Rattenleberextrakten mit $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$*

In Vorversuchen (2.4.16.1.) sollte geklärt werden, ob eine spezifische Markierung von Gewebeextrakten mit  $\text{InsP}$  *in vitro* überhaupt erreicht werden kann und ob sich diese Reaktion auf bestimmte zelluläre Fraktionen der Gewebeextrakte beschränkt. Außerdem sollten verschiedene Reaktionsbedingungen mit unterschiedlichen Konzentrationen an freiem, d.h. nicht in Komplexe mit ATP oder EDTA gebundenem, Magnesium und Calcium geprüft werden. Dadurch sollte ermittelt werden, ob die putative Phytylierung auf eine Komplexbildung von  $\text{InsP}_6/\text{PP-InsP}_5$  mit diesen Ionen zurückzuführen ist und ob möglicherweise  $\text{Ca}^{2+}$ - oder  $\text{Mg}^{2+}$ -aktivierte Enzyme in die Markierungsreaktion eingebunden sind. Zudem wurde getestet, ob durch Hitze- oder Säurebehandlung die radioaktiven Markierungen physikalisch entfernt werden können. Durch ein Erhitzen der Probe, werden Salz- und Wasserstoffbrücken destabilisiert, wodurch physikalisch assoziierte  $\text{InsP}$  von der Proteinmatrix gelöst würden. Durch dieses Vorgehen konnten nicht nur Erkenntnisse bezüglich optimaler Reaktionsbedingungen für eine solche Markierung erlangt werden, sondern es wurden auch erste Hinweise über die Art der Bindung zwischen  $\text{InsP}$  und makromolekularem Zellmaterial gewonnen.

Tatsächlich fielen die Markierungsversuche mit den verschiedenen Zellfraktionen der Leberextrakte sehr unterschiedlich aus (Abb. 3.5-6). In allen Fraktionen war unabhängig von der Magnesium- und Calciumkonzentration und einem Kochen der Proben in SDS-Probenpuffer eine mehr oder weniger stark ausgeprägte radioaktive Markierung der Probenlauffront im Trenngel (weißer Pfeil in Abb. 3.5-6 D) und eine Retention radioaktiven Materials in den Geltaschen (gestreifter Pfeil) zu beobachten. Besonders in der P100- (schwarzer Pfeil, Abb. 3.5-6 D und Abb. 3.5-7; Bestandteile der Plasmamembran) aber auch der P10- (Abb. 3.5-6 C; Mitochondrien) und P2-Fraktion (Abb. 3.5-6 B; schwere Membranen und Kerne) trat außerdem eine hochmolekulare ( $\sim 200$  kDa) nicht scharf laufende Bande auf. Diese Bande war jedoch nur bei Proben zu beobachten, die zuvor in SDS-Probenpuffer erhitzt wurden. In einem Experiment konnten ebenfalls hochmolekulare Banden in der S100-Fraktion (Abb. 3.5-6 E; lösliche zytosolische Bestandteile) detektiert werden, die sich in weiteren Experimenten aber nicht reproduzieren ließen. Die Ergebnisse zeigten keine Abhängigkeit von der Magnesium- und Calcium-Konzentration im Reaktionsansatz. (Abb. 3.5-6 und Abb. 3.5-7). Die Kontrollen zeigten keine ausgeprägte radioaktive Markierung im Trenngel (Abb. 3.5-6 F und G).

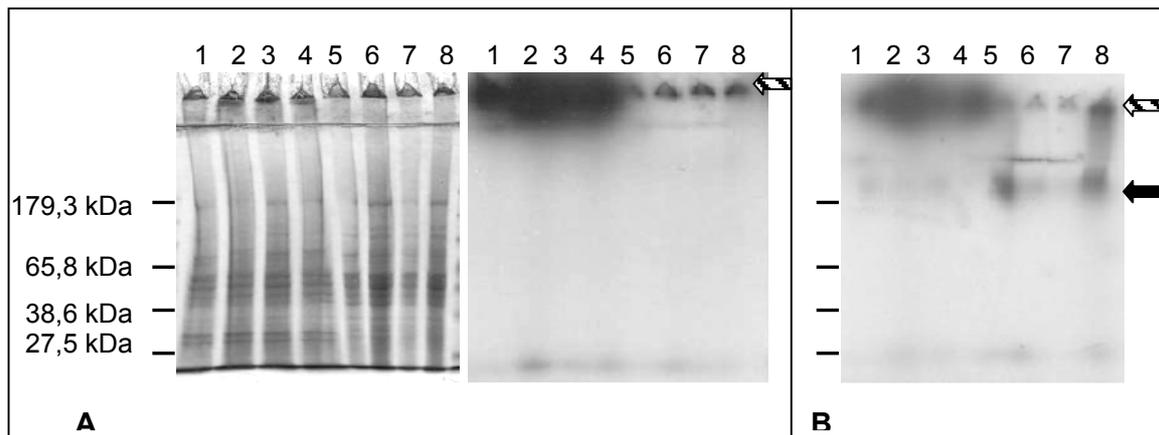


**Abb. 3.5-6: Markierung gereinigter fetaler Rattenleberextrakte mit  $6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5/[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6$ .** Gereinigte fetale Rattenleberextrakte der P0.5- (A), P2- (B), P10- (C), P100- (D) und S100-Fraktion (E) wurden unter Basisreaktionsbedingungen mit 1 mM  $\text{Mg}^{2+}$  und  $6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5/[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6$  2 h bei 37 °C inkubiert und dann durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) und Autoradiogramme (Expositionszeit 72 h) analysiert. Dargestellt sind Versuchansätze mit 20  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  (Spur 1 und 2) oder ohne  $\text{Ca}^{2+}$  (Spur 3 und 4). Es wurden jeweils 50  $\mu\text{g}$  Protein pro Spur aufgetragen, wobei Aliquots jedes Versuchansatzes zuvor 1 min bei 95 °C erhitzt (Spur 1 und 3) oder direkt aufgetragen wurden (Spur 2 und 4). In F wurde Basisreaktionsansatz (1 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , 20  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ ) aufgetragen, der mit 0,12 nmol  $6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5/[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6$  für 2 h bei 37 °C inkubiert wurde. In G wurde dem Reaktionsansatz 0,5  $\mu\text{g}$  IP6K-2 zugefügt. Die Aliquots in der Spur 1 wurden zuvor 1 min bei 95 °C erhitzt und die Aliquots in Spur 2 direkt aufgetragen. Pfeile in D: gestreift: Geltasche; schwarz: hochmolekulare Bande; weiß: Lauffront der Proben.

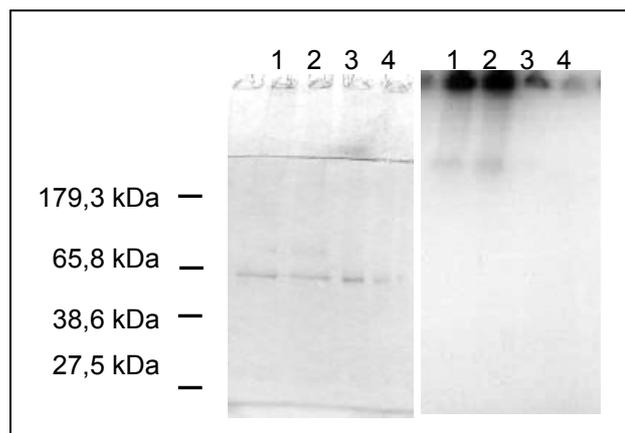


**Abb. 3.5-7: Calcium- und Magnesiumabhängigkeit der Markierung gereinigter fetaler Rattenleberextrakte mit  $6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5/6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6$ .** Extrakt der P100-Fraktion wurde in Gegenwart von  $0,12 \text{ nmol } 6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5/6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6$  mit unterschiedlichen  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentrationen in Basisreaktionspuffer für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert ( $0,5 \text{ mM Mg}^{2+}$ : Spur 1,2;  $0,5 \text{ mM Mg}^{2+} + 70 \mu\text{M Ca}^{2+}$ : Spur 3,4;  $2 \text{ mM Mg}^{2+}$ : Spur 5,6;  $2 \text{ mM Mg}^{2+} + 70 \mu\text{M Ca}^{2+}$ : Spur 7,8). Aliquots jedes Versuchsansatzes wurden vor Gelauftrag 1 min bei  $95^\circ\text{C}$  erhitzt (Spur 1,4,5,7). Dargestellt sind SDS-PAGE (10 % Acrylamid) und Autoradiogramm des getrockneten Gels (Expositionszeit 16 Tage). Es  $50 \mu\text{g}$  Protein pro Spur aufgetragen. Der schwarze Pfeil markiert die hochmolekulare radioaktive Bande.

In allen Autoradiogrammen konnte beobachtet werden, dass sehr viel radioaktives Material in den Geltaschen der SDS-Sammelgele verblieb. Hierbei könnte es sich z.B. um unlösliche Inositolphosphat-Magnesium- oder andere Inositolphosphat-Komplexe handeln, die aufgrund ihrer Molekülgröße nicht in das Gel hineinlaufen können und eventuell  $\text{InsP}$ -markiertes Proteinmaterial binden. Da derartige  $\text{InsP}$ -Komplexe in Folge der Protonierung der Hydroxygruppen der Phosphatreste im sauren Milieu gut löslich sein sollten, wurden  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ -markierte Leberextrakte vor der Trennung durch SDS-PAGE mit 10 % TCE gefällt. Durch diese Behandlung konnte eine deutliche Reduktion des in den Geltaschen verbleibenden Materials erzielt werden. Exemplarisch sind die Autoradiogramme der Versuche mit Extrakten der P0.5- und der P100-Fraktion in Abb. 3.5-8 dargestellt. Interessanterweise führte eine TCE-Behandlung des P100-Extraktes zu einer deutlichen Verstärkung des radioaktiven Signals bei ca. 200 kDa. Die unterschiedlichen Mengen radioaktiven Materials in den Spuren 5-8 (Abb. 3.5-8 B) sind auf unterschiedliche Probenmengen zurückzuführen. In Kontrollen, die aus Standardreaktionspuffer mit  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  und IP6K-2 bestanden, konnte durch TCE-Behandlung radioaktiver unspezifischer Hintergrund fast vollständig eliminiert werden (Abb. 3.5-9).



**Abb. 3.5-8: Einfluss der TCE-Fällung der Proben auf das Laufverhalten der radioaktiv-markierten Rattenleberextrakte.** Gereinigte fetale Rattenleberextrakte wurden in Basisreaktionspuffer in Gegenwart von 1 mM  $Mg^{2+}$  und 20  $\mu M$   $Ca^{2+}$  (Spur 3,4 und 7,8) oder ohne  $Ca^{2+}$  (Spur 1,2 und 5,6) mit  $6[^{32}P]$ -PP-InsP<sub>5</sub>/ $[^{32}P]$ -InsP<sub>6</sub> für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die radioaktiv-markierten Leberextrakte wurden anschließend durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) getrennt und Autoradiogramme der getrockneten Gele erstellt (Expositionszeit 4 Tage). Es wurden Aliquots à 50  $\mu g$  Protein pro Spur aufgetragen. Aliquots der Spur 5-8 wurden mit TCE gefällt. Aliquots der Spur 1, 3, 5 und 7 wurden vor dem Gelauftrag 1 min bei 95 °C erhitzt. Alle anderen Proben wurden direkt auf das Gel aufgetragen (Spur 2, 4, 6, 8). Dargestellt sind SDS-PAGE und Autoradiogramm der P0.5 Fraktion (A) sowie das Autoradiogramm der P100-Fraktion (B). Pfeile: gestreift: Geltasche; schwarz: hochmolekulare Bande.



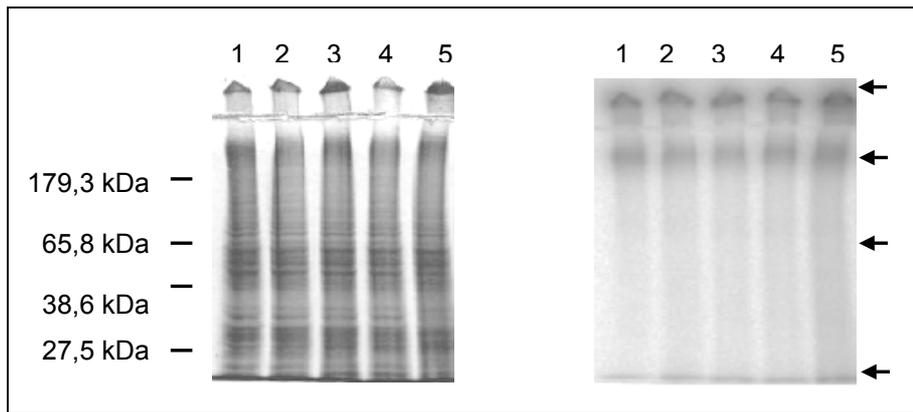
**Abb. 3.5-9: Einfluss der TCE-Behandlung auf das Laufverhalten von  $6[^{32}P]$ -PP-InsP<sub>5</sub>/ $[^{32}P]$ -InsP<sub>6</sub>.** Als Kontrolle diente einmal Basisreaktionspuffer mit 1 mM  $Mg^{2+}$  und 20  $\mu M$   $Ca^{2+}$  (Spur 1-4), dem eine entsprechende Menge  $6[^{32}P]$ -PP-InsP<sub>5</sub>/ $[^{32}P]$ -InsP<sub>6</sub> und 0,5  $\mu g$  IP6K-2 zugesetzt wurden. Es wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden anschließend durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) getrennt und Autoradiogramme der getrockneten Gele erstellt (Expositionszeit 4 Tage). Aliquots der Spur 3 und 4 wurden mit TCE behandelt. Die Proben der Spur 1 und 3 wurden vor dem Auftragen auf das Gel für 1 min auf 95 °C erhitzt, Proben der Spur 2 und 4 wurden direkt aufgetragen. Es war eine deutliche Abnahme der in den Geltaschen verbleibenden Radioaktivität sowie ein vollständiger Rückgang radioaktiven unspezifischen Hintergrunds im Trenngel nach TCE-Fällung zu beobachten.

Die Ergebnisse deuten auf eine relativ spezifische, wahrscheinlich kovalente Bindung von  $6[^{32}P]$ -InsP<sub>6</sub>/ $6[^{32}P]$ -PP-InsP<sub>5</sub> an makromolekulares Zellmaterial hin, da die hochmolekulare Bande nicht in allen Zellfraktionen auftritt bzw. besonders stark in der P100-Fraktion ausgeprägt ist. Da sich keine Abhängigkeit der radioaktiven Markierung von der Konzentration divalenter Kationen zeigte, handelt es sich wahrscheinlich nicht um eine Reaktion, die durch

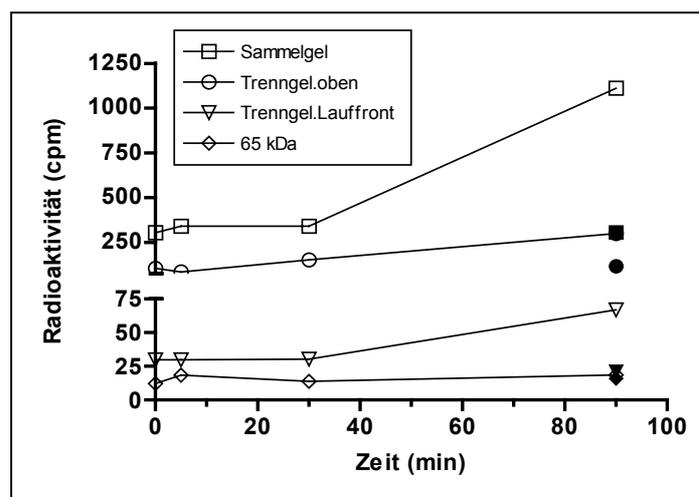
$\text{Ca}^{2+}$ - oder  $\text{Mg}^{2+}$ -aktiviert wird. Eine Komplexbildung der InsP mit diesen divalenten Kationen, die zu unspezifischen Signalen führen könnte, konnte zumindest für die hochmolekulare Bande ausgeschlossen werden. Das Laufverhalten der hochmolekularen Bande im SDS-Gel und die Notwendigkeit eines Erhitzens der Proben deuten auf eine Bindung der InsP an einen hochmolekularen Komplex hin, der über Salz- und Wasserstoffbrücken in hochmolekularer vermutlich polymerer Form stabilisiert wird. Dieser Komplex muss nicht zwangsläufig ein Proteinkomplex sein, da keine distinkte Bande im SDS-Gel dem radioaktiven Signal zugeordnet werden konnte. Nach TCE-Fällung der Proben war eine verbesserte Löslichkeit dieses putativen hochmolekularen Komplexes zu beobachten, was sich einer Zunahme des radioaktiv-markierten Materials in der hochmolekularen Bande zeigte und auf ionische Bindungen innerhalb des putativen Komplexes hindeutet.

### **3.5.4.2. Zeit- und Temperaturabhängigkeit der Markierung von Rattenleberextrakten mit $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$**

Nachdem in Vorversuchen (3.5.4.1) keine erschöpfend sicheren Hinweise auf eine Beteiligung von Enzymen an der Markierung von gereinigten Rattenleberextrakten mit  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  gefunden werden konnten und die Ergebnisse auf eine Beteiligung ionischer Bindungen an der Assoziation der InsP mit makromolekularem Zellmaterial hindeuteten, wurde die Kinetik der Markierungsreaktion untersucht. Bei einer unspezifischen Absorptionen der InsP an die zelluläre Matrix, die auf Wechselwirkungen von ionischen Ladungen beruhen, sollte die Reaktion schnell ein Maximum erreichen und unabhängig von der Inkubationstemperatur sein. Extrakte der P100-Fraktion wurden unterschiedlich lange (0, 5, 30 und 90 min) mit den radioaktiven InsP bei 37 °C inkubiert (2.4.17.1.). Als Kontrolle diente ein Aliquot, das für 90 min auf Eis inkubiert wurde. Das SDS-Gel und das Autoradiogramm sind Abb. 3.5-10 gezeigt. Die mit den Pfeilen markierten Banden wurden stückweise aus den getrockneten Gelen geschnitten und die Radioaktivität bestimmt. Eine Zunahme des radioaktiven Signals war in den Geltaschen, für die hochmolekulare Bande und in der Lauffront zu beobachten (Abb. 3.5-11). Die Radioaktivität im Gelhintergrund (65 kDa) blieb unverändert. Die Radioaktivität der auf Eis inkubierten Proben lag nach 90 min in allen Bereichen auf dem Niveau der jeweiligen 0min-Probe der bei 37 °C inkubierten Proben. Die radioaktive Markierung des Zellmaterials unterliegt also sowohl einer Zeit- und Temperaturabhängigkeit und ist daher wahrscheinlich nicht nur auf rein ionische Bindungen sondern auf eine temperaturabhängige kovalente Reaktion zurückzuführen.



**Abb. 3.5-10: Zeitabhängigkeit der Markierung von Rattenleberextrakt der P100-Fraktion durch  $6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5/[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6$ .** Extrakt der P100-Fraktion wurden unter Standardreaktionsbedingungen mit  $6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5/[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6$  für 5 min (3), 30 min (4) und 90 min (5) auf dem Heizblock bei 37 °C inkubiert. Ein Aliquot P100-Extrakt wurde 1,5 h auf Eis inkubiert (1) und ein Aliquot sofort mit TCE gefällt (2). Die Trennung der Proben erfolgte durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) und die Detektion der Radioaktivität in den getrockneten Gelen mit einem Phosphoimagerscreen (Expositionszeit 6 h). Pro Spur wurden jeweils 100 µg P100-Extrakt aufgetragen. Alle Proben wurden vor dem Auftrag auf das Gel mit TCE gewaschen und 1 min bei 95 °C erhitzt. Die mit schwarzen Pfeilen gekennzeichneten Bereiche des Gels wurden Spurweise ausgeschnitten und die Radioaktivität im Flüssig-Scintillations-Zähler bestimmt.



**Abb. 3.5-11: Graphische Darstellung der Zeit- und Temperaturabhängigkeit der Markierung von gereinigtem Rattenleberextrakt durch  $6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5/[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6$ .** Es wurden Standardreaktionen mit Extrakten der P100-Fraktion bei 37 °C (offene Symbole) und auf Eis (geschlossene Symbole) durchgeführt. Die Proben wurden durch SDS-PAGE getrennt und die getrockneten Gele mit einem Phosphoimagerscreen analysiert. Definierte Bereiche (Abb. 3.5-10) wurden vollständig aus dem getrockneten SDS-Gel ausgeschnitten und die Radioaktivität im Flüssig-Scintillations-Zähler bestimmt. Die ausgeschnittenen Bereiche entstammten den Geltaschen des Sammelgels, der hochmolekularen Bande im Trenngel, einem Bereich im Trenngel, der auf Höhe von 65 kDa liegt, sowie der Lauffront der Proben.

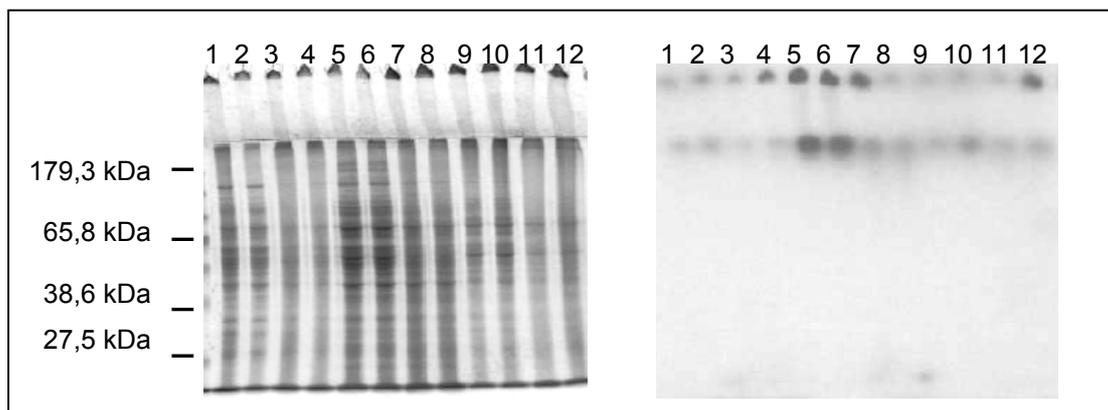
### 3.5.4.3. Säurestabilität der radioaktiver Signale in $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ -markierten Rattenleberextrakten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die radioaktiven hochmolekularen Signale besonders stark in P100-Extrakten auftreten und ihre Intensität mit Dauer und Temperatur der Inkubati-

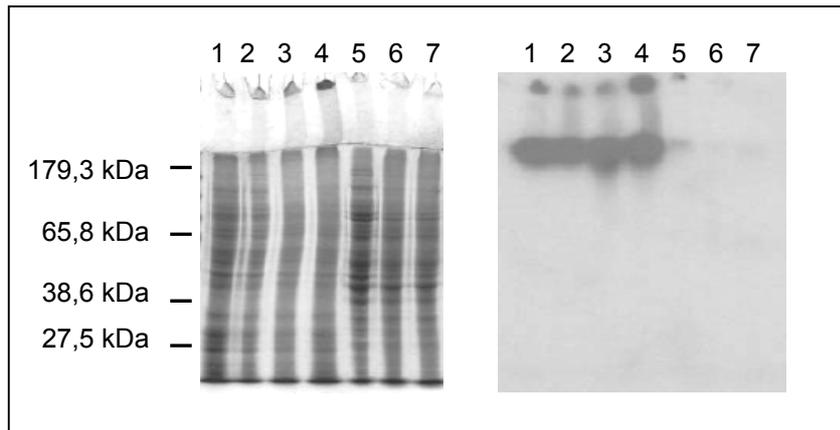
onszeit zunimmt (3.5.4.2), wurde die Art der Wechselwirkung zwischen InsP und Zellmaterial weiter untersucht. Wird eine Phytylierungsreaktion angenommen, müsste es sich um eine Phosphodiesterbindung zwischen InsP und einer Aminosäure handeln. Phosphodiesterbindungen sind mittelgradig säurestabil. Die Intensität des radioaktiven Signals in den Extrakten sollte also nach Säurebehandlung nicht abnehmen.

Mit  $6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5/[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6$ -markierte Extrakte aller Fraktionen wurden 20 min in 10 % TCE auf 95 °C erhitzt oder mit 10 % TCE versetzt und solange auf Eis gelagert (2.4.17.2.). Die Ergebnisse sind in Abb. 3.5-12 und Abb. 3.5-13 dargestellt. Die Intensität der hochmolekularen Bande nimmt nach TCE-Behandlung nur in Extrakten der P2-Fraktion ab (Abb. 3.5-12: Spur 5,6 / 7,8). Im P100-Extrakt, indem das Signal sehr stark ist, ist keine Veränderung des Signals nach Säurebehandlung zu erkennen. Das Zellmaterial scheint demnach nicht ausschließlich über labile ionische Wechselwirkungen mit InsP markiert zu werden, sondern ein Anteil der InsP ist offenbar stabil, vermutlich kovalent gebunden.

Als Kontrolle der Hydrolyse durch Säure wurden die Überstände aus der TCE-Fällung für alle Proben mit MDD-HPLC analysiert. Hier sollte durch Hydrolyse der Phosphosäureanhydridbindung des  $\beta$ -Phosphats im PP-InsP<sub>5</sub> dessen Konzentration ab und die von die InsP<sub>6</sub> zunehmen. Der Hauptanteil der detektierten InsP bestand aus freien InsP<sub>6</sub> im Reaktionsüberstand, das unter diesen Bedingungen nicht hydrolysiert werden sollte und es war daher nur eine sehr geringe Zunahme des InsP<sub>6</sub>-Peaks erkennbar. Das Chromatogramm ist daher im Anhang gezeigt (Abb. A-1).



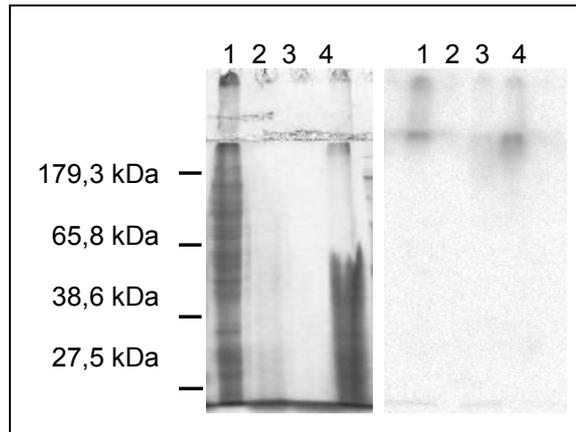
**Abb. 3.5-12: Säurestabilität der hochmolekularen radioaktiven Bande.** Gereinigte fetale Rattenleberextrakte der P0.5- (Spur 1-4), P2- (Spur 5-8), und P10-Fraktion (Spur 9-12) wurden in Standardreaktionspuffer mit  $6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5/6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6$  und  $20 \mu\text{M Ca}^{2+}$  (Spur 1,3,5,7,9,11) oder ohne  $\text{Ca}^{2+}$  (Spur 2,4,6,8,10,12) für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Die Proteine ( $50 \mu\text{g}$  pro Spur) wurden durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) getrennt und Autoradiogramme von den getrockneten Gelen erstellt (Expositionszeit 4 Tage). Ein Aliquot jeder Probe wurde vor dem Auftrag auf das Gel 20 min in 10%iger TCE bei 95°C inkubiert (Spur 3,4 / 7,8 / 11,12), während je ein weiteres Aliquot solange auf in 10%iger TCE auf Eis gelagert wurde (Spur 1,2 / 5,6 / 9,10). Alle Proben wurden vor dem Gelauftrag 1 min bei 95 °C erhitzt.



**Abb. 3.5-13: Säurestabilität der hochmolekularen radioaktiven Bande.** Gereinigte fetale Rattenleberextrakte der P100- (Spur 1-4) und S100-Fraktion (Spur 5-7) wurden in Standardreaktionspuffer mit  $6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5/[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6$  und  $20\ \mu\text{M}\ \text{Ca}^{2+}$  (Spur 1, 3, 5, 6) oder ohne  $\text{Ca}^{2+}$  (Spur 2, 4, 7) für 1,5 h bei  $37\ ^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Proteine ( $50\ \mu\text{g}$  pro Spur) wurden durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) getrennt und Autoradiogramme von den getrockneten Gelen erstellt (Expositionszeit 4 Tage). Ein Aliquot jeder Probe wurde vor dem Auftrag auf das Gel 20 min in 10%iger TCE bei  $95\ ^\circ\text{C}$  inkubiert (Spur 3,4 / 7,8), während je ein weiteres Aliquot solange in 10%iger TCE auf Eis gelagert wurde (Spur 1,2 / 6). Alle Proben wurden vor dem Gelauftrag 1 min bei  $95\ ^\circ\text{C}$  erhitzt.

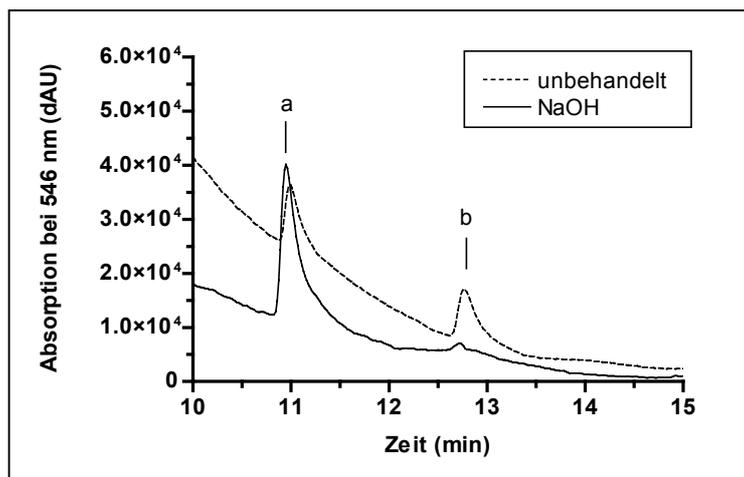
#### 3.5.4.4. *Stabilität der radioaktiver Signale in $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ -markierten Rattenleberextrakten gegenüber DNase, Proteasen und Alkali*

Es konnte zuvor gezeigt werden, dass in P100-Extrakten das radioaktive Signal der hochmolekularen Bande säurestabil ist, d.h. die Bindung der radioaktiven InsP an die makromolekulare Zellmatrix möglicherweise kovalenter oder sehr stark nichtkovalenter Natur ist (3.5.4.3). Nun sollte die Alkalistabilität des Signals geprüft werden, um weitere Hinweise auf die Art der Bindung zwischen InsP und P100-Extrakt zu erhalten. Durch alkalische Hydrolyse sollte es leichter möglich sein, die säurestabilen Phosphodiesterbindungen zu lösen, wie sie bei der postulierten Phytylierung aufträten. Zudem sollten verschiedene zelluläre Moleküle auf eine mögliche Phytylierung getestet werden. So wäre es zum Beispiel denkbar, dass InsP mit Phosphatgruppen von Nukleotiden oder Hydroxygruppen von Zuckerresten in z.B. Glykoproteinen reagieren. Diese würden durch die Alkalibehandlung bis auf DNA leicht zerstört werden. Mit  $6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5/[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6$  markierter P100-Extrakt wurde bei  $95\ ^\circ\text{C}$  mit  $0,2\ \text{M}\ \text{NaOH}$  inkubiert. Ein weiteres Aliquot markierter P100-Extrakt wurde mit DNase I oder Pronase, einem Proteasegemisch, inkubiert (2.4.17.3.). DNase I spaltet Doppel- und Einzelstrang DNA in Oligo- und Mononukleotide. Proteine werden durch Pronase bis zu einzelnen Aminosäuren gespalten.



**Abb. 3.5-14: Stabilität der hochmolekularen radioaktiven Bande gegenüber Alkali, Proteasen und DNase I.** Es wurden Standardreaktionen mit Rattenleberextrakt der P100-Fraktion in Gegenwart von  $6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5/[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6$  für 1,5 h bei  $37^\circ\text{C}$  durchgeführt. Danach wurde ein Aliquot für 30 min in  $0,2\text{ M NaOH}$  bei  $95^\circ\text{C}$  inkubiert (2), ein Aliquot wurde mit Pronase (3) und weiteres mit DNase I (4) behandelt. Als Kontrolle wurde eine unbehandelte Probe aufgetragen (1). Alle Proben wurden vor dem Gelauftrag mit TCE gewaschen und in SDS-Probenpuffer für 1 min bei  $95^\circ\text{C}$  erhitzt. Die Trennung der Proben erfolgte durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) und die Analyse des getrockneten Gels erfolgte mit einem Phosphoimagerscreen (Expositionszeit 3 h). Es wurden jeweils  $100\ \mu\text{g}$  Protein pro Spur aufgetragen.

In Abb. 3.5-14 sind SDS-Gel und Autoradiogramm der wie beschrieben behandelten P100-Extrakte gezeigt. DNase I-Behandlung (Spur 4) führte im Autoradiogramm zu keiner Reduktion der hochmolekularen Bande, wodurch eine Bindung von InsP an DNA ausgeschlossen werden kann. Auffällig ist, dass die meisten anderen Proteine, möglicherweise durch im Gel mobile Oligonukleotide, nicht getrennt wurden. Salzkonzentration und pH-Wert waren durch die TCE-Fällung in allen Proben identisch und Effekte, die darauf beruhen, sind daher auszuschließen.

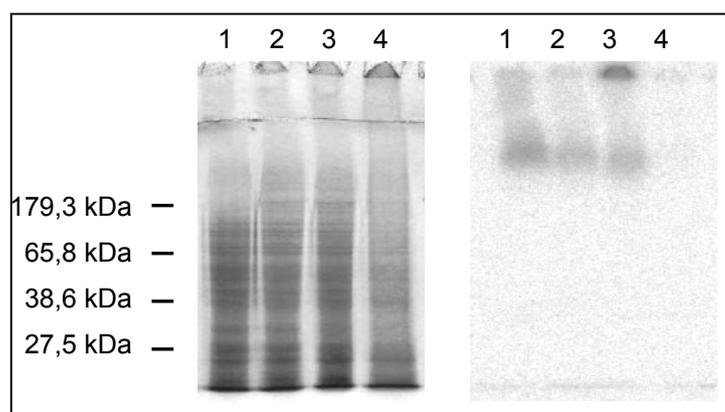


**Abb. 3.5-15: Alkalische Hydrolyse von Inositolphosphaten aus Extrakten der P100-Fraktion.**  $100\ \mu\text{g}$  gereinigter und  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ -markierter Rattenleberextrakt der P100-Fraktion wurden 30 min in  $0,2\text{ M NaOH}$  erhitzt und dann mit TCE gefällt. Die Überstände wurden mit MDD-HPLC analysiert. Als unbehandelte Kontrolle diente eine entsprechende Menge P100-Extrakt, der nach der Markierungsreaktion sofort mit 10 % TCE gefällt wurde.  $\text{InsP}_6$  (a);  $\text{PP-InsP}_5$  (b).

Nach Alkali- oder Pronase-Behandlung waren alle Proteine hydrolysiert (Spur 2 und 3) und die hochmolekulare radioaktive Bande war nicht mehr detektierbar. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die InsP vermutlich kovalent an Proteine gebunden sind. Eine Aussage über die Art der Bindung konnte allerdings nicht getroffen werden. Der Versuch den Extrakt mit Alkali zu behandeln, ohne die Proteine zu hydrolysieren, wurde mit einer verkürzten Inkubationszeit von 8 min wiederholt. Aber auch hier hydrolysierten alle Proteine vollständig und das SDS-Gel ist daher nicht gezeigt. Zusätzlich wurden der Überstand nach TCE-Fällung der mit Alkali behandelten Probe mit MDD-HPLC analysiert und mit einer unbehandelten Probe verglichen (Abb. 3.5-15). Durch Alkali-Behandlung hydrolysierte ein großer Teil des PP-InsP<sub>5</sub> (b) zu InsP<sub>6</sub> (a). Es war jedoch etwa die doppelte Menge Gesamt-InsP detektierbar als in dem Überstand der unbehandelten Probe. Dies könnte darauf hindeuten, dass durch alkalische Lyse der Proteine InsP freigesetzt wurden, was die Annahme einer kovalenten oder starken ionischen Bindung bestätigt.

### 3.5.4.5. *Proteolyse von $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ -markierten Rattenleberextrakten*

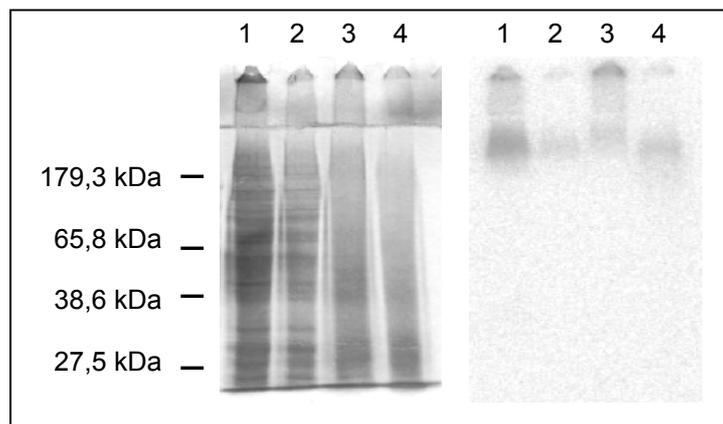
Nachdem gezeigt werden konnte, dass Proteine durch InsP<sub>6</sub>/PP-InsP<sub>5</sub> markiert werden (3.5.4.4), sollten durch eine limitierte Proteolyse von  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ -markierten P100-Extrakten mit Trypsin radioaktiv-markierte Peptidfragmente erzeugt werden (2.4.19.1.). Über eine massenspektrometrische Analyse solcher Peptide ließen sich Proteine identifizieren, die möglicherweise durch hochphosphorylierte InsP posttranslational modifiziert werden. Größere Peptidfragmente könnten über SDS-PAGE isoliert werden und kleinere mit einer Anionenaustauscherchromatographie über HPLC.



**Abb. 3.5-16: Proteolyse von radioaktiv-markiertem Rattenleberextrakt der P100-Fraktion.** P100-Extrakt wurde unter Standardbedingungen mit  $6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5/6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6$  markiert. Es wurden jeweils 100  $\mu\text{g}$  Protein einer unbehandelte Probe (1) aufgetragen, sowie Aliquots, die 2 min (2), 5 min (3) und 15 min (4) mit Trypsin behandelt wurden. Alle Proben wurden vor dem Auftrag auf das Gel mit TCE gefällt und in SDS-Probenpuffer für 1 min bei 95 °C erhitzt. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) getrennt und das getrocknete Gel mit einem Phosphoimagerscreen analysiert (Expositionszeit 6 h).

In Abb. 3.5-16 sind das SDS-Gel sowie Autoradiogramm des Extrakts nach Behandlung mit Trypsin gezeigt. Die hochmolekulare radioaktive Bande wurde nach 5 min Behandlung mit Trypsin etwas kleiner (3) als die der unbehandelten Probe (1) und war nach 15 min im Autoradiogramm nicht mehr detektierbar (4).

Wurden die  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ -markierten P100-Extrakten vor der Proteolyse mit TCE gewaschen, ließen sie sich nicht mehr vollständig mit Trypsin verdauen (Abb. 3.5-17). Wahrscheinlich sind die Proteine säurebedingt derart stark denaturiert, dass sie nicht mehr vollständig für die Protease zugänglich waren. Jedoch zeigt das abnehmende Molekulargewicht der radioaktiven Bande (Abb. 3.5-17, Spur 4), dass diese zumindest teilproteolysiert wurde. Es ließen sich keine im SDS-Gel detektierbaren radioaktiven Peptidfragmente erzeugen. Möglicherweise waren die entstandenen InsP-Peptidfragmente so klein, dass sie aus dem SDS-Gel diffundierten und/oder aber sich nach der TCE-Fällung, die zur Verminderung unspezifischer Signale notwendig ist, im Überstand und nicht im Proteinpellet befanden.

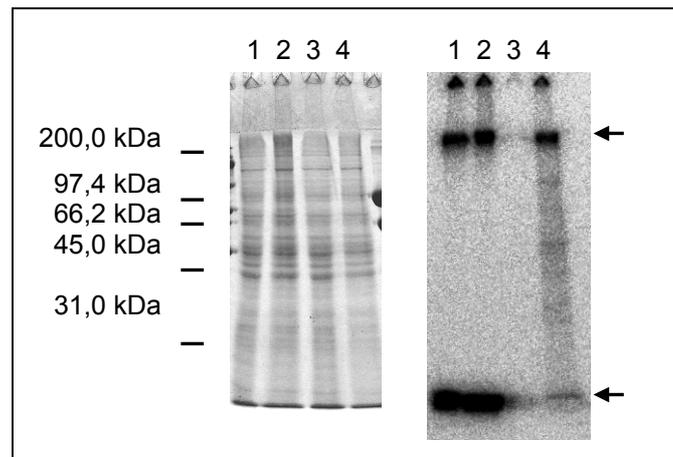


**Abb. 3.5-17: Proteolyse von radioaktiv-markiertem Rattenleberextrakt der P100-Fraktion nach vorheriger TCE-Behandlung.** Extrakt der P100-Fraktion wurde unter Standardbedingungen mit  $6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_6/[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6$  inkubiert. Danach wurden 100  $\mu\text{g}$  Aliquots einmal (1,3,4) oder zweimal (2) mit TCE gewaschen, 15 min (3) und 1 h (4) mit Trypsin behandelt und danach erneut TCE gefällt. Alle Proben wurden vor dem Auftrag auf das Gel in SDS-Probenpuffer für 1 min auf 95 °C erhitzt. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt (10 % Acrylamid) und das getrocknete Gel mit einem Phosphoimagerscreen analysiert (Expositionszeit 6 h).

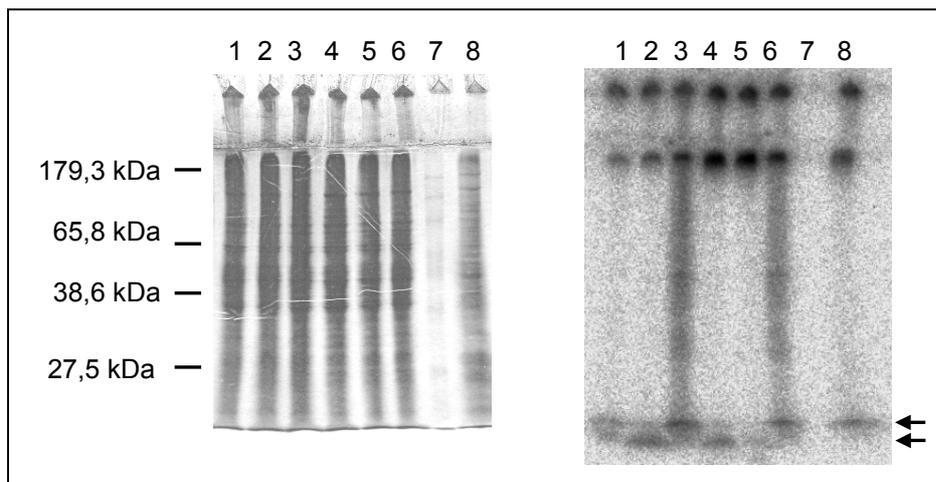
### 3.5.5. Phosphorylierung von fetalen Rattenleberextrakten durch $5\beta[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$

Es wurde geprüft, ob sich gereinigter Rattenleberextrakt mit  $5\beta[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  (3.5.3.) als Phosphatdonor phosphorylieren lässt und ob diese Phosphorylierungen solchen entsprechen, die mit  $\gamma\text{-}[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  erzeugt wurden. Dazu wurde Rattenleberextrakt mit verschiedenen Konzentrationen  $5\beta[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  inkubiert, wobei die Menge der zugefügten Radioaktivität in beiden Ansätzen identisch war (2.4.18.). Die Phosphorylierungs-Kontrollen wurden mit  $\gamma\text{-}[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  durchgeführt, wobei hier die ATP-Konzentration identisch war, die eingesetzte Menge Radioaktivität aber stark unterschiedlich. Ein ATP-Ansatz wurde auf die spezifische

Radioaktivität eingestellt, die den  $5\beta[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ -Ansätzen entsprach. Ein zweiter Ansatz wurde mit der 30fachen Menge Radioaktivität durchgeführt.



**Abb. 3.5-18: Phosphorylierung von gereinigten Rattenleberextrakten mit  $5\beta[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  und  $\gamma\text{-}[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ .** Je 100  $\mu\text{g}$  nichtfraktionierter Gesamtextrakt wurde mit 0,5  $\mu\text{M}$  (1) und 5  $\mu\text{M}$  (2)  $5\beta[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  bei 37 °C für 1 h inkubiert. Die nominal zugefügte Radioaktivität betrug 12,5 nCi. Phosphorylierungs-Kontrollen wurden mit 100  $\mu\text{g}$  Rattenleberextrakt und 5  $\mu\text{M}$   $\gamma\text{-}[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  durchgeführt. Die eingesetzte Radioaktivität betrug hier 15 nCi (3) und 500 nCi (4). Die Proteine wurden durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetrennt und ein Autoradiogramm des getrockneten Gels erstellt (Expositionszeit 3 h). Die schwarzen Pfeile markieren die dominanten Phosphorylierungsbanden im oberen Trenngelbereich und in der Lauffront der Proben.



**Abb. 3.5-19: Zeitabhängigkeit der Phosphorylierung von Rattenleberextrakten mit  $5\beta[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ .** Je 200  $\mu\text{g}$  nichtfraktionierter Gesamtextrakt wurde mit 5  $\mu\text{M}$   $5\beta[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  bei 37 °C für 10 min (1 und 2) und 20 min (4 und 5) inkubiert. Die nominal zugefügte Radioaktivität betrug 25 nCi. 200  $\mu\text{g}$  P100-Extrakt (8) wurden ebenfalls für 10 min mit 5  $\mu\text{M}$   $5\beta[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  und 25 nCi inkubiert. Phosphorylierungs-Kontrollen wurden mit 5  $\mu\text{M}$   $\gamma\text{-}[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  und 185 nCi durchgeführt. Es wurde für 10 min (3) und 20 min (6) bei 37 °C inkubiert. In Spur 7 wurde der Molekulargewichtstandard aufgetragen. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetrennt und ein Autoradiogramm des getrockneten Gels erstellt (Expositionszeit 3 h). Die schwarzen Pfeile markieren radioaktives Material im Lauffrontbereich der Proben.

In Autoradiogrammen konnten nach Inkubation von Rattenleberextrakt mit  $5\beta[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  (Abb. 3.5-18) Banden in gleicher Höhe beobachtet werden, wie sie nach Inkubation mit  $6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  auftraten (Abb. 3.5-10). Dabei ist die Bande in der Lauffront der Proben je-

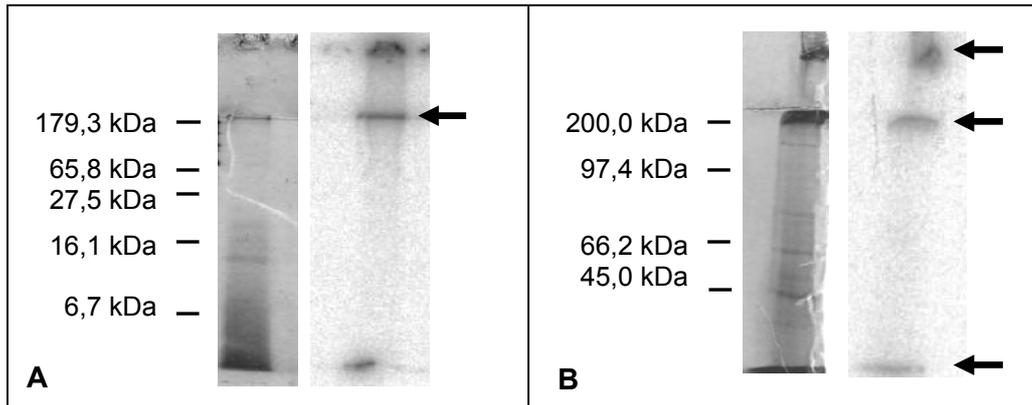
doch sehr viel ausgeprägter, was wahrscheinlich auf zwei dicht beieinander laufende Banden zurückzuführen ist, wie sie in Abb. 3.5-19 zu erkennen sind (schwarze Pfeile). Die untere Bande könnte möglicherweise durch vor der Lauffront laufendes  $5\beta[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  verursacht werden. Phosphorylierungen, die in Gegenwart von IP6K-2 durchgeführt wurden, zeigten im Autoradiogramm das gleiche Muster. Eine Beteiligung der IP6K-2 an dieser Reaktion kann also ausgeschlossen werden. Andere radioaktive Banden, wie sie durch Phosphorylierung mit  $\gamma\text{-}[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  erzeugt werden, konnten nicht detektiert werden. Es trat aber durch Phosphorylierung mit  $\gamma\text{-}[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  eine hochmolekulare Bande auf, die der durch  $5\beta[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  generierten entspricht (Abb. 3.5-18 und Abb. 3.5-19). Interessanterweise ist zur Erzeugung dieser Bande aber eine sehr viel größere Menge Radioaktivität nötig (Abb. 3.5-18: 30fach und Abb. 3.5-19: etwa 7fach) als für die Erzeugung einer Bande mit  $5\beta[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ . Eine Zeithabhängigkeit der Phosphorylierungsstärke, wie sie auch für  $6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ -markierte P100-Extrakte beobachtet werden konnte, war ebenfalls gegeben (Abb. 3.5-10). Die hochmolekulare Bande kann also nicht auf eine reine Phosphorylierung mit  $^{32}\text{P}$  zurückgeführt werden. Vielmehr deuten die Zeitabhängigkeit und die höhere Sensitivität der Markierungsreaktion mit  $5\beta[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  (gegenüber  $\gamma\text{-}[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ ) auf eine relativ spezifische Bindung hochphosphorylierter InsP an dieses hochmolekulare Material hin.

### **3.5.6. Identifizierung von möglichen Inositolphosphat-markierten Peptiden mit Massenspektrometrie**

#### **3.5.6.1. Vorbereiten von Proben für die Massenspektrometrie**

Zuvor konnte gezeigt werden, dass  $\text{InsP}_6/\text{PP-InsP}_5$  kovalent oder extrem stark und praktisch irreversibel ionisch an Proteine oder Proteinkomplexe der P100-Fraktion bindet (3.5.4.3., 3.5.4.4., 3.5.4.5.). Zur Identifizierung putativer zellulärer Akzeptormoleküle der InsP sollten SDS-Gelbanden massenspektroskopisch untersucht werden. Um die kovalente Bindung der InsP an Peptide zu belegen, sollten proteolytierte InsP-markierte Rattenleberextrakte chromatographisch über eine Anionenaustauschersäule aufgetrennt werden, wobei die Chromatographie über das gebundene InsP erfolgen sollte.

Zur Gewinnung möglichst homogener Proben für die Massenspektrometrie (MS), die InsP-Peptid-Konjugate enthielten, wurden verschiedene Strategien verfolgt (2.4.19.1.). Da sich mit Trypsin-Proteolyse keine in SDS-Gelen detektierbaren Peptide erzeugen ließen (3.5.4.5) und sich die hochmolekulare Bande bei großen Proteinmengen als nur langsam proteolysierbar erwies, wurde  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ -markierter P100-Extrakt exzessiv mit Trypsin verdaut bis alle Proteine außer der hochmolekularen Bande degradiert waren (Abb. 3.5-20 A). Dadurch wurde diese Bande weitgehend von anderen, nicht InsP-bindenden Proteinen gereinigt.



**Abb. 3.5-20: Gewinnung von SDS-Gelbanden für die MS-Analyse von  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ -markiertem Rattenleberextrakt. A:** Repräsentative SDS-PAGE und Autoradiogramm für exzessive Proteolyse von  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ -markiertem Rattenleberextrakt der P100-Fraktion mit Trypsin. Die mit einem Pfeil gekennzeichnete Bande wurde aus einem anderen, frischen Gel ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht. **B:** SDS-PAGE von  $6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5/[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6$ -markiertem P100-Extrakt und Autoradiogramm des getrockneten Gels. Es wurden 150  $\mu\text{g}$  Protein aufgetragen. Die mit einem Pfeil gekennzeichneten Banden wurden aus einem frischen Gel ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht. SDS-PAGE (15 % Acrylamid), Autoradiogramm (Exposition über Nacht).

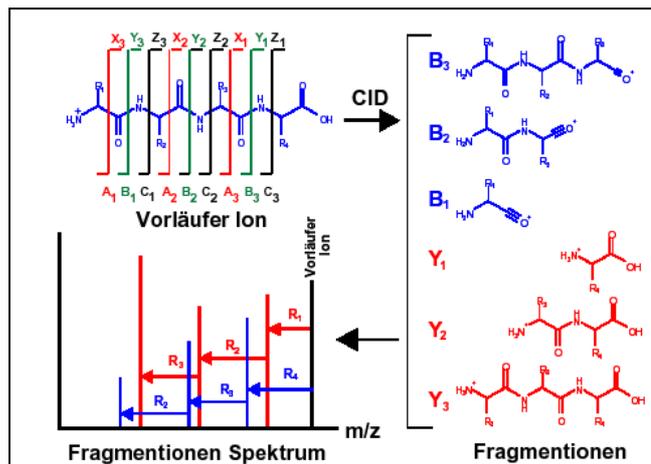
Die mit einem Pfeil gekennzeichnete Bande wurde massenspektrometrisch untersucht. Der Überstand wurde mit HPLC über eine Anionenaustauschersäule fraktioniert, um sehr kleine InsP-Peptid-Konjugate zu isolieren, die bei der Proteolyse entstanden sein könnten. Die Detektion dieser  $[^{32}\text{P}]\text{-InsP}$ -Konjugate sollte über die Radioaktivität erfolgen. Außerdem wurde nicht proteolysierter  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ -markierter P100-Extrakt über SDS-PAGE getrennt (Abb. 3.5-20 B) und die mit Pfeilen markierten Banden ebenfalls massenspektrometrisch untersucht.

Ein weiteres Aliquot markierter P100-Extrakt wurde proteolysiert und ebenfalls über eine Anionenaustauschersäule mit HPLC fraktioniert. Die Messung der Radioaktivität in den HPLC-Fractionen der mit Trypsin behandelten und unbehandelten Proben ergab keine deutlich erkennbaren „neuen“ *Peaks* neben  $\text{InsP}_6$  und  $\text{PP-InsP}_5$ , welche bei einer Bindung von InsP an Peptide zu erwarten gewesen wären. Da aber die radioaktiven *Peaks* durch nichtgebundenes  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  sehr breit waren, ist es möglich, dass schwächere Signale bei ähnlicher Retentionszeit davon überdeckt wurden. Leider war die MS-Analyse der mit HPLC gewonnenen Proben aus technischen Gründen bisher nicht möglich und die Chromatogramme sind daher im Anhang gezeigt (Abb. A-2).

### 3.5.6.2. Ergebnisse der massenspektrometrische Untersuchung der SDS-Gelbanden

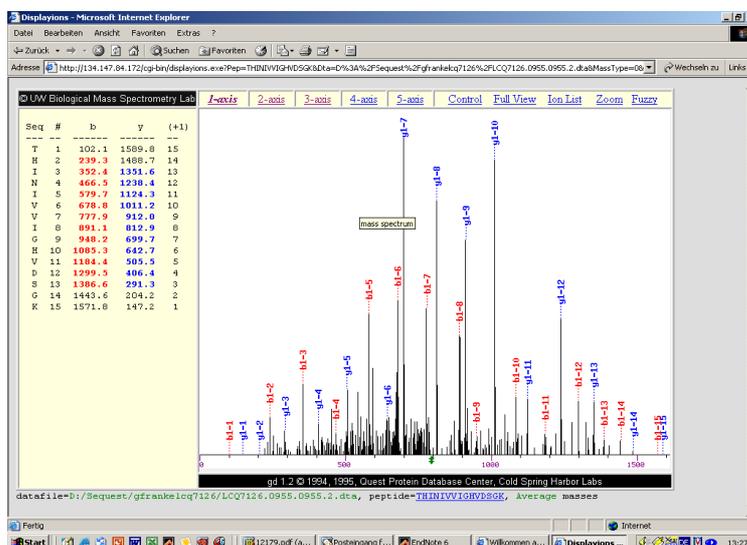
Die ausgeschnittenen Gelbanden (3.5.6.1) wurden mit Trypsin verdaut und die tryptischen Peptide aus dem Gel eluiert. Vor der MS-Analyse wurden die Peptid-Gemische über *Rever-*

se-Phase-HPLC getrennt und mit ESI-MS im Tandem-Verfahren analysiert. Bei diesem Verfahren werden nicht nur die molekularen Massen der Peptide bestimmt, sondern einzelne ionisierte Peptide werden in einer Ionenfalle isoliert und durch Anlegen einer Resonanzspannung gestoßen, so dass sie in kleinere Fragmente zerfallen. Die Spaltung der Peptide erfolgt an bevorzugten Sollbruchstellen. Es entstehen dabei Serien von ionisierten Peptidfragmenten, die sich in der Masse jeweils um die Aminosäure-spezifische Seitenkette unterscheiden (Abb. 3.5-21). Aus den Massendifferenzen lassen sich die zugehörigen Aminosäuren und in Folge auch die Aminosäuresequenz ableiten.



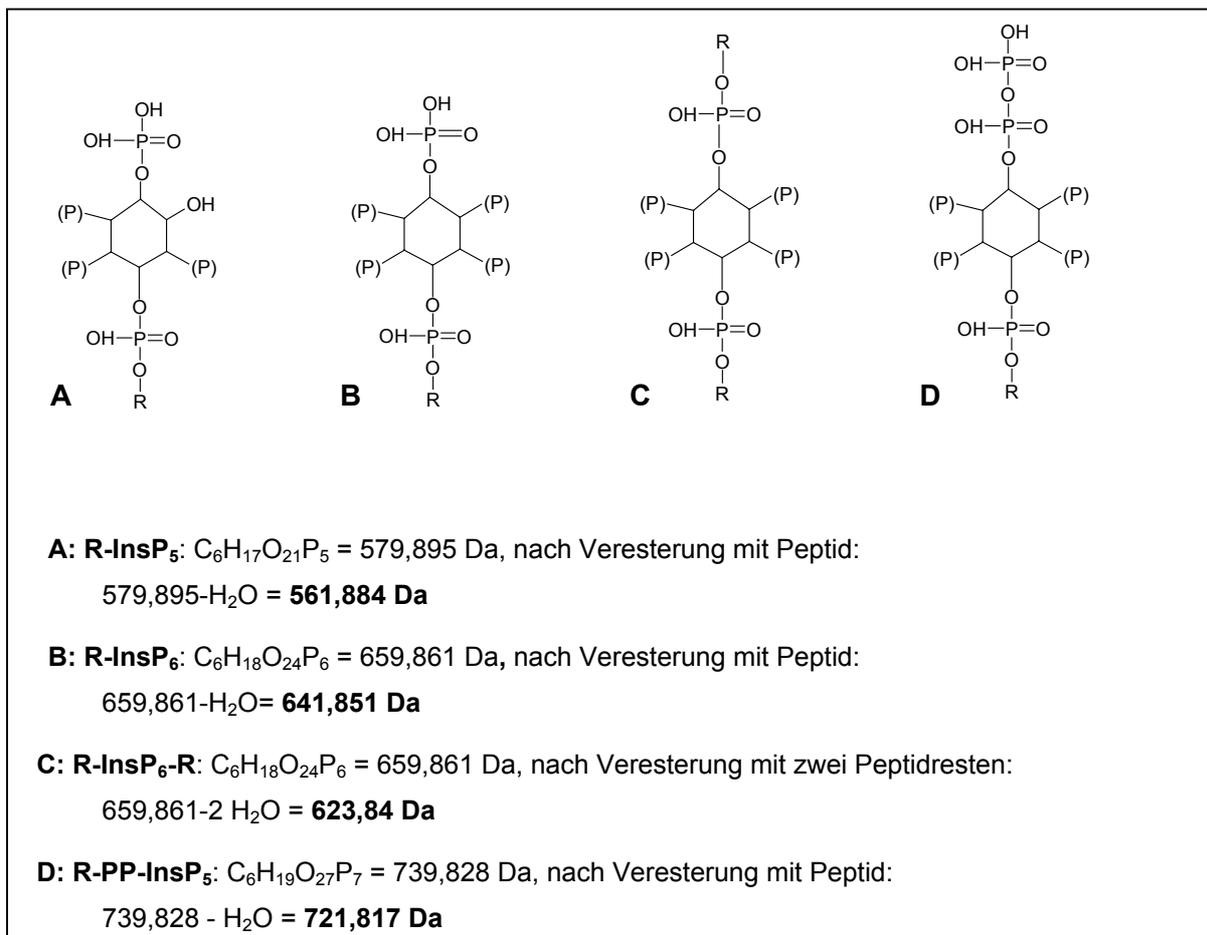
**Abb. 3.5-21: Fragmentierung von Peptiden zur Sequenzbestimmung mit Tandem-MS.** Ionisierte Peptidfragmente werden in einer Ionenfalle isoliert und durch kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) in geladene kleinere Fragmente (B1-B3 und Y1-Y3) gespalten. Dadurch entstehen sogenannte MS/MS-Fragmentenserien. (Abbildung aus *Protein Identifizierung mittels Chromatographie, Massenspektrometrie und Datenbanksuche*; Bettina Mayr, Hansjörg Toll & Christian Huber; Instrumentelle Analytik und Bioanalytik, Universität des Saarlandes).

Abb. 3.5-22 zeigt das MS/MS-Spektrum eines Peptidfragments. Wurden auf diese Art mindestens drei Peptide mit guten Spektren identifiziert, erfolgte eine Datenbanksuche über *SEQUEST* gegen *NCBI mouserat*.



**Abb. 3.5-22: MS/MS-Spektrum (SEQUEST) eines Peptidfragments.** Links sind die Massen der Fragmentionen angegeben.

Um die Vermutung zu überprüfen, dass es sich bei der Bindung der InsP an Peptide, um eine kovalente Modifikation handelt, wurde für Serin-, Threonin- und Tyrosin-haltige Fragmente die Massen möglicher gebundener InsP einbezogen. Die berechneten InsP<sub>x</sub>-Massen sind unten angegeben. Dabei wurde ein bzw. zwei H<sub>2</sub>O-Moleküle unter Berücksichtigung der Kondensationsreaktion zwischen Peptid und InsP<sub>x</sub> von der theoretischen InsP<sub>x</sub>-Masse abgezogen (Abb. 3.5-23).



**Abb. 3.5-23: Berechnung der Molekulargewichte möglicher Peptid-Modifikationen durch InsP<sub>x</sub>.** Phosphatgruppen sind durch (P) vereinfacht dargestellt. R bedeutet beliebiger Peptidrest. Absolute Atommassen: <sup>1</sup>H = 1.0078250 Da, <sup>16</sup>O = 15.9949146 Da, <sup>12</sup>C = 12.0000000 Da, <sup>31</sup>P = 30.9737615 Da.

Es konnten jedoch keine Peptide identifiziert werden, welche die angegebenen Massenverschiebungen enthielten. Allerdings ist eine kovalente Modifikation von Peptiden durch InsP nicht vollständig auszuschließen, da die erhaltenen Fragmentationen häufig so klein waren, dass die technische Grenze der Methode erreicht war. In Tab. 3.5-1 sind die mit MS identifizierten Proteine aufgeführt. Die Proteinzusammensetzung der nicht mit Trypsin vorbehandelten Proben war, wie zu erwarten, nicht sehr homogen. Es konnten jedoch in allen analysierten Gelbanden verschiedene Ferritin-Untereinheiten und ribosomale Proteine gefunden werden. In der hochmolekularen Bande, die der SDS-PAGE des mit Trypsin vorbehandelten

P100-Extrakts entstammte, wurden die leichte und die schwere Proteinkette des Ferritins und ein  $\alpha$ -Ketten ähnliches Protein des Hämoglobins identifiziert.

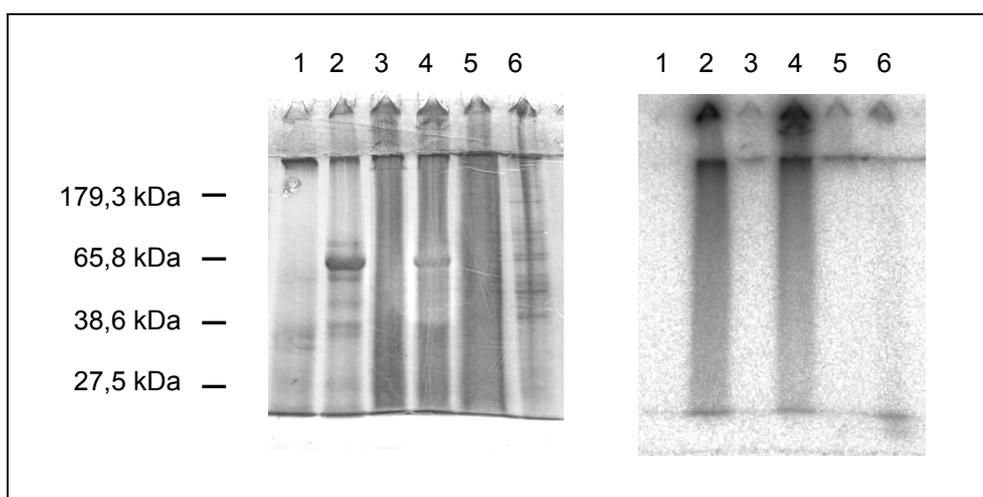
**Tab. 3.5-1: Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung der Gelbanden.** Angegeben sind die Art der Probe, das identifizierte Peptid, dessen NCBI gi-Nummer, das Molekulargewicht und die Sequenzübereinstimmung mit dem vorgeschlagenen Peptid. Peptide, die zu Protein-Komplexen gehören, die in den meisten der untersuchten Banden vorkommen, sind kursiv dargestellt.

Probe	Protein	gi-Nummer	Masse (Da)	Übereinstimmung [%]
<b>Geltasche</b>	<i>ribosomal protein L6</i>	gi 16758864	33569,1	27,6
	EF11_MOUSE Elongation factor 1-alpha 1	gi 1169475	50163,9	14,5
	<i>ribosomal protein L5</i>	gi 13592051	34458,7	20,9
	<i>R5RTL7 ribosomal protein L7</i>	gi 11383729	30329,3	17,7
<b>Lauffront</b>	hemoglobin beta chain, minor	gi 92362	15992,4	87,1
	hemoglobin beta chain complex	gi 17985949	15979,4	75,5
	<i>acidic ribosomal protein P0</i>	gi 11693176	34215,5	35,0
	<i>ferritin light chain</i>	gi 2119695	20782,5	64,5
	unnamed protein product	gi 12846200	27504,2	33,9
	<i>similar to ribosomal protein S18, cytosolic</i>	gi 27715307	17798,8	38,2
	<i>ribosomal protein S15a</i>	gi 14165469	14839,5	45,4
	similar to hemoglobin alpha chain	gi 34870607	15284,5	58,5
	<i>similar to ribosomal protein L10a</i>	gi 34874214	25033	43,3
	<i>ribosomal protein S16, 40S rib prot S16</i>	gi 4506691	16445,3	43,8
	<i>similar to 60S Protein L12</i>	gi 27706782	17845,6	44,8
	<i>ribosomal protein S7, 40S rib prot S7</i>	gi 4506741	22126,9	26,3
	proteasome subunit alpha type 7	gi 34860906	27855,8	21,8
amino acid starvation-induced protein	gi 202990	13874,3	33,3	
<b>Trenngel oben</b>	<i>ferritin light chain</i>	gi 2119695	20782,5	64,5
	EF11_MOUSE Elongation factor 1-alpha 1	gi 1169475	50163,9	19,0
	<i>similar to ribosomal protein L7</i>	gi 27660180	30313,2	28,8
	<i>ribosomal protein L4</i>	gi 11968086	47256,8	15,2
	<i>similar to ribosomal protein L7a, surfeit3</i>	gi 25025731	29978,6	27,8
	<i>ribosomal protein L6</i>	gi 16758864	33569,7	29,3
<b>Trenngel oben nach Trypsin-Behandlung</b>	<i>ferritin light chain</i>	gi 2119695	20782,5	68,3
	<i>ferritin heavy chain</i>	gi 111625	20995,5	35,4
	similar to hemoglobin alpha chain	gi 34870607	15284,5	36,6

### 3.6. Ferritin als möglicher Bindungspartner für hochphosphorylierte Inositolphosphate

#### 3.6.1. Bindung von hochphosphorylierten Inositolphosphaten an Ferritin

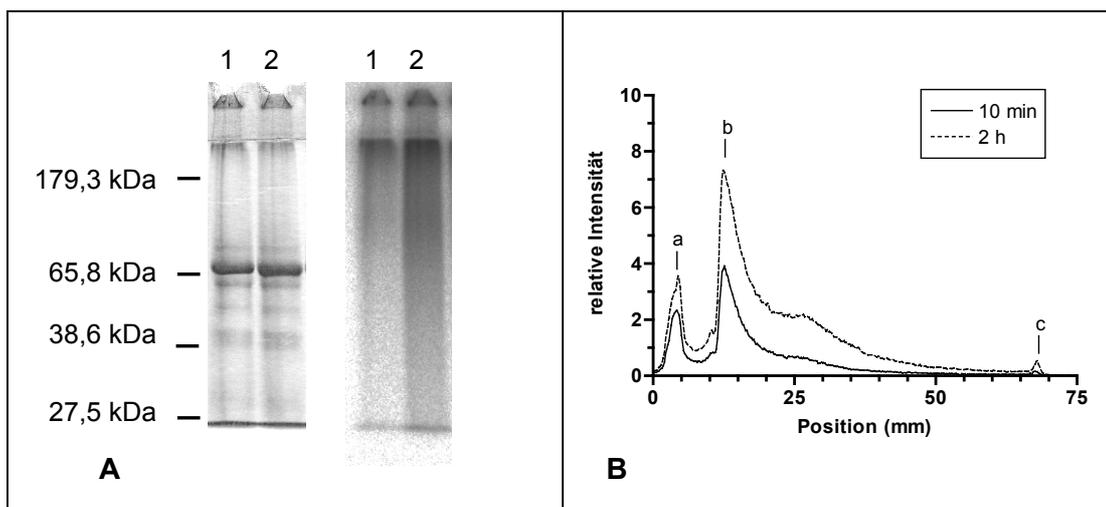
Ferritin-Ketten wurden bei MS-Analysen in allen radioaktiven SDS-Gelbanden von proteolytisiertem und von unbehandeltem P100-Extrakt gefunden, der mit  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  markiert war (3.5.6.2). Die Bindung von hochphosphorylierten InsP an Ferritin sollte darum *in vitro* überprüft werden (2.4.19.3.). Ferritin ist ein phylogenetisch alter, schon bei Bakterien vorhandener zellulärer Eisenspeicher und kann bis zu 4500 Eisenatome pro Molekül (Holo-ferritin) innerhalb seines hohlkugelförmigen Protein-Komplexes binden [Crichton, 1991: S. 131-133]. Eisen liegt in Holo-ferritin zunächst als  $\text{Fe}^{2+}$  vor und wird dort zu  $\text{Fe}^{3+}$  oxidiert. Dadurch ist Holo-ferritin mit seiner hohen positiven Ladungsdichte ein Molekül, das theoretisch sehr gut negativ geladene InsP binden könnte. Um die Abhängigkeit der Bindung von InsP an Ferritin vom Eisengehalt des Proteins zu verifizieren, wurden zwei verschiedene Ferritin-Präparationen, Apoferritin (0,01 % Eisen) und Holo-ferritin (12 % Eisen), für die Markierung mit  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  verwendet. Zwei Proben wurde zusätzlich P100-Extrakt zugesetzt, um eventuell Hinweise auf die Beteiligung von Enzymen an der Markierungsreaktion zu erhalten. Es zeigte sich sehr deutlich, dass nur Holo-ferritin und zwar genau auf der Höhe der in P100-Extrakten beobachteten hochmolekularen Bande radioaktiv-markiert wurde (Abb. 3.6-1: Spur 2). Radioaktives Material war hier ebenfalls in den Geltaschen und in der Lauffront der Proben zu finden. Der Zusatz von P100-Extrakt hatte keinen Einfluss auf die Stärke des radioaktiven Signals in Holo-ferritin (Abb. 3.6-1: Spur 4). Apoferritin ließ sich nicht radioaktiv markieren (Abb. 3.6-1: Spur 1).



**Abb. 3.6-1: Bindung von hochphosphorylierten Inositolphosphaten an Ferritin.** Es wurden Standardreaktionen mit Apo- (Spur 1 und 3) und Holo-ferritin (2 und 4) in Gegenwart von  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  durchgeführt. Zwei Proben wurden zusätzlich mit P100-Extrakt (Spur 3 und 4) versetzt. Zum Vergleich wurde außerdem radioaktiv-markierter P100-Extrakt (Spur 5) und nichtfraktionierter Gesamtextrakt (Spur 6) aufgetragen. Die Proteinmenge pro Spur betrug 200  $\mu\text{g}$ . SDS-PAGE (10 % Acrylamid) und Autoradiogramm (Exposition 1 h).

**3.6.1.1. Zeitabhängigkeit der Markierung von Ferritin mit  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$**

Es wurde überprüft, ob für die Markierung von Holo ferritin mit  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  ebenfalls ein Zeitabhängigkeit der Reaktion zeigt (2.4.19.4.), wie sie bereits bei der Markierung von P100-Extrakten zu beobachten war (3.5.4.2). In Abb. 3.6-2 A sind SDS-Gel und Autoradiogramm des Experiments dargestellt. Durch einen Intensitätsscans des Autoradiogramms (Abb. 3.6-2 B) wurde die relative Stärke der radioaktiven Signale in den Spuren bestimmt und verglichen. Eine Zunahme der Intensität des radioaktiven Signals in der hochmolekularen Trenngelbande nach 2 h konnte bestätigt werden, d.h. die Markierungsreaktion von Holo ferritin verläuft ebenfalls zeitabhängig.

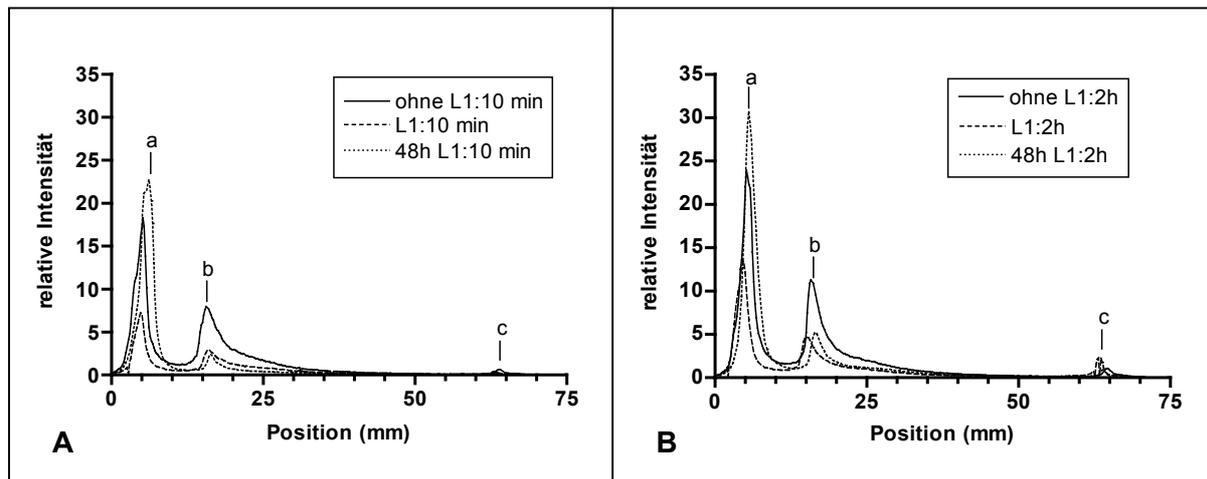


**Abb. 3.6-2: Zeitabhängigkeit der Markierung von Holo ferritin mit  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ .** Abbildung A zeigt SDS-PAGE (10 % Acrylamid) und das Autoradiogramm des getrockneten Gels (Exposition 1h). Holo ferritin wurde unter Standardbedingungen mit  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  für 10 min (Spur 1) und 2 h (Spur 2) inkubiert. Die Proteinmenge pro Spur betrug 200  $\mu\text{g}$ . In B ist der Intensitätsscans der Spur des Autoradiogramms gezeigt. (a) Tasche des Sammelgels, (b) hochmolekulare Trenngelbande, (c) Lauffront der Proben.

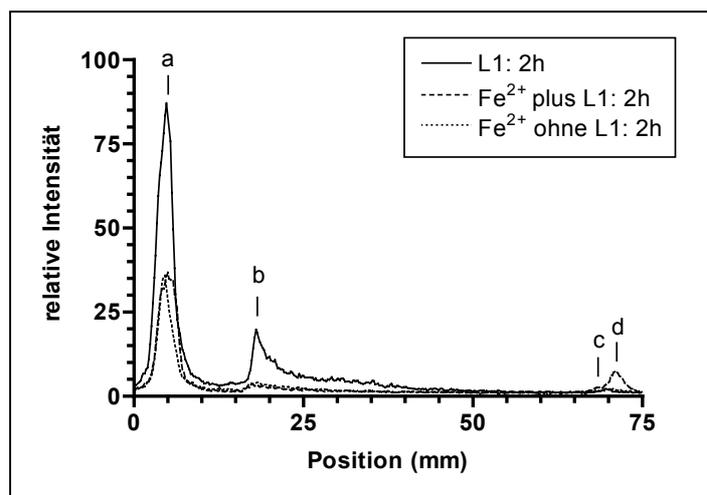
**3.6.1.2. Einfluss des Eisen-Chelators L1 auf die der Markierung von Holo ferritin mit  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$**

Nachdem eine Markierung von Holo ferritin mit  $\text{InsP}_6/\text{PP-InsP}_5$  belegt werden konnte, die kinetisch wie bei einer katalysierten kovalenten Reaktion verläuft (3.6.1.1.), wurde der Einfluss von Eisen-Kationen auf die Bindung der  $\text{InsP}$  überprüft. Standardreaktionsansätzen wurde der Eisen-Chelator L1 in substöchiometrischen Mengen, bezogen auf das im Holo ferritin enthaltene Eisen, zugesetzt. Es wurde so getestet, ob sich der Grad der Bindung von  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  an Holo ferritin durch ein Komplexieren des im Protein vorhandenen Eisens vermindern lässt. Zusätzlich wurden 2 mM  $\text{Fe}^{2+}$  (als Eisen(II)sulfat) unter Standardbedingungen mit  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  und mit einer entsprechenden Konzentration L1 oder ohne L1 inkubiert, um eine Komplexierung der  $\text{InsP}$  durch freies Eisen zu überprüfen. Intensitätsscans der radioaktiven Signale zeigten, dass zwar diese in der hochmolekula-

ren Bande nach Behandlung mit L1 abnehmen, aber eine zeitabhängige Zunahme des radioaktiven Materials nach wie vor zu erkennen war (Abb. 3.6-3). Eine Vorinkubation von Holoferitin mit L1 für 48 h ergab keinen Unterschied im Hinblick auf dieses Signal. Wurde  $\text{Fe}^{2+}$  in Gegenwart von  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  mit L1 inkubiert, war ein radioaktives Signal zu erkennen, dass unterhalb der Probenlauffront lag und möglicherweise durch mobile radioaktive InsP verursacht wird (Abb. 3.6-4).



**Abb. 3.6-3: Intensitätsscan der radioaktiven Signale in mit  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ -markiertem Holoferitin.** Es wurden Standardreaktionen mit Holoferitin in Gegenwart von  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  durchgeführt. Zwei Proben wurden zusätzlich mit L1 versetzt, wobei einmal Holoferitin 48 h bei  $4^\circ\text{C}$  mit L1 vorinkubiert wurde und einmal der Chelator erst vor Reaktionsstart zugegeben wurde. Es wurden Aliquots 10 min (A) und 2 h (B) nach Reaktionsstart genommen und durch SDS-Page (10 % Acrylamid) getrennt. Die Proteinmenge pro Spur betrug  $200\ \mu\text{g}$ . Anschließend wurde ein Autoradiogramm des getrockneten Gels erstellt (Expositionszeit 4 h) und die Intensität der Radioaktivität in den einzelnen Spur gescannt. (a) Tasche des Sammelgels, (b) hochmolekulare Trenngelbände, (c) Lauffront der Proben.



**Abb. 3.6-4: Intensitätsscan der radioaktiven Signale in mit  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ -inkubiertem  $\text{Fe}^{2+}$ .** Es wurden Standardreaktionen mit Holoferitin in Gegenwart von  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  durchgeführt. Außerdem wurden  $2\ \text{mM}\ \text{Fe}^{2+}$  unter Standardbedingungen für 2 h mit  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  und mit oder ohne L1 inkubiert. Die Proben wurden durch SDS-Page (10 % Acrylamid) getrennt und ein Autoradiogramm des getrockneten Gels erstellt (Expositionszeit 4 h). Die Intensität der Radioaktivität in den einzelnen Spur wurde gescannt. (a) Tasche des Sammelgels, (b) hochmolekulare Trenngelbände, (c) Lauffront der Proben, (d) unterhalb der Lauffront.

Da sich das radioaktive Signal in der hochmolekularen Bande durch Zugabe von dem Chelator L1 vermindern ließ, liegen die InsP offenbar im Ferritin zumindest teilweise an Eisen gebunden vor. Jedoch konnten in Gegenwart von L1, auch nach langer Vorinkubation (48 h), eine zeitabhängige Zunahme der Intensität der radioaktiven Signale im Gel beobachtet werden, was auf eine Bindung schließen lässt, die nicht nur auf ionischen Wechselwirkungen beruht. Mit einer Eisenlösung ließ sich in Gegenwart von  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  kein vergleichbares Signal im SDS-Gel generieren. Ein alleinige Bindung der InsP als Eisen-Komplex ist demnach auszuschließen.

### 3.6.1.3. Extraktion von Inositolphosphaten aus isoliertem Ferritin

Nachdem gezeigt werden konnte, dass  $\text{InsP}_6/\text{PP-InsP}_5$  spezifisch und vermutlich kovalent an Holo ferritin bindet kann (3.6.1.1., 3.6.1.2.), sollte geprüft werden, ob sich umgekehrt InsP aus kommerziell hergestelltem Ferritin extrahieren lassen. Die Extraktion von InsP aus Apo- und Holo ferritin wurden mit verschiedenen Methoden durchgeführt (2.4.20.), da beide Ferritinformen mit den eingesetzten Extraktionsmitteln unterschiedlich gut zugänglich waren. Zuerst wurde Apoferritin mit Pronase proteolysiert, da bei dieser Methode die Gefahr von Dephosphorylierung der InsP gering ist. Es ließen sich aber nur geringe Mengen InsP freisetzen (Abb. 3.6-6 A). Nach alkalischer Hydrolyse mit NaOH konnten mit MDD-HLPC in der Tat hochphosphorylierte InsP ( $\text{D-Ins}(1,2,4,5,6)/(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ ,  $\text{D-Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  und  $\text{InsP}_6$ ) sowie geringe Mengen verschiedener  $\text{InsP}_4$  und eines unbekanntes InsP, wahrscheinlich eines  $\text{InsP}_3$ , gefunden werden.

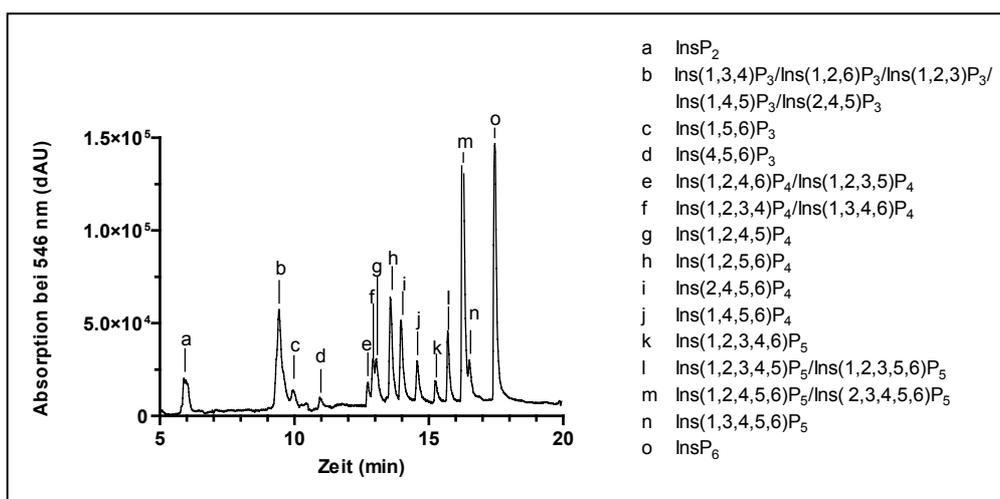
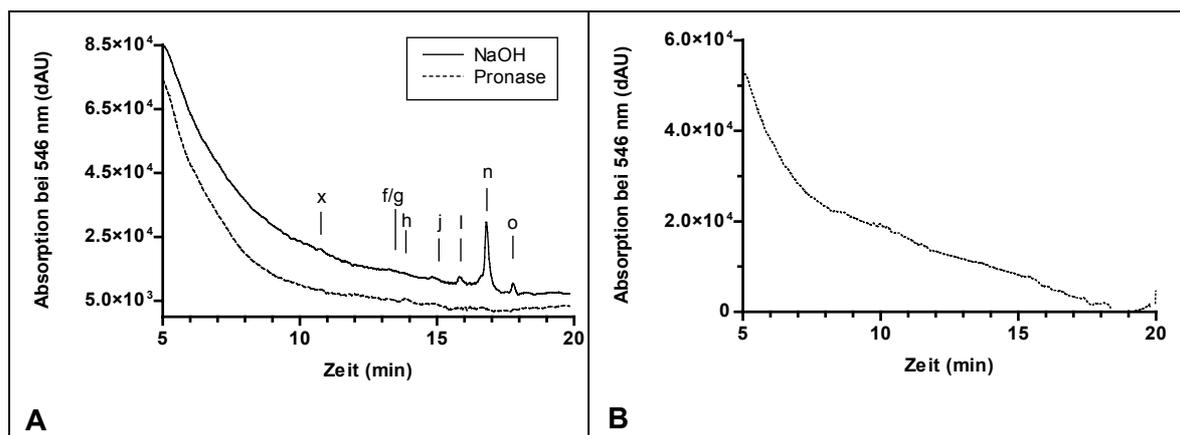
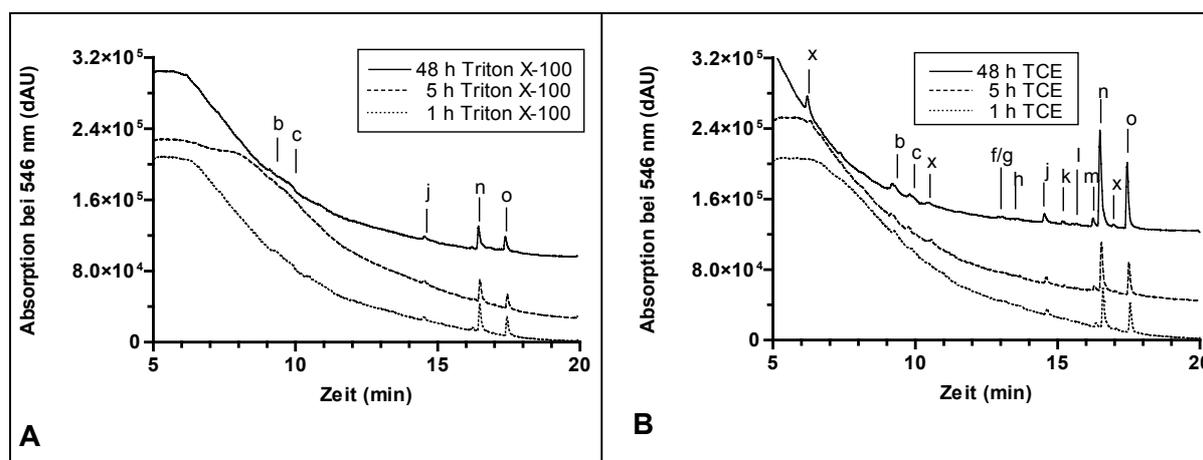


Abb. 3.6-5: Chromatogramm der MDD-HPLC eines  $\text{InsP}_x$ -Standards (Gradient MQIPFLKURZ).



**Abb. 3.6-6: Extraktion von Inositolphosphaten aus Apoferritin und Holoferritin mit alkalischer Hydrolyse bzw. der Pronase-Proteolyse.** 30 mg Apoferritin wurden mit 0,8 M NaOH für eine 1 h bei 95 °C hydrolysiert bzw. mit Pronase exzessiv verdaut (A). Die InsP aus dem Überstand nach TCE-Fällung wurden mit MDD-HPLC analysiert. InsP konnten nur nach alkalischer Hydrolyse detektiert werden. Die Isomere sind der Legende in Abb. 3.5.-1 zu entnehmen. (B): Extraktion von InsP aus Holoferritin mit alkalischer Hydrolyse. 10 mg Holoferritin wurden mit 0,8 M NaOH für eine 2,5 h bei 95 °C hydrolysiert. Danach konnten keine InsP mit MDD-HPLC detektiert werden. Die Isomere sind nach Abb. 3.6-5 bezeichnet. (f/g) D-Ins(1,2,3,4)P<sub>4</sub>/D-Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub>/D-Ins(1,2,4,5)P<sub>4</sub>; (h)D-Ins(1,2,5,6)P<sub>4</sub>; (j) D-Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub>; (l) D-Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub>/D-Ins(1,2,3,5,6)P<sub>5</sub>, (n) D-Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>; (o) InsP<sub>6</sub>; (x) unbekanntes InsP<sub>x</sub>

Mit NaOH ließen sich aus Holoferritin keine InsP extrahieren (Abb. 3.6-6 B) was darauf zurückzuführen ist, dass sich der Ferritin-Komplex unter den Versuchbedingungen nicht vollständig zerstören ließ. Nach Behandlung des Holoferritins mit 0,8 M NaOH bei 95 °C für 2,5 h war immer noch ein Proteinpellet erkennbar. Daher wurde versucht, den Holoferritin-Komplex in Gegenwart des Eisen-Chelators L1 mit Triton X-100 zu solubilisieren (Abb. 3.6-7 A) bzw. den Komplex unter sauren Bedingungen mit TCE zu hydrolysieren (Abb. 3.6-7 B).



**Abb. 3.6-7: Extraktion von InsP aus Holoferritin.** Solubilisierung mit Triton X-100 (A) oder saurer Hydrolyse (B). 5 mg Holoferritin wurden mit 0,2 % Triton X-100 oder 10 % TCE für 1 h, 5 h und 48 h bei 21 °C inkubiert. Die Überstände nach TCE Fällung wurden mit MDD-HPLC analysiert. Die Isomere sind nach Abb. 3.5-6 bezeichnet. (b) D-Ins(1,3,4)P<sub>3</sub>/D-Ins(1,2,6)P<sub>3</sub>/D-Ins(1,2,3)P<sub>3</sub>/D-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>/D-Ins(2,4,5)P<sub>3</sub>; (c) D-Ins(1,5,6)P<sub>3</sub> (f/g) D-Ins(1,2,3,4)P<sub>4</sub>/D-Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub>/D-Ins(1,2,4,5)P<sub>4</sub>; (h)D-Ins(1,2,5,6)P<sub>4</sub>; (j) D-Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub>; (k) D-Ins(1,2,3,4,6)P<sub>5</sub>; (l) D-Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub>/D-Ins(1,2,3,5,6)P<sub>5</sub>, (m) D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub>/D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub>; (n) D-Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>; (o) InsP<sub>6</sub>; (x) unbekannte InsP<sub>x</sub>

Die verschiedenen Extraktionsmethoden (saure Hydrolyse, Solubilisierung mit Detergenz) zeigten qualitative und quantitative Unterschiede im Hinblick auf die Zusammensetzung (Tab. 3.6-1) und Menge (Tab. 3.6-2) der aus Holoferitin extrahierten InsP-Isomere. Durch saure Hydrolyse von Holoferitin ließen sich etwa die 3fache Menge InsP<sub>5</sub>, die 2,4fache Menge InsP<sub>6</sub> und die 2fache Menge D-Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub> freisetzen als durch Behandlung mit Triton X-100 (Tab. 3.6-2). Weiterhin waren nach der Extraktion mit TCE zusätzliche Isomere detektierbar, vor allem InsP<sub>4</sub> und InsP<sub>3</sub>, aber auch ein PP-InsP<sub>4</sub>, das nach D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> eluiert (Tab. 3.6-1). Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass diese teilweise erst durch Dephosphorylierungen oder Phosphatmigrationen als Folge der Säurebehandlung entstanden sind.

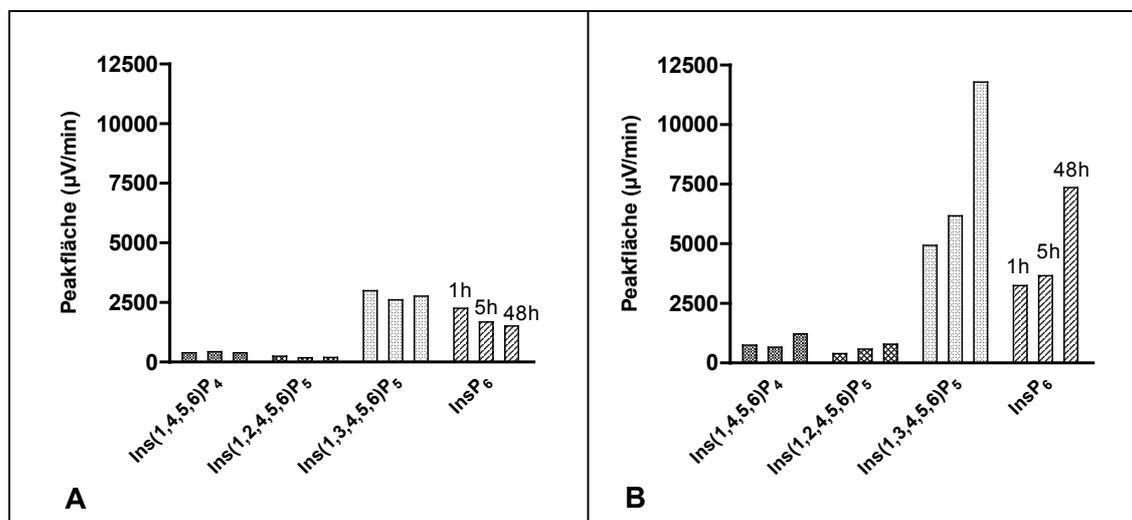
**Tab. 3.6-1: Detektierte InsP-Isomere nach Solubilisierung, saurer oder alkalischer Extraktion von Apo- oder Holoferitin.**

Isomer	Holoferitin		Apoferritin
	Triton X-100	TCE	NaOH
D-Ins(1,3,4)P <sub>3</sub> /D-Ins(1,2,6)P <sub>3</sub> / D-Ins(1,2,3)P <sub>3</sub> /D-Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> / D-Ins(2,4,5)P <sub>3</sub>	x	x	
D-Ins(1,5,6)P <sub>3</sub>	x	x	
D-Ins(1,2,3,4)P <sub>4</sub> /D-Ins(1,3,4,6)P <sub>4</sub>		x	x
D-Ins(1,2,4,5)P <sub>4</sub>		x	x
D-Ins(1,2,5,6)P <sub>4</sub>		x	x
D-Ins(1,4,5,6)P <sub>4</sub>	x	x	x
D-Ins(1,2,3,4,6)P <sub>5</sub>		x	
D-Ins(1,2,3,4,5)P <sub>5</sub> /D-Ins(1,2,3,5,6)P <sub>5</sub>		x	x
D-Ins(1,2,4,5,6)P <sub>5</sub> /D-Ins(2,3,4,5,6)P <sub>5</sub>		x	
D-Ins(1,3,4,5,6)P <sub>5</sub>	x	x	x
InsP <sub>6</sub>	x	x	x
X InsP <sub>2</sub>		x	
X InsP <sub>3</sub>		x	x
X PP-InsP <sub>4</sub>		x	

**Tab. 3.6-2: Menge der in 48 h aus Holoferitin mit Triton X-100 oder TCE extrahierten InsP.**

Extraktions- methode	D-Ins(1,4,5,6)P <sub>4</sub>	D-Ins(1,2,4,5,6) / Ins(2,3,4,5,6)P <sub>5</sub>	D-Ins(1,3,4,5,6)P <sub>5</sub>	InsP <sub>6</sub>
	[pmol/mg]	[pmol/mg]	[pmol/mg]	[pmol/mg]
0,2 % Triton X-100	6,6	2,4	40,7	24,2
10 % TCE	12,1	7,5	109,9	57,1

Aufschlussreich ist auch, dass im Verlauf von 48 h steigende Mengen  $\text{InsP}_5$  und  $\text{InsP}_6$  mittels Säureextraktion aus Holo ferritin freigesetzt wurden (Abb. 3.6-8 B), was bei einer Behandlung mit Triton X-100 (Abb. 3.6-8 A) nicht zu beobachten war. Hier blieb die Menge der extrahierten  $\text{InsP}$  etwa gleich. Die  $\text{InsP}$  sind demnach sehr stark mit Holo ferritin assoziiert und eine Solubilisierung des Proteinkomplexes reicht nicht aus, um die gebundenen  $\text{InsP}$  vollständig zu lösen. Wird dagegen die Proteinstruktur aufgelöst, wie es bei einer exzessiven Behandlung mit Säure der Fall ist, werden die  $\text{InsP}$ , wahrscheinlich in Abhängigkeit des Proteolysegrades, freigesetzt. Die Ergebnisse bestätigen die aus den Markierungsversuchen mit Rattenleberextrakten erlangte Vermutung, dass  $\text{InsP}$  spezifisch kovalent oder stark ionisch an Ferritin binden und in den Ferritin-Komplex eingebunden sind.



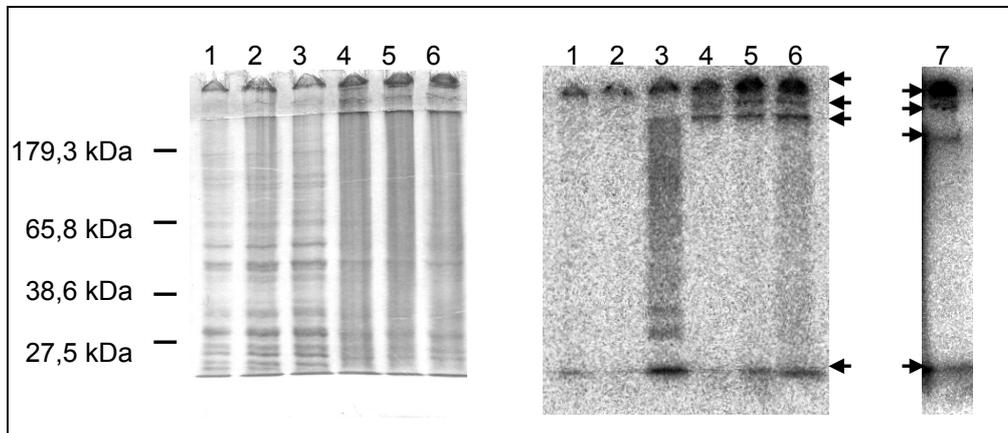
**Abb. 3.6-8: Zeitlicher Verlauf der Extraktion von  $\text{InsP}$  aus Holo ferritin.** Extraktionsmittel: Triton X-100 (A) oder TCE (B). Dargestellt sind die Flächen ausgewählter  $\text{InsP}$ -Peaks nach verschiedenen langen Extraktionszeiten. Zu beachten ist, dass die 48 h-Werte aus Extraktion von 2 mg Holo ferritin resultieren. Die extrahierte Proteinmenge nach 1 h und 5 h betrug nur 1,5 mg.

### 3.7. Ribosomen als möglicher Bindungspartner für hochphosphorylierte Inositolphosphate

#### 3.7.1. Bindung von hochphosphorylierten Inositolphosphaten an ribosomale Proteine

Außer verschiedenen Ferritin-Ketten wurden auch ribosomale Proteine in den Taschen des Sammelgels, in der hochmolekularen Trenngelbande und in der Lauffront der Proben in  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ -markiertem P100-Extrakt durch MS-Analyse identifiziert. Ribosomale Proteine sind häufig fest mit RNA assoziiert. Mögliches Akzeptormoleküle für ein hochphosphoryliertes  $\text{InsP}$  wäre daher nicht nur das Protein sondern auch die RNA. Für *in vitro* Versuche zur Überprüfung dieser Möglichkeiten wurden Präparationen ribosomaler Proteine verwendet, die RNA enthielten (etwa 1 µg RNA pro 7 µg Protein). Die ribosomalen Proteine wurden unter Standardbedingungen mit  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6/6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  inkubiert, wobei

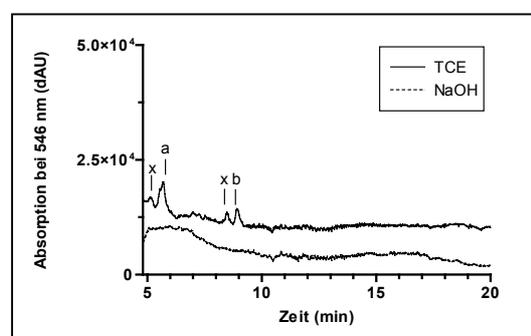
einigen Aliquots zusätzlich P100-Extrakt zugesetzt wurde, um eine Beteiligung von Enzymen an der Reaktion zu überprüfen. Es konnten keine radioaktiven Banden ohne Zusatz von P100-Extrakt detektiert werden (Abb. 3.7-1). Wurde P100-Extrakt zugesetzt, kam es zu keiner Verstärkung des Signals gegenüber den Kontrollen mit  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP und mit  $6[^{32}\text{P}]$ -InsP<sub>6</sub>/ $6[^{32}\text{P}]$ -PP-InsP<sub>5</sub>.



**Abb. 3.7-1: Bindung von hochphosphorylierten Inositolphosphaten an ribosomale Proteine.** Ribosomale Proteine wurden unter Standardbedingungen in Gegenwart von  $6[^{32}\text{P}]$ -InsP<sub>6</sub>/ $6[^{32}\text{P}]$ -PP-InsP<sub>5</sub> für 10 min (Spur 1 und 4) und 2 h (Spur 2 und 5) inkubiert. Zwei Proben wurden zusätzlich mit P100-Extrakt versetzt (Spur 4 und 5). Um „normale“ Phosphorylierung zu überprüfen, wurden ribosomale Proteine (Spur 3) und ribosomale Proteine plus P100-Extrakt (Spur 6) auch nur mit  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert. Die Proteinmenge pro Spur betrug 200  $\mu\text{g}$ . Zum Vergleich ist außerdem  $6[^{32}\text{P}]$ -InsP<sub>6</sub>/ $6[^{32}\text{P}]$ -PP-InsP<sub>5</sub>-markierter P100-Extrakt gezeigt (Spur 7). Bei dieser P100-Präparation tritt zusätzlich eine hochmolekulare Bande im Sammelgel auf. Die schwarzen Pfeile zeigen, dass alle radioaktiven Banden des  $6[^{32}\text{P}]$ -InsP<sub>6</sub>/ $6[^{32}\text{P}]$ -PP-InsP<sub>5</sub>-markierte P100-Extrakts auch bei Proben mit ribosomalen Proteinen plus P100-Extrakt auftreten. SDS-PAGE (10 % Acrylamid) und Autoradiogramm (Exposition 3 h).

### 3.7.2. Extraktion von Inositolphosphaten aus ribosomalen Proteinen

Die Extraktion von InsP aus ribosomalen Proteinen wurde mit alkalischer oder saurer Hydrolyse der Proteine durchgeführt. In Folge konnten keine hochphosphorylierten InsP gefunden werden. Mit saurer Hydrolyse wurden ein InsP<sub>3</sub> und InsP<sub>2</sub> freigesetzt (Abb. 3.7-2). Hochphosphorylierte InsP scheinen demnach nicht an ribosomale Komplexe zu binden.



**Abb. 3.7-2: Extraktion von InsP mit saurer und alkalischer Hydrolyse aus ribosomalen Komplexen.** Es wurden 2 mg ribosomale Proteine bei 21 °C für 48 h mit 10 % TCE versetzt oder für 1 h bei 90 °C mit 0,8 M NaOH inkubiert. Die Überstände aus der TCE-Fällung wurden mit MDD-HPLC analysiert. Nach NaOH Behandlung der Proteine ließen sich keine InsP nachweisen. In Folge saurer Hydrolyse wurden ein InsP<sub>3</sub> (b) und InsP<sub>2</sub> (a) freigesetzt. Die Isomere (a) und (b) sind der Abb. 3.6-5 zu entnehmen. Ein (x) bezeichnet ein unbekanntes Isomer.

### 4. Diskussion

#### 4.1. Charakterisierung der enzymatischen Eigenschaften der HsIP6K-2

Die IP6K-2 ist eine von drei IP6K-Isoformen, die im Genom von Säugern und Hefen gefunden, kloniert und bereits eu- und prokaryotisch exprimiert wurden [Saiardi *et al.*, 1999; Saiardi *et al.*, 2000]. Dabei wurde rekombinante IP6K-2 entweder eukaryotisch als GST-Fusionsprotein in HEK293T-Zellen oder prokaryotisch mit einem Polyhistidin-Anhang in *E. coli* BI21 exprimiert und durch Affinitätschromatographie gereinigt. Das unterschiedlich exprimierte und gereinigte Enzym zeigte deutlich verschiedene  $V_{max}$ - und  $K_m$ -Werte für das Substrat  $\text{InsP}_6$  (Tab. 4.1-1).

Für die Messung von Enzymaktivitäten mit dem gekoppelten optischen Test erwies es sich als notwendig, mindesten 1 mU IP6K-2 einzusetzen, da sonst die Bestimmung der Kinase-Aktivität über den NADH-Verbrauch durch die kontaminierenden ATPasen in den Indikatorenzyme PK und LDH überlagert wird. Der Vorteil eines optischen Tests gegenüber HPLC-Analysen zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität liegt vor allem in der höheren Genauigkeit beim Abmessen der Inkubationszeiten und in der unvergleichbar höheren Dichte der zu gewinnenden Datenpunkte über die Zeit. Im optischen Test wird jede Enzymkinetik als Einzeltransiente aufgezeichnet, während HPLC-Analysen auf Einzelmessungen beruhen, die einer gewissen Ungenauigkeit beim Abstoppen der Reaktion und bei der Aufarbeitung der Proben unterliegen. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde daher ein prokaryotisches Expressions- und Reinigungssystem etabliert, mit dem es möglich war, ausreichend große Mengen rekombinanter und aktiver humaner IP6K-2 zu gewinnen, um das Enzym im gekoppelten optischen Test vermessen zu können. Hier erwies sich die Expression der IP6K-2 als GST-Fusionsprotein in *E. coli* B834 (DE3) pLys als am erfolgreichsten. Allerdings musste der Affinitätschromatographie eine Ionenaustauschchromatographie angeschlossen werden, da der optische Test wahrscheinlich durch das Glutathion in der Enzympräparation gestört wurde. Reduziertes Glutathion reduziert Disulfidbindungen in Proteinen und kann dadurch z.B. zu einer Steigerung der Tryptophan-Eigenfluoreszenz bei 355 nm führen [Loferer *et al.*, 1995 und Freifelder, 1982: S. 537-545]. Dieses Phänomen wird dadurch erklärt, dass intakte Disulfidbindungen offenbar die Tryptophan-Fluoreszenz quenchen.

Ein Vergleich der Enzymaktivität der in dieser Arbeit exprimierten und gereinigten GST-IP6K-2 mit der Aktivität anderer rekombinanter IP6K-2-Fusionsproteine und gereinigter endogener RnIP6K zeigt, dass das verwendete Enzym deutlich aktiver ist, als die von Saiardi und Mitarbeitern [2000] prokaryotisch exprimierte 6xHis-IP6K-2. Allerdings erreichte das verwendete Enzym nur etwa 1/3 bzw. 1/4 der spezifischen Aktivität gereinigter endogener RnIP6K oder eukaryotisch exprimierter HsIP6K-2 (Tab. 4.1-1). Möglicherweise erfordert die IP6K-2 bestimmte eukaryotische Faktoren, wie z.B. Chaperone, die eine korrekte Faltung des naszie-

renden Proteins vermitteln [Fahnert, 2004]. Jedoch konnte durch Verwendung eines bakteriellen Expressionstammes (*E. coli* BL21 (DE3) GroELS RIL), der zusätzlich Chaperone exprimiert, keine Verbesserung erzielt werden. Eventuell benötigt die IP6K-2 auch posttranslationale Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierungen. Dennoch erwies sich das verwendete Enzym affiner gegenüber dem Substrat  $\text{InsP}_6$  als alle bisher publizierten Präparationen und zeigte einen ähnlichen apparenten  $K_m$ -Wert gegenüber ATP wie er bereits für die anderen IP6K-2 bestimmt wurde.

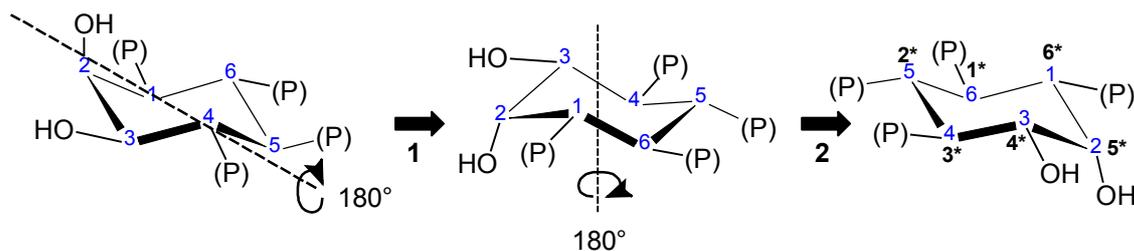
**Tab. 4.1-1: Vergleich der enzymatischen Charakteristika von unterschiedlich gewonnenen IP6K**

	spez. $V_{\max}$ (mU/mg)	$\text{InsP}_6$ $K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	ATP $K_m$ [mM]
<b>gereinigte endogene RnIP6K</b> [Voglmaier <i>et al.</i> , 1996]	1410 $\pm$ 168	0,70 $\pm$ 0,19	1,35 $\pm$ 0,11
<b>GST-HsIP6K-2 eukaryotisch exprimiert</b> [Saiardi <i>et al.</i> , 1999]	2000	3	1
<b>6xHis-HsIP6K-2 prokaryotisch exprimiert</b> [Saiardi <i>et al.</i> , 2000]	70 $\pm$ 20	0,43 $\pm$ 0,09	-
<b>GST-HsIP6K-2 prokaryotisch exprimiert</b> eigene Ergebnisse	561 $\pm$ 34	0,16 $\pm$ 0,05	1,96

Wie beschrieben (3.1.1.), unterliegt die IP6K-2 einer Produkthemmung durch PP- $\text{InsP}_5$ . Das Enzym zeigt einen  $K_i$ -Wert von 0,25-0,51  $\mu\text{M}$  (Tab. 3.1-2). Die für die verschiedenen Reaktionsbedingungen ermittelten  $K_i$ -Werte liegen damit in etwa doppelt so hoch wie die ermittelten  $K_m$ -Werte für  $\text{InsP}_6$  (0,16-0,22  $\mu\text{M}$ ), was auf eine Feinregulation des Enzyms durch sein Endprodukt hinweist. Die beobachtete Produkthemmung kann bedeuten, dass so eine Anreicherung von PP- $\text{InsP}_5$  verhindert wird. Gleichzeitig kann sie aber auch ein Zeichen sein, dass die enzymatische Reaktion ab einer bestimmten PP- $\text{InsP}_5$ -Konzentration in die entgegengesetzte Richtung verläuft, da PP- $\text{InsP}_5$  in Abwesenheit von ATP mit seiner Pyrophosphatgruppe ADP phosphorylieren kann [Voglmaier *et al.*, 1996]. Beide Annahmen lassen jedoch den Schluss zu, dass die PP- $\text{InsP}_5$ -Konzentration einer strengen Regulation der IP6K-2 unterliegt, die sich in einem sehr niedrigen (affinen)  $K_m$ -Wert für das Substrat  $\text{InsP}_6$  und einem ebenso niedrigen  $K_i$ -Wert für das Produkt PP- $\text{InsP}_5$  ausdrückt und PP- $\text{InsP}_5$  möglicherweise eine Signalfunktion für die Zelle hat. Möglicherweise haben  $\text{InsP}_6$  oder PP- $\text{InsP}_5$  bestimmte Regulierungsfunktionen im Metabolismus, die für das Überleben der Zelle notwendig sind, was in Kapitel (4.3.2.) diskutiert wird.

## 4.2. Substratselektivität der humanen IP6K-2

Alle  $\text{InsP}_5$ -Isomere und eine Auswahl verschiedener  $\text{InsP}_4$ - und  $\text{InsP}_3$ -Isomere wurden auf ihre Eignung als Substrate für die humane IP6K-2 getestet. Substrat-Produkt-Analysen zeigten, dass die IP6K-2 sowohl Hydroxygruppen am Inositolphosphatring phosphorylieren als auch bereits vorhandene Phosphatgruppen pyrophosphorylieren kann (OH- und P-Kinase-Aktivität). Um die Substratbindungsstelle des Enzyms zu charakterisieren, wurden Strukturvergleiche guter Substrate durchgeführt. Dazu war es nötig, die Inositolphosphatisomere z.T. räumlich gedreht darzustellen. Dabei wurden Rotationen um die vertikale und horizontale Achse durchgeführt. Um funktionellen Gruppen am Inositolphosphatring nach der Rotation eine Positionsnummer bezüglich ihrer räumlichen Ausrichtung zuweisen zu können, sind sie analog zu der D-Inositolphosphat-Grundstruktur nummeriert. Diese Nummerierung entspricht nicht der Standardnomenklatur und ist daher mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Die Inositolphosphate wurden immer so rotiert, dass die zu phosphorylierende Hydroxy- oder Phosphatgruppe an D-3'-äquivalenter Position (3\*-Position) wie in Abb. 4.2-1 dargestellt liegt.



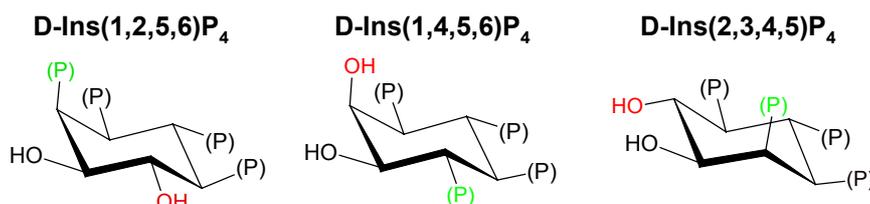
**Abb. 4.2-1: Rotation von Inositolphosphatisomeren um optische Achsen und Nummerierung der C-Atome am Beispiel von D-Ins(1,4,5,6) $\text{P}_4$ .** 1: vertikale Drehung des Moleküls. 2: horizontale Drehung des Moleküls. Die C-Atome sind ausgehend von der D-Inositolphosphat-Grundstruktur nummeriert. Die Positionsnummern der Phosphat- bzw. Hydroxygruppen sind unabhängig von der Standardnomenklatur und daher mit einem \* gekennzeichnet. Phosphatgruppen ( $(\text{PO}_4\text{H}_2)$ ) sind vereinfacht als (P) dargestellt.

### 4.2.1. Strukturelle Voraussetzungen für die Substraterkennung

Mit Hilfe von Substrat-Produkt-Analysen konnten die vom Enzym verwendeten Hydroxygruppen am Inositolring bzw. an seinen Phosphatestern ermittelt werden. Die Strukturen der getesteten Substrate und der per HPLC identifizierten Produkte wurden hierbei miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass IP6K-2-Substrate einige allgemeine Voraussetzungen erfüllen müssen, um als Substrate erkannt zu werden und für eine gute Substrateignung einige spezielle Merkmale aufweisen sollten, die vor allem die Stellung der axialen Phosphatgruppe (axiale P-Gruppe) bzw. axialen Hydroxygruppe (axiale OH-Gruppe) betreffen.

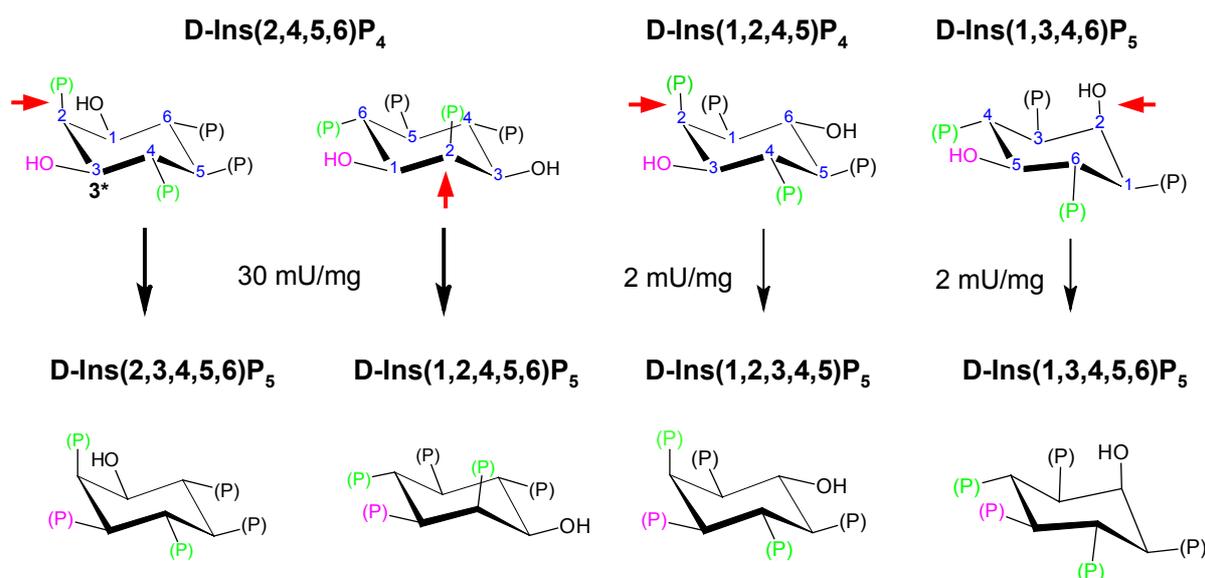
**4.2.1.1. Generelle Voraussetzungen für eine Phosphorylierung an der D-3'-äquivalenten Hydroxygruppe (D-3\*-OH)**

Die Analyse der nicht durch IP6K-2 umgesetzten Substrate zeigte, dass nur solche InsP um-gesetzt werden, die mindestens vier Phosphatgruppen am Inositolring aufweisen (InsP<sub>4</sub> und höher phosphorylierte InsP), wobei die zu phosphorylierende OH-Gruppe in Nachbarschaft von zwei P-Gruppen liegen muss. InsP<sub>4</sub>-Isomere, die in Nachbarschaft der zu phosphorylie-renden D-3\*-OH-Gruppe nur eine P-Gruppe aufweisen, werden nicht umgesetzt (Abb. 4.2-2).



**Abb. 4.2-2: Strukturen von InsP<sub>4</sub>-Isomeren, die nicht durch die IP6K-2 umgesetzt wurden.** Die Moleküle wurden so gedreht, dass die Phosphorylierungsstelle an D-3\*-Position liegt. Nachbarschaftliche Phosphatgruppen der Phosphorylierungsstelle sind grün und nachbarschaftliche Hydroxygruppen rot hervorgehoben.

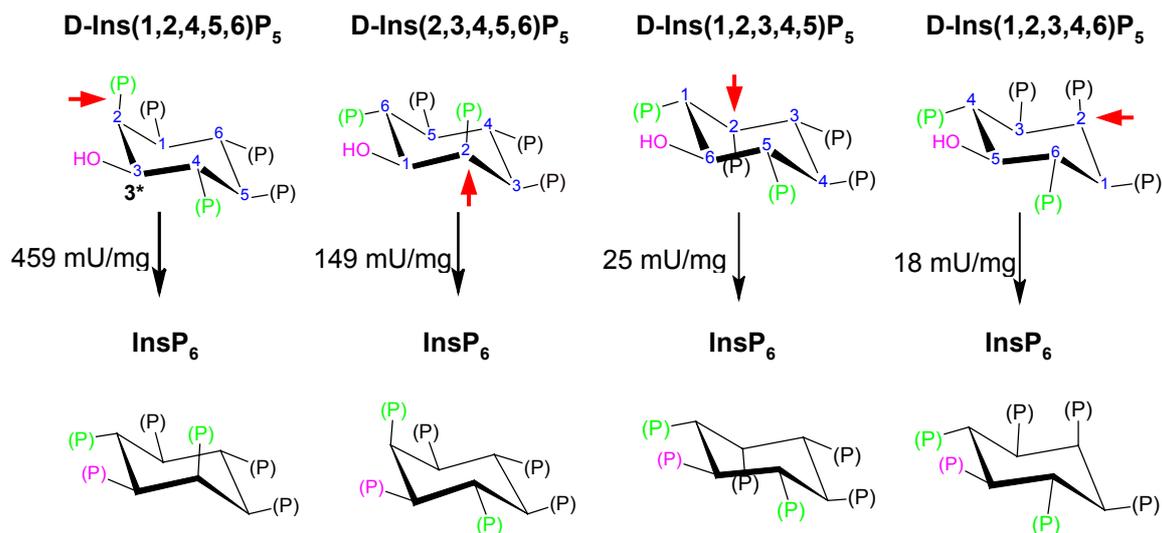
Außerdem muss die zu phosphorylierende D-3\*-OH-Gruppe äquatorial angeordnet sein. Ei-ne axiale OH-Gruppe wird nicht phosphoryliert. Sehr gut kann dies an den Umsätzen von D-Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub> und D-Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> nachvollzogen werden. D-Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub> wird aus-schließlich zu D-Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> phosphoryliert (Abb. 4.2-3), das wiederum zu einem PP-InsP<sub>4</sub> pyrophosphoryliert wird (Abb. 4.2-6). Auf den Mechanismus, mit dem die Pyrophospho-rylierung abläuft wird in einem späteren Abschnitt eingegangen (4.2.1.5.).



**Abb. 4.2-3: Strukturen von InsP<sub>4</sub>-Substraten der IP6K-2.** Die Moleküle wurden so gedreht, dass die Phosphorylierungsstelle (pink) an D-3\*-Position liegt. Nachbarschaftliche Phosphatgruppen der Phosphorylierungsstelle sind grün hervorgehoben. Die blaue Nummerierung kennzeichnet die C-Atome des Inositolrings nach Standardnomenklatur. Die Positionen der axialen P-Gruppen sind durch rote Pfeile markiert. Die Stärke der Reaktionspfeile (schwarz) bezieht sich auf die spezifische Aktivität, mit der ein Substrat umgesetzt wird. Angegeben sind die spezifischen Aktivitäten bei 5 µM Substrat.

4.2.1.2. Die D-2'- und D-4'-äquivalenten Phosphatgruppen (2\*- und 4\*-P)

Die zur D-3\*-OH-Gruppe nachbarschaftlichen Phosphatgruppen (D-2\*-P und D-4\*-P) dürfen sowohl in axialer und äquatorialer (z.B. D-Ins(2,4,5,6)P<sub>4</sub> in Abb. 4.2-3 und D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> in Abb. 4.2-5) als auch beide P-Gruppen in äquatorialer Stellung angeordnet sein, damit das Substrat durch die IP6K-2 umgesetzt wird (z. B. D-Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub> in Abb. 4.2-3 und D-Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> in Abb. 4.2-4). Offenbar ist es aber von Vorteil, wenn eine der beiden P-Gruppen axial steht. So werden D-Ins(2,4,5,6)P<sub>4</sub> und D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> und D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub> gegenüber den anderen InsP<sub>4</sub>- bzw. InsP<sub>5</sub>-Substraten mit deutlich höherer spezifischer Aktivität umgesetzt. Möglicherweise wird durch eine axiale Phosphatgruppe an D-2\*- oder D-4\*-Position die Substratbindungstasche des Enzyms erweitert, so dass die D-3\*-OH-Gruppe für eine Phosphorylierung besser zugänglich wird. Diese notwendige Erweiterung der Substratbindungstasche würde auch erklären, dass nur solche Substrate durch das Enzym akzeptiert werden, die eine P-Gruppe sowohl an D-2\*- als auch an D-3\*-Position aufweisen. Befindet sich an einer dieser beiden Positionen eine OH-Funktion, die einen viel kleineren Radius als eine P-Gruppe hat, ist die Substratbindungstasche vermutlich nicht genügend erweitert und die D-3\*-OH-Gruppe für eine Phosphorylierung nicht zugänglich und diese InsP werden wie bereits erwähnt nicht umgesetzt. Eine Ausnahme bildet hierbei D-Ins(1,2,4,5)P<sub>4</sub> (Abb. 4.2-3), das zwar eine axiale Phosphatgruppe an D-2\*-Position trägt, aber nur relativ schlecht umgesetzt wird. Möglicherweise führt dabei die Lage einer OH-Gruppe an Stelle einer P-Gruppe an D-6\*-Position zu einer schlechteren Ausrichtung des Isomers in der Substratbindungstasche.



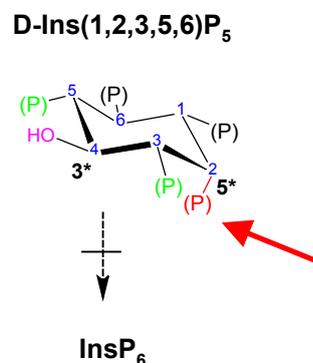
**Abb. 4.2-4: Strukturen von InsP<sub>5</sub>-Substraten der IP6K-2.** Die Moleküle wurden so gedreht, dass die Phosphorylierungsstelle (pink) an D-3\*-Position liegt. Nachbarschaftliche Phosphatgruppen der Phosphorylierungsstelle sind grün hervorgehoben. Die blaue Nummerierung kennzeichnet die C-Atome des Inositolrings nach Standardnomenklatur. Die Positionen der axialen P-Gruppen sind durch rote Pfeile hervorgehoben. Die Stärke der Reaktionspfeile (schwarz) bezieht sich auf die spezifische Aktivität, mit der ein Substrat umgesetzt wird. Es sind die spezifischen Aktivitäten bei 10 µM Substrat (D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> und D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub>) oder etwa 4 µM Substrat (D-Ins(1,2,3,4,6)P<sub>5</sub> und D-Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub>) angegeben.

### 4.2.1.3. Die D-1'- und die D-6'-äquivalente Phosphatgruppe (D-1\* und D-6\*)

Die Substrate D-Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> und D-Ins(1,2,3,4,6)P<sub>5</sub> (Abb. 4.2-4) werden durch die IP6K-2 nur mit mittlerer spezifischer Aktivität umgesetzt. Im vorigen Abschnitt wurde bereits erwähnt, dass es für die Phosphorylierung der D-3\*-OH-Gruppe offenbar von Vorteil ist, wenn die Substratbindungstasche des Enzyms durch eine axiale Phosphatgruppe in D-2\*- oder D-4\*-Position erweitert wird. Diese beiden Substrate tragen die axialen Phosphatgruppen an D-1\*- oder D-6\*-Position, die relativ entfernt zur Phosphorylierungsstelle liegen. Mutmaßlich führt dies zu keiner optimalen Erweiterung der Substratbindungstasche, so dass die D-3\*-OH-Gruppe für eine Phosphorylierung nur schwer zugänglich ist.

### 4.2.1.4. Die D-5'-äquivalente Phosphatgruppe (D-5\*)

Die D-4'-OH-Gruppe von D-Ins(1,2,3,5,6)P<sub>5</sub> wird nicht phosphoryliert (Abb. 4.2-5). Hier ist vermutlich nicht eine ungenügende Erweiterung der Substratbindungstasche durch die axiale Phosphatgruppe in D-5\*-Position entscheidend, sondern diese Lage könnte die Phosphorylierung sterisch behindern, d.h. die D-3\*-OH-Gruppe zumindest teilweise verdecken oder aber zu einem „Kippen“ des Substrates in der Bindungstasche führen, so dass dieses schlechter zugänglich wird.

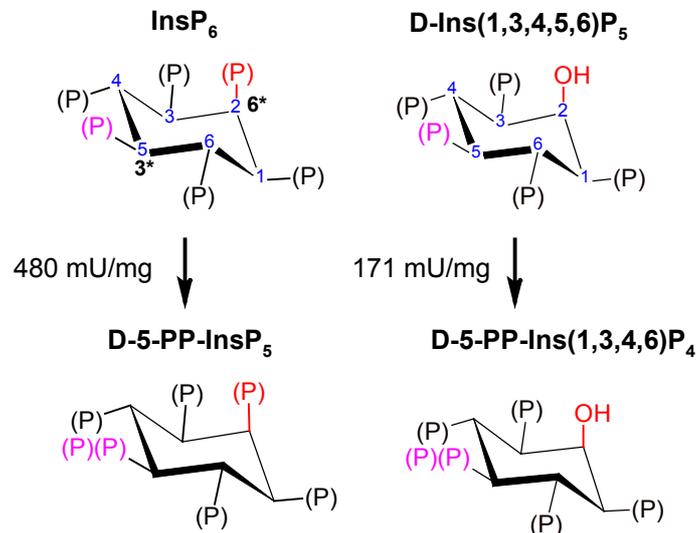


**Abb. 4.2-5: Struktur von D-Ins(1,2,3,5,6)P<sub>5</sub>.** Das Molekül wurde so gedreht, dass die Phosphorylierungsstelle (pink) an D-3\*-Position liegt. Nachbarschaftliche Phosphatgruppen der Phosphorylierungsstelle sind grün hervorgehoben. Die blaue Nummerierung kennzeichnet die C-Atome des Inositolrings nach Standardnomenklatur. Die axiale Phosphatgruppe ist rot gekennzeichnet (Pfeil).

### 4.2.1.5. Pyrophosphorylierung alternativer Substrate

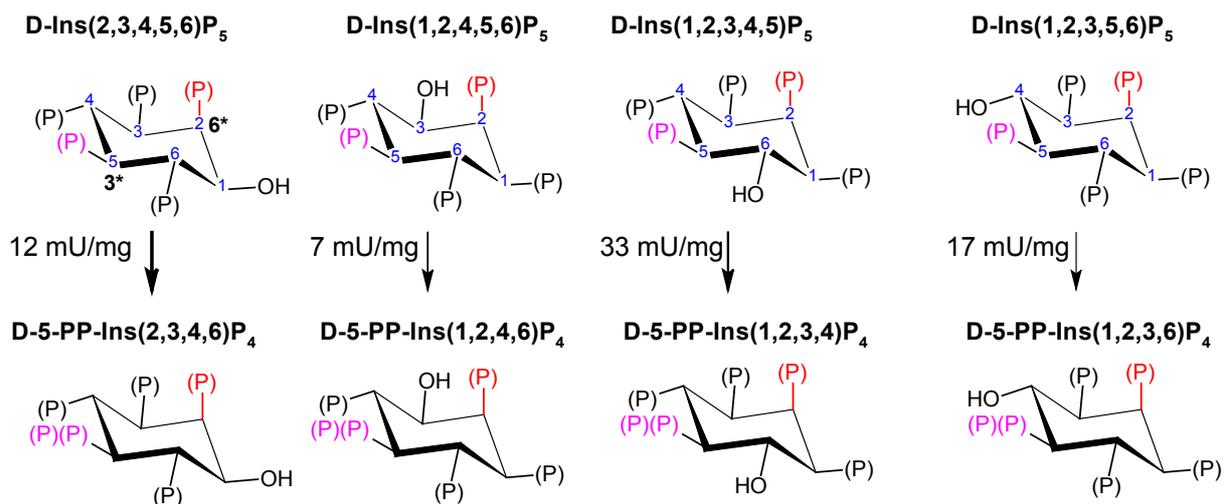
Die erste bekannte Funktion der IP6K-2 war ihre Fähigkeit, hochphosphorylierte InsP zu pyrophosphorylieren [Saiardi *et al.*, 1999; Saiardi *et al.*, 2000]. InsP<sub>6</sub> wird zu PP-InsP<sub>5</sub> und D-Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> zu PP-InsP<sub>4</sub> pyrophosphoryliert. Dabei erfolgt die Pyrophosphorylierung von InsP<sub>6</sub> an D-5'-Position zu D-5-Diphospho-*myo*-inositolpentakisphosphat (D-5-PP-InsP<sub>5</sub>) [Albert *et al.*, 1997]. Die strukturelle Ähnlichkeit und damit die vermutlich analoge Substratpositionierung bei der Pyrophosphorylierung von D-Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> und dem Hauptsubstrat InsP<sub>6</sub>

wird deutlich, wenn das  $\text{InsP}_5$ -Molekül so rotiert wird, dass die axiale Gruppe in D-6\*-Position angeordnet ist (Abb. 4.2-6). Vermutlich ist diese Positionierung der axiale Gruppe für die korrekte Ausrichtung des Substrats in der Bindungstasche am Enzym von Vorteil. Die Pyrophosphorylierung erfolgt dann wahrscheinlich analog an der D-5'-P-Gruppe.



**Abb. 4.2-6: Pyrophosphorylierung von  $\text{InsP}_6$  und  $\text{D-Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  durch die IP6K-2.** Die Moleküle wurden so rotiert, dass die Pyrophosphorylierungsstelle (pink) an D-3\*-Position und die axiale Gruppe (rot) an D-6\*-Position liegt. Die blaue Nummerierung kennzeichnet die C-Atome des Inositolrings nach Standardnomenklatur. Angegeben sind die spezifischen Aktivitäten bei 5  $\mu\text{M}$  Substrat.

Nach diesem Prinzip werden wahrscheinlich auch die anderen  $\text{InsP}_5$ -Isomere pyrophosphoryliert (Abb. 4.2-7).



**Abb. 4.2-7: Putative Pyrophosphorylierungsstellen verschiedener  $\text{InsP}_5$ -Isomere.** Die Moleküle wurden so rotiert, dass die Pyrophosphorylierungsstelle (pink) an D-3\*-Position und die axiale Gruppe (rot) an D-6\*-Position liegt. Die blaue Nummerierung kennzeichnet die C-Atome des Inositolrings nach Standardnomenklatur. Die Stärke der Reaktionspfeile bezieht sich auf die spezifische Aktivität mit der ein Substrat umgesetzt wird. Es sind die spezifischen Aktivitäten bei 10  $\mu\text{M}$  Substrat ( $\text{D-Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$  und  $\text{D-Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$ ) oder etwa 4  $\mu\text{M}$  Substrat ( $\text{D-Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$  und  $\text{D-Ins}(1,2,3,5,6)\text{P}_5$ ) angegeben.

Für diese Vermutung spricht auch, dass D-Ins(1,2,3,4,6)P<sub>5</sub> durch die IP6K-2 nicht zu PP-InsP<sub>4</sub>, aber zu InsP<sub>6</sub> umgesetzt wird. Wird dieses Molekül so rotiert, dass sich die axiale P-Gruppe in D-6\*-Position befindet (Abb. 4.2-4), dann befindet sich eine OH-Gruppe an D-3\*-Position, an der die Phosphorylierung zu InsP<sub>6</sub> stattfindet (4.2.1.3.). Die Annahme, dass nach dem oben im Text beschriebenen Muster pyrophosphoryliert wird, liefert auch eine Erklärung für das Auftreten von drei verschiedenen putativen PP-InsP<sub>4</sub>-Isomeren mit verschiedenen HPLC-Retentionszeiten (Tab. 3.2-2). Da sich die Pyrophosphatgruppe und die axialen Gruppe auf einer Symmetrieebene des Inositolphosphatmoleküls befinden, entstehen bei der Pyrophosphorylierung von Enantiomeren erneut Enantiomerenpaare mit identischen Retentionszeiten.

D-Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> wird von allen InsP<sub>5</sub>-Substraten mit der höchsten spezifischen Aktivität umgesetzt. Zusammen mit der Beobachtung, dass die getesteten InsP<sub>4</sub>-Isomere nicht direkt pyrophosphoryliert werden, wird ein für diese Reaktion limitierendes Merkmal der InsP-Substrate deutlich. Offenbar müssen für eine Pyrophosphorylierung neben der P-Gruppe an D-3\*-Position noch mindestens 4 weitere P-Gruppen am Molekül vorhanden sein. Vermutlich werden diese P-Gruppen benötigt, um, ähnlich wie bei der Phosphorylierungsreaktion einer D-3\*-OH-Gruppe, die Substratbindungstasche genügend zu erweitern, so dass die  $\alpha$ -[PO<sub>4</sub>]-Gruppe zugänglich wird und genügend Raum für eine weitere P-Gruppe (Pyrophosphatgruppe) vorhanden ist. Dabei beeinträchtigen OH-Substituenten an D-2\*- und D-4\*-Position (D-Ins(1,2,3,5,6)P<sub>5</sub> und D-Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub>) die Pyrophosphorylierung geringfügiger als solche, die an D-1\*- und D-5\*-Position angeordnet sind. Möglicherweise trägt die P-Gruppe an D-3\*-Position genügend zur Erweiterung der Substratbindungstasche an der Phosphorylierungsstelle des Substrats bei, so dass auf eine P-Gruppe an D-2\*- oder P-4\*-Position verzichtet werden kann.

### **4.2.1.6. Zusammenfassung der Substratselektivitäten**

Durch Rotation um die horizontale und/oder vertikale Achse der getesteten InsP-Substrate, konnten verschiedene limitierende Kriterien, für die Phosphorylierung einer D-3\*-OH-Funktion ermittelt werden. So sollten gute Substrate mindestens vier P-Gruppen aufweisen, die so angeordnet sein müssen, dass zwei P-Gruppen die D-3\*-OH-Gruppe an D-2\*- und D-4\*-Position flankieren, wobei eine dieser P-Gruppen axial stehen sollte. Vermutlich führt diese Anordnung zu einer genügend großen Erweiterung der Substratbindungstasche der IP6K-2, damit die im Vergleich zu einer P-Gruppe relativ kleinere OH-Gruppe zugänglich wird. Eine Position der axiale P-Gruppe an D-1\*, D-6\*-Stelle führt zu einer verminderten spezifischen Aktivität, während eine axiale P-Gruppe an D-5\*-Stelle wahrscheinlich aus sterischen Gründen eine Phosphorylierung der D-3\*-OH-Gruppe inhibiert.

Für die Pyrophosphorylierung von  $\text{InsP}_5$ -Substraten konnte ein Schema gefunden werden, nachdem diese wahrscheinlich in der Substratbindungstasche positioniert und pyrophosphoryliert werden. Dabei wird das  $\text{InsP}_5$ -Molekül so positioniert, dass sich die axiale Gruppe an D-6\*-Stelle befindet und die Pyrophosphorylierung an einer D-5'-äquivalenten Phosphatgruppe (D-5\*-P) stattfindet. Die strukturellen Merkmale der getesteten  $\text{InsP}_4$ - und  $\text{InsP}_5$ -Isomere sind in Tab. 4.2-1 zusammen gefasst.

**Tab. 4.2-1: Aufstellung der strukturellen Merkmale der getesteten  $\text{InsP}_4$ - und  $\text{InsP}_5$ -Isomere.** Angegeben sind außerdem die spezifische Aktivitäten für die OH-Phosphorylierung und die ermittelten  $k_{\text{cat}}$ -Werte. <sup>1</sup> Die D- $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  angegebene Werte beziehen sich auf die Pyrophosphorylierungsreaktion. Farblich abgehoben sind die Phosphorylierungsstelle (pink) und für die Phosphorylierung essentielle (grün) oder verbessernde Merkmale (blau).

Isomer	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$V_{\text{max}}$ (mU/mg)	Ringposition																		
			D-1*			D-2*			D-3*		D-4*		D-5*			D-6*					
			äq-P	äq-OH	ax-P	äq-P	äq-OH	ax-OH	ax-P	äq-OH	ax-P	äq-P	äq-OH	ax-P	äq-P	äq-OH	ax-P	äq-P	äq-OH	ax-OH	ax-P
D- $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$	-	459	+					+	+		+			+				+			
D- $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$	0,06	149	+			+			+				+					+			
D- $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$	0,02	25			+	+			+		+			+				+			
D- $\text{Ins}(2,4,5,6)\text{P}_4$	0,02	30		+				+	+		+			+				+			
D- $\text{Ins}(2,4,5,6)\text{P}_4$	0,02	30	+			+			+				+		+			+			
D- $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$	0,003	18	+			+			+		+			+							+
D- $\text{Ins}(1,2,4,5)\text{P}_4$	-	2	+					+	+		+			+					+		
D- $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$	-	2	+			+			+		+			+						+	
D- $\text{Ins}(1,2,3,5,6)\text{P}_5$	-	0	+			+			+		+					+		+			
D- $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$	0,07 <sup>1</sup>	171 <sup>1</sup>	+			+				+	+			+				+			
D- $\text{Ins}(1,2,5,6)\text{P}_4$	-	0	+					+	+			+		+				+			
D- $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$	-	0	+						+		+			+				+			
D- $\text{Ins}(2,3,4,5)\text{P}_4$	-	0	+				+		+				+	+				+			

Ein Vergleich der ermittelten  $k_{\text{cat}}$ -Werte (Tab. 4.2-1) zeigt, dass D- $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  ( $0,7 \text{ min}^{-1}$ ) und D- $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$  ( $0,6 \text{ min}^{-1}$ ) von den ausführlicher untersuchten Substraten am besten umgesetzt werden. D- $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$  erfüllt, wie in 4.2.1.2. beschrieben, strukturell mit die besten Voraussetzungen für eine Phosphorylierung der D-3\*-OH-Funktion. Von weiterem Interesse wäre auch die Kenntnis des  $k_{\text{cat}}$ -Werts für D- $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$ , das aufgrund seiner Struktur grundsätzlich auch ein gutes alternatives Substrat für die IP6K-2 ist, zumal die gemessene spezifische Aktivität gegenüber anderen  $\text{InsP}_5$ -Isomeren und  $\text{InsP}_6$  am höchsten war (Tab. 3.2-2). Der  $K_m$ -Wert wurde aber nicht bestimmt, da kein ausreichend reines D-

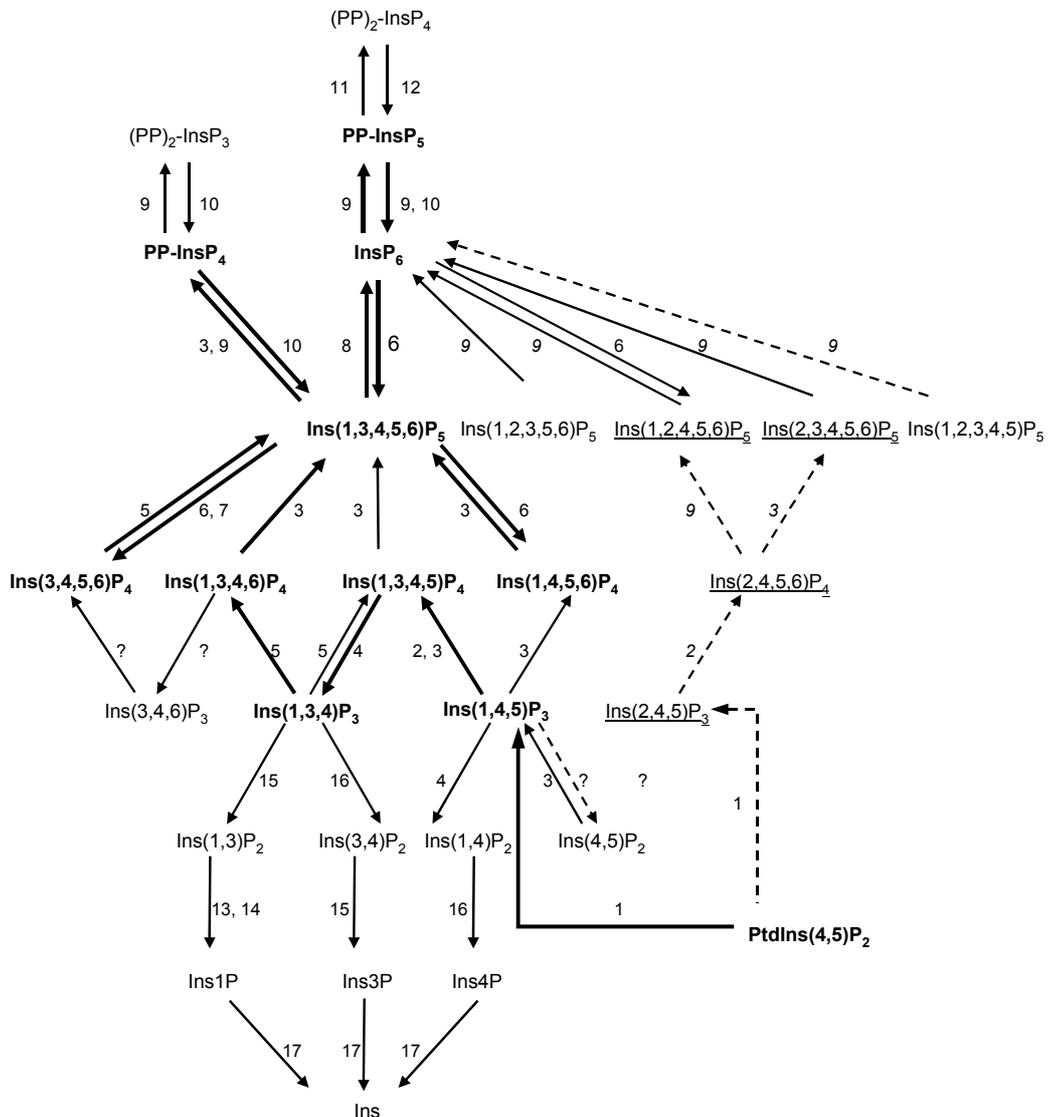
Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> verfügbar war. D-Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> ist bezüglich der Pyrophosphorylierung den Merkmalen des InsP<sub>6</sub>-Moleküls am ähnlichsten und wird daher am besten umgesetzt.

Leider ist es nur schwer möglich, die  $k_{\text{cat}}$ -Werte der alternativen Substrate mit dem  $k_{\text{cat}}$ -Wert für InsP<sub>6</sub> (Tab. 3.1-2) direkt zu vergleichen. Zum einen entstehen, wie es im Ergebnisteil bereits beschrieben wurde, bei der Konversion von InsP<sub>4</sub>- und InsP<sub>5</sub>-Isomeren mehrere Produkte, wobei die einzelnen Reaktionen nicht klar voneinander getrennt werden können. Die ermittelten  $k_{\text{cat}}$ -Werte für ein Substrat (aus  $V_{\text{max}}/K_{\text{m}}$ ) setzten sich also aus „gemischten“  $V_{\text{max}}$ - und  $K_{\text{m}}$ -Werten von verschiedenen Reaktionen zusammen. Grundsätzlich ist es möglich, mittels HPLC-Analysen der Substratkonversionen über die Fläche der Produkte-*Peaks* verschiedene Reaktionsgeschwindigkeiten für die einzelnen Reaktionen zu ermitteln. In diesem Fall wurde aber darauf verzichtet, da zumindest die Reaktion InsP<sub>6</sub> → PP-InsP<sub>5</sub> (4.1.) einer Produkthemmung der IP6K-2 unterliegt, die bei Multi-Produkt-Reaktionen wahrscheinlich alle ablaufenden Reaktionen betreffen würde. Zudem war es nicht möglich, aus den ermittelten apparenten  $K_{\text{m}}$ -Werten unter Einbeziehung der Produkthemmung „wahre“  $K_{\text{m}}$ -Werte zu bestimmen, da nicht bekannt ist, ob neben PP-InsP<sub>5</sub> noch andere Endprodukte die IP6K-2 hemmen. Wie sich anhand der enzymatischen Eckdaten für die Konversion von InsP<sub>6</sub> herausstellte, kann sich der  $k_{\text{cat}}$ -Wert um mehr als eine 10er Potenz unterscheiden, wenn die Produkthemmung nicht berücksichtigt wird ( $k_{\text{cat}}$  3,5 min<sup>-1</sup> bzw.  $k_{\text{cat, app}}$  0,3 min<sup>-1</sup>). Die für die alternativen Substrate gefundenen  $K_{\text{m, app}}$ - bzw.  $k_{\text{cat}}$ -Werte dürften daher in Wahrheit viel niedriger bzw. höher liegen. Demzufolge ist ein Vergleich der enzymatischen Eckdaten für die alternativen Substrate nur innerhalb dieser Gruppe sinnvoll.

### 4.2.2. Alternative Metabolisierungswege zur Synthese von InsP<sub>6</sub> und Inositolpyrophosphaten

Die als mögliche Substrate identifizierten InsP D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub>, D-Ins(1,2,3,5,6)P<sub>5</sub>, D-Ins(1,2,3,4,6)P<sub>5</sub>, D-Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>, D-Ins(1,2,5,6)P<sub>4</sub>, D-Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub> sind überwiegend in tierischen Zellen bereits nachgewiesene Isomere und teilweise Substrate anderer IP-Kinasen oder -Phosphatasen [Irvine & Schell, 2001]. D-Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> und D-Ins(2,4,5,6)P<sub>4</sub> wurden in Extrakten aus Leber- und Herzgewebe von Ratten identifiziert [Haverland, 2001]. D-Ins(1,2,4,5)P<sub>4</sub> konnte zumindest in pflanzlichen Zellen gefunden werden [Igaue *et al.*, 1982: S. 265-266]. D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub> wurde Literaturrecherchen zu Folge bisher nicht direkt in Zellen oder Geweben nachgewiesen, wird aber *in vitro* metabolisiert, wenn das Isomer Extrakten aus Rattenlebern zugesetzt wird [Haverland, 2001]. Mit solchen *in vitro*-Versuchen, bei denen verschiedene Inositolphosphatsubstrate Extrakten aus Rattenlebergewebe angeboten wurden, konnte Haverland eine Reihe von bisher unbekanntem IP-Kinase- und IP-Phosphatase-Aktivitäten nachweisen. So konnte er z.B. eine D-Ins(2,4,5)-6-, eine D-

Ins(2,4,5,6)P<sub>4</sub>-1/3-, eine D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub>-3-, eine D-Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub>-3- und eine D-Ins(1,2,3,5,6)P<sub>5</sub>-4-Kinase-Aktivität beobachten. Diese Beobachtungen ergeben zusammen mit neueren Erkenntnissen über andere IP-Kinase und die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse mindestens einen möglichen neuen Metabolisierungsweg zum InsP<sub>6</sub>, der in Abb. 4.2-8 ergänzend zu den bekannten Konversionswegen dargestellt ist.



**Abb. 4.2-8: Neue Phosphorylierungswege im Inositolphosphat-Metabolismus von Tieren.** Zusätzlich zu den bekannten Konversionswegen wurden ein neuer Syntheseweg zum InsP<sub>6</sub> eingefügt (gestrichelt). Der Hauptsyntheseweg von InsP<sub>6</sub> ist mit stärkeren Pfeilen dargestellt. **1** PLC; **2** IP3K; **3** IPMK; **4** Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>/Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>-5-Phosphatase Typ I; **5** IP3-5/6-K/IP4-1-K; **6** MIPP; **7** PTEN; **8** IP5-2-K; **9** IP6K; **10** DIPP; **11** Bis-Diphosphoinositolpolyphosphat-Synthase; **12** Diphosphoinositolpolyphosphat-Phosphohydrolase; **13** Ins(1,3)P<sub>2</sub>/PtdIns3P-3-Phosphatase Typ I; **14** Ins(1,3)P<sub>2</sub>/PtdIns3P-3-Phosphatase Typ II; **15** Ins(1,3,4)P<sub>3</sub>/Ins(3,4)P<sub>2</sub>/PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>-4-Phosphatase; **16** Inositol(1,4)P<sub>2</sub>/Ins(1,3,4)P<sub>3</sub>-1-Phosphatase; **17** Inositolmonophosphat-Phosphatase. Verändert nach Abel *et al.*, 2001 und Irvine & Schell, 2001.

Es finden sich in der Literatur Hinweise, dass die Synthese von InsP<sub>6</sub> nicht in allen Zellen über D-Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> erfolgt. D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> bzw. D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub> wurden z.B. in

T5-1 B-Lymphozyten (Epstein-Barr-Virus-transformierte B-Lymphozyten) gefunden [McCConnell *et al.*, 1991]. In Jurkat T-Zellen konnten neben D-Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> noch weitere InsP<sub>5</sub>-Isomere (D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> und/oder das Enantiomer D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub> sowie D-Ins(1,2,3,4,6)P<sub>5</sub>) detektiert werden [Guse & Emmrich, 1991]. D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub>/D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub> zeigte hier eine Ca<sup>2+</sup>-abhängige Konzentrationsänderung. Wurden die Zellen stimuliert, so dass es zu einer Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus intrazellulären Speichern kam, nahm u.a. die zelluläre Konzentration von InsP<sub>6</sub>, D-Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>, D-Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub>, D-Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub> und/oder D-Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub> zu, während die Konzentration von D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub>/D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub> abnahm. In diesen Zellen konnte auch eine D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub>/D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-3/1-Kinase-Aktivität gefunden werden. Vermutlich gibt es also im Inositolphosphat-Metabolismus verschiedene Konversionswege von einem Ausgangspunkt, z.B. Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, über unterschiedliche Intermediate zum InsP<sub>6</sub>, wobei jeweils verschiedene Sätze von IP-Kinasen beteiligt sind.

Das für den möglichen, neuen Syntheseweg (Abb. 4.2-8) nötige D-Ins(2,4,5)P<sub>3</sub> könnte auf zwei Arten entstehen. So könnte ausgehend vom Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> über Dephosphorylierung an D-1'-Position und nachfolgende Phosphorylierung an D-2'-Position D-Ins(2,4,5)P<sub>3</sub> generiert werden. Für tierische Zellen wird eine 1-Phosphatase-Aktivität angenommen, mit der D-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> zu D-Ins(4,5)P<sub>2</sub> dephosphoryliert wird [Jenkinson *et al.*, 1992; Lynch *et al.*, 1997]. Jedoch ist bisher keine Enzymaktivität bekannt, die D-Ins(4,5)P<sub>2</sub> zu D-Ins(2,4,5)P<sub>3</sub> phosphoryliert. Eine andere Möglichkeit wurde von Hughes und Mitarbeitern [1988] beschrieben. Sie zeigten, dass die PLC zu einem gewissen Anteil zyklisches Ins(1:2,4,5)P<sub>3</sub> (cIns(1:2,4,5)P<sub>3</sub>) produziert, das durch Hydrolyse zu D-Ins(2,4,5)P<sub>3</sub> konvertiert werden kann. Die Konversion zu D-Ins(2,4,5,6)P<sub>5</sub> könnte dann durch die IP3K-C erfolgen, die bezüglich dieses Substrates eine 6-Kinase-Aktivität zeigt [Nalaskowski *et al.*, 2003]. Der Schritt zum D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub> würde wahrscheinlich über die IPMK erfolgen. Wie bisher unveröffentlichte Ergebnisse der Arbeitsgruppe ergaben, zeigt dieses Enzym hinsichtlich des Substrats D-Ins(2,4,5,6)P<sub>4</sub> eine hohe spezifische Aktivität (spez. V<sub>max</sub> > 300 mU/mg), die in der vorliegenden Arbeit auch für die enantiomerenreine Synthese von D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub> genutzt wurde (2.4.13.1.). Die IP6K-2 hat dagegen nur eine spezifische Aktivität von 80 mU/mg für D-Ins(2,4,5,6)P<sub>4</sub>. Dagegen erfolgt der letzte Konversionsschritt vom InsP<sub>5</sub> zum InsP<sub>6</sub> sicherlich durch die IP6K-2, die für D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub> eine gute spezifische Aktivität zeigt (378 mU/mg). Die in der Literatur beschriebene D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub>-3-Kinase-Aktivität beruht wahrscheinlich auch auf der IP6K-2. Bisher ist in der Literatur kein Weg beschrieben, bei dem D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> synthetisiert wird. Durch einen weiteren alternativen Syntheseweg zum InsP<sub>6</sub> wäre ein Überleben einer Zelle gewährleistet, wenn ein Metabolisierungsweg gestört ist, z.B. durch Hemmung oder genetischen Ausfall bzw. Fehlen der IP5-2-K. Da außerdem die spezifische D-Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-2-Kinase-Aktivität mit etwa 30 mU/mg Enzym sehr niedrig ist und

zudem die IP5-2-K, wie *Northern-Blot*-Analysen zeigten, in einigen Geweben nur schlecht exprimiert wird [Verbsky *et al.*, 2002], hätte die Zelle außerdem die Möglichkeit, bei Bedarf einen zusätzlichen Syntheseweg „einzuschalten“. Dieser Bedarf könnte dann eintreten, wenn ein Metabolit wie z.B. InsP<sub>6</sub> gebraucht wird oder auch wenn ein anderes Metabolit wie z.B. D-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> „umgangen“ werden soll. Außerdem gibt es Hinweise, dass es sich bei diesem alternativen Syntheseweg zum InsP<sub>6</sub> in Wirklichkeit um einen phylogenetisch alten Weg handelt. Die Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-2-Kinase wird phylogenetisch nur bei Vielzellern gefunden. Nach aktuellen Genrecherchedaten haben sämtliche Protozoen keine Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-2-Kinase, jedoch nahezu alle Protozoen scheinen über eine IP6K zu verfügen, synthetisieren also PP-InsP<sub>5</sub> aus InsP<sub>6</sub>, und sind damit vermutlich obligat auf diesen alternativen Syntheseweg zum InsP<sub>6</sub> angewiesen [persönliche Mitteilung Prof. Dr. Mayr].

### 4.3. Inhibitoren der HsIP6K-2

Ein Ziel dieser Arbeit war es, einen IP6K-2-spezifischen Hemmstoff zu finden, mit dem es möglich sein sollte, das Enzym *in vivo* z.B. in kultivierten Zelllinien auszuschalten und damit pharmakologisch die Synthese von u.a. PP-InsP<sub>5</sub> zu unterdrücken. Durch solche Studien könnte die Wirkung der IP6K-2-Produkte auf die Proliferation von Zellen sowie auf verschiedene Strukturen und Funktionen innerhalb der Zelle untersucht werden. Für solche Studien ist es jedoch wichtig, auch die Wirkung der eingesetzten Inhibitoren auf verschiedene zelluläre „Schlüsselenzyme“ wie z.B. DNA-Polymerasen (4.3.1.) und die anderen IP-Kinasen (4.3.5.) zu kennen.

#### 4.3.1. Bekannte Wirkungen der eingesetzten Inhibitoren auf zelluläre Zielmoleküle

Unter Beachtung der Hemmstoffsensitivitäten verschiedener PDKG-Kinasen [Mayr *et al.*, 2005] konnten im Vorfeld potentiell gute IP6K-Inhibitoren abgeleitet werden, die sich im Experiment auch als potente Inhibitoren erwiesen.

Am effektivsten hemmt (-)-Epicatechin-3-gallat (ECG) mit einem IC<sub>50</sub> von 0,12 µM die IP6K-2-Aktivität. ECG ist ein Bestandteil in schwarzem und besonders in grünem Tee (bis zu 1,7 g pro 100 g Trockengewicht, aus: *U.S. Department of Agriculture database for the flavonoid content of selected foods*, 2003). In verschiedenen Studien mit Zellkulturen und Tiermodellen konnten antimutagene, antikanzerogene Wirkungen von Extrakten aus grünem Tee (*Camellia sinensis*) gezeigt werden. Zudem soll grüner Tee chemopräventive Eigenschaften haben [Chung *et al.*, 2003]. Der Wirkmechanismus ist bisher aber noch weitgehend unbekannt, zumal grüner Tee neben ECG noch eine Reihe weiterer, hochwirksamer polyphenolischer Substanzen enthält. In *in vitro*-Studien konnte eine inhibitorische Wirkung von ECG auf ver-

schiedene Enzyme der DNA-Synthese nachgewiesen werden. So hemmt ECG die DNA-Polymerase  $\alpha$  mit einem IC<sub>50</sub> von 0,48  $\mu\text{M}$  [Umekawa *et al.*, 1999] und die Topoisomerase II mit einem IC<sub>50</sub> von 0,15  $\mu\text{M}$  [Mayr *et al.*, 2005].

Ein zweiter sehr potenter Inhibitor der IP6K-2 ist Aurintricarbonsäure (ATA). Der IC<sub>50</sub>-Wert liegt bei 0,18  $\mu\text{M}$ . Studien mit glatten Muskelzellen zeigten eine antiproliferative Wirkung von ATA, die auf die Bindung des Inhibitors an einen spezifischen wachstumshemmenden Rezeptor auf der Zelloberfläche zurückzuführen sein soll [Benezra *et al.*, 1994]. Andererseits hat ATA vor allem antiapoptotische Effekte. So wird in der Literatur eine Hemmung generell von Nukleasen (IC<sub>50</sub> 2-50  $\mu\text{M}$ ) [Hallick *et al.*, 1977] und der Topoisomerase II (IC<sub>50</sub> 0,075  $\mu\text{M}$ ) [Catchpole & Stewart, 1994; Benchokroun *et al.*, 1995] *in vitro* beschrieben. Die Rolle der Topoisomerase II in der Apoptose ist nicht bis ins Detail geklärt. Die Topoisomerase II fügt DNA-Doppelstrangbrüche ein und kann diese wieder religieren. Damit wird eine „Entspannung“ superhelikaler DNA erreicht. Das Enzym spielt damit eine entscheidende Rolle bei der DNA-Replikation, der Trennung der Schwesterchromatiden während der Zellteilung und bei der Chromatinkondensation. Durch bestimmte Hemmstoffe wird die Fähigkeit der Topoisomerase II inhibiert, nach Einfügen von DNA-Doppelstrangbrüchen diese zu religieren [Walker & Nitiss, 2002] und vom DNA-Strang zu dissoziieren. Eine Hemmung der Topoisomerase II kann so die für die Apoptose nötige Chromatinkondensation verhindern, aber auch für die Zellteilung notwendige Prozesse inhibieren oder Apoptose durch eine induzierte Fragmentierung der DNA herbeiführen. Wie Studien mit unterschiedlichen Zelllinien belegen, moduliert ATA zusätzlich aber auch verschiedene Signalwege wie den MAPK/ERK- [Deng *et al.*, 2000 ; Okada & Koizumi, 1995] sowie den Jak/Stat-Signalweg [Grimley *et al.*, 1998; Marchisio *et al.*, 2004] und aktiviert den antiapoptotischen PI3K/Akt-Signalweg [Haimsohn *et al.*, 2002].

Gossypol stellt mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0,55  $\mu\text{M}$  ebenfalls einen potenten IP6K-2-Inhibitor dar. Gossypol ist ein Inhaltsstoff der Baumwollpflanze (*Gossypium sp.*), der besonders in den Samen und der Wurzelrinde enthalten ist und hier dem Fraßschutz vor Insekten dient. Gossypol bildet im Gastrointestinaltrakt der Insekten Komplexe mit Proteinen und hemmt so Enzymaktivitäten und die Nahrungsaufnahme. Gossypol hat vielfältige Wirkungen. Es ist ein Kardiotoxin [Ye *et al.*, 1989] und hemmt aber auch die Spermatogenese und Spermienmotilität, weshalb die Substanz in China als „Pille für den Mann“ diskutiert und geprüft wird [Gu *et al.*, 2000; Coutinho, 2002]. Für Gossypol ist ebenfalls eine antiproliferative Wirkung bekannt [Kovacic, 2003], die in einer Reihe von klinischen Studien untersucht wurde, z.B. zur Behandlung von Nebennierenkrebs [Flack *et al.*, 1993], von glialen Tumoren [Bushunow *et al.*, 1999] und Brustkrebs [Van Poznak *et al.*, 2001]. Die Gossypol-induzierte Apoptose von Zellen erfolgt wahrscheinlich über den Mitochondrien-vermittelten Signalweg [Zhang *et al.*, 2003].

und Hou *et al.*, 2004]. Außerdem führt Gossypol zu einem Arrest des Zellzyklus zwischen G0- und G1-Phase in HT-29 Dickdarm-Krebszellen [Zhang *et al.*, 2003].

Hypericin, ein Inhaltsstoff des Johanniskrauts (*Hypericum perforatum*), hemmt die IP6K-2 mit einem IC50-Wert von 0,72  $\mu\text{M}$  und ist damit ebenfalls ein wirksamer Inhibitor dieses Enzyms. Johanniskraut-Extrakt wird als Antidepressivum eingesetzt, wobei wahrscheinlich nichtselektiv die Aufnahme von Neurotransmittern in die Präsynapse durch einen anderen Inhaltsstoff der Droge, das Hyperforin, gehemmt wird [Mennini & Gobbi, 2004]. Hypericin ist photoaktivierbar, d.h. das Molekül geht bei Bestrahlung mit z.B. Laborlicht in einen energiereicheren Zustand über. Beim Übergang des Moleküls in den Grundzustand entstehen freie radikalische Zwischenformen, die in Gegenwart von molekularem Sauerstoff zur Bildung von reaktiven, zytotoxischem Singulett-Sauerstoff und generell zu einer Erhöhung des Hemmeffektes führen [Agostinis *et al.*, 1995; Fernandez *et al.*, 1997]. Diese Photoaktivierbarkeit von Hypericin wird medizinisch bei der Behandlung von Krebs genutzt [Agostinis *et al.*, 2002]. Für Hypericin wurde *in vitro* eine hemmende Wirkung auf eine Reihe von Proteinkinasen beschrieben. So erfolgt die Hemmung der PKC bei einem IC50-Wert von 1,7  $\mu\text{M}$  [Takahashi *et al.*, 1989] und der PI3K bei einem IC50-Wert von 0,18  $\mu\text{M}$  ohne vorherige Belichtung [Frew *et al.*, 1994] sowie der Wachstumsfaktor-Rezeptor regulierten Tyrosin-Kinase bei einem IC50-Wert von 0,044  $\mu\text{M}$  [de Witte *et al.*, 1993] und der MAPK bei einem IC50 von 4 nM [Agostinis *et al.*, 1995] nach Photoaktivierung des Inhibitors. Hypericin hat ebenfalls antiproliferative und apoptotische Effekte, die aber derzeit einer Hemmung der PKC zugeschrieben werden [Hamilton *et al.*, 1996, Zhang *et al.*, 1997, Harris *et al.*, 1996]. Weiterhin konnte eine Inhibierung der TNF $\alpha$ - und Tumorpromotor PMA-induzierten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B durch Hypericin in Krebszelllinien gefunden werden [Bork *et al.*, 1999].

Ein ebenso guter Inhibitor wie Hypericin ist 3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon (THF; IC50 0,72  $\mu\text{M}$ ). THF ist ein synthetisches Flavonoid, über das bislang keine Veröffentlichungen über *in vitro*-Effekte vorliegen. Mayr *et al.* [2004] haben THF hinsichtlich der Hemmwirkung gegenüber IP3-Kinasen und der IPMK untersucht. Die Ergebnisse werden daher in diesem Kontext in Abschnitt 4.3.5. diskutiert.

Quercetin ist ein im Pflanzenreich weit verbreiteter Inhaltsstoff. Die Substanz zeigt eine gute Hemmwirkung auf die IP6K-2 (IC50 0,78  $\mu\text{M}$ ). Aufgrund seiner antiproliferativen [Yoshida *et al.*, 1990; Kawaii *et al.*, 1999], antitumoralen [Molnár *et al.*, 1981; Deschner *et al.*, 1991] und apoptotischen Wirkung [Wei *et al.*, 1994] auf verschiedene Krebszelllinien und Tumoren *in vivo* ist Quercetin eine pharmakologisch gut untersuchte Substanz. Die antiproliferative Wirkung zeigt sich in Magenkrebszellen in einem Zellzyklus-Arrest in der späten G1-Phase (IC50 32-55  $\mu\text{M}$ ) [Yoshida *et al.*, 1990]. Neuere Untersuchungen zeigen, dass Quercetin in verschiedenen Krebszelllinien die Expression von Genen inhibieren oder hoch- bzw. herun-

terregulieren kann [Nair *et al.* 2004]. Von der Inhibition durch Quercetin sind verschiedene Zellzyklus-Gene der G1-, S-, G2 und M-Phase betroffen, wie z.B. die Cyclin-abhängigen Kinasen 2, 4 und 8 (CDK2, CDK4, CDK8) und verschiedene Cykline der D-, E-Familie und F-Familie (CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CCNE2, CCNF), sowie Gene, welche die Zellteilung kontrollieren (CDC2 und CDC16). Durch Quercetin werden verschiedene Tumorsuppressorgene hochreguliert, z.B. p53 und PTEN, und einige Onkogene herunterreguliert. Quercetin ist allgemein ein guter Inhibitor verschiedener Enzymaktivitäten. So wird z.B. die 5'-Nukleotidase mit einem IC<sub>50</sub> von 1,4 µM [Kavutcu & Melzig, 1999], die DNA-Polymerase β (Ki-Wert 0,47 µM) [Ono & Nakane, 1990] und die Phosphatidylinositol-Kinasen PI4K mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 6-10 µM [Singhal *et al.*, 1995] bzw. die PI3K mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 3,8 µM [Matter *et al.*, 1992] gehemmt. Außerdem konnte eine Hemmung der PKC (IC<sub>50</sub> 30,9 µM) und einer Protein-Tyrosin-Kinase (IC<sub>50</sub> 20,1 µM) festgestellt werden [Kang & Liang, 1997].

### 4.3.2. Die IP6K-2 als potentiell zelluläres Ziel für die getesteten Inhibitoren

Für alle getesteten Substanzen konnten in verschiedenen, bereits im Text beschriebenen *in vitro*- und *in vivo*-Studien eine antiproliferative Wirkung nachgewiesen werden, wobei die *in vivo*-Effekte von ATA wohl eher antiapoptotisch sind (4.3.1.). Die IP-Kinasen und insbesondere die IP6K-2 könnten nach den hier gefundenen IC<sub>50</sub>-Werten bevorzugte zelluläre Zielmoleküle für diese Hemmstoffe sein, zumal es Hinweise gibt, dass InsP<sub>6</sub> und PP-InsP<sub>5</sub> eine regulierende Rolle im Zellzyklus zukommt. Laussmann und Mitarbeiter [2000] konnten zeigen, dass diese beiden InsP sowie (PP)<sub>2</sub>-InsP<sub>4</sub> in den Schleimpilzen *Dictyostelium discoideum* und *Polysphondylium pallidum* lebens- und damit in diesem Fall auch zellzyklusabhängigen Schwankungen unterliegen. In humanen Prostatakarzinom-Zellen konnte gezeigt werden, dass Zellen einem G1-Arrest unterliegen, denen in hohen Dosen exogenes InsP<sub>6</sub> zugeführt wird (4 mM) [Singh *et al.*, 2003]. Bisher ist kein genauer Mechanismus bekannt, wie extrazellulär appliziertes InsP<sub>6</sub> von Zellen aufgenommen wird. Es gibt aber Beobachtungen, dass H<sup>3</sup>-markiertes InsP<sub>6</sub> von Zellen in Kultur internalisiert wird, wobei Pinozytose als Aufnahmemechanismus angenommen wird [Ferry *et al.*, 2002]. Der von Singh *et al.* [2003] beobachtete G1-Arrest beruht offenbar auf einer verstärkten Expression von Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren (CKI), wodurch bestimmte nukleäre Phosphoproteine (pRb/p107 und pRb2/p130) nicht phosphoryliert werden und dadurch verstärkt an Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie binden und diese so inaktivieren. Dadurch findet wahrscheinlich eine Unterdrückung von Genen statt, die für das Zellwachstum verantwortlich sind. Eine quantitative und qualitative Analyse des Inositolphosphatprofils in synchronisierten Ratten Brustkrebszellen ergab, dass in der G1-Phase des Zellzyklus die höchsten Konzentrationen von InsP<sub>6</sub>, PP-

InsP<sub>5</sub> und verschiedenen InsP<sub>5</sub>-Isomeren (u.a. auch Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>) vorliegen, in der S-Phase deutlich abnehmen und dann in der G2/M-Phase wieder ansteigen [Barker *et al.*, 2004]. Dabei zeigte PP-InsP<sub>5</sub> die stärksten Konzentrationsänderungen innerhalb des gesamten Zyklus. Ähnlich starke Konzentrationsänderungen wie PP-InsP<sub>5</sub> zeigte Ins(1,2,3)P<sub>3</sub>, das ein Dephosphorylierungsprodukt von InsP<sub>6</sub> sein soll [Barker *et al.*, 1995]. Diese Ergebnisse deuten ebenfalls darauf hin, dass PP-InsP<sub>5</sub> und damit auch die IP6-Kinase möglicherweise eine besondere Rolle im Zellzyklus spielen. Studien mit Hefen zeigten, dass InsP offenbar eine Rolle bei der Regulation der Expression von bestimmten Genen zukommen. Eine Deletion der IP6K-Homologs (Kcs1) oder des IPMK-Homologs (Arg82) in Hefen führte zu einer Hoch- oder Runterregulierung der Expression von 30 verschiedenen Genen [El Alami *et al.*, 2003]. Dabei wurde die Expression solcher Gene hochreguliert, die durch Phosphat reprimiert werden (PHO-Gene). Dagegen war die Expression von Genen verringert, die durch Stickstoff reguliert werden (NCR-Gene). Eine andere Studie mit Hefen zeigt, dass Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub>, Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> und InsP<sub>6</sub> regulierend auf ATP-abhängige Chromatin-Remodulierungs-Komplexe (SWI/SNF, ISW2, INO80) wirken, die wiederum u.a. die Expression von PHO-Genen regulieren [Shen *et al.*, 2003; Steger *et al.*, 2003]. Zumindest für den SWI/SNF-Komplex gilt es als gesichert, dass er eine wichtige Rolle beim Durchlaufen des Zellzyklus spielt, da er transkriptionsaktivierend wirkt [Peterson, 2002]. Weiterhin ist es bekannt, dass InsP<sub>6</sub> an die Ku-Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK) bindet und so die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen über die nicht-homologe Endverknüpfung stimuliert [Hanakahi & West, 2002; Ma & Lieber, 2002; Byrum *et al.*, 2004] und außerdem für den nukleären mRNA-Export essentiell ist [York *et al.*, 1999]. Eine aktuelle Studie belegt zusätzlich, dass verschiedene Tumorzelllinien, die eine inaktive IP6K-2 überexprimieren, unempfindlicher gegenüber Apoptose-Signalen wie IFN-β und γ-Strahlung sind. Zellstress führt in solchen Zellen zu einer 8fachen Erhöhung der PP-InsP<sub>5</sub>-Synthese, wobei es dabei zu einer Translokation der IP6K-2 aus dem Zellkern zu den Mitochondrien kommt, wo das Enzym mit dem proapoptotischen Protein Bax kolokalisiert [Nagata *et al.*, 2005]. Die Autoren vermuten, dass PP-InsP<sub>5</sub> über eine Kompetition mit PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> um die PH-Domäne von Akt den PI3K/Akt-Signalweg unterbricht, der für ein Überleben der Zelle wichtig ist. Generell scheinen InsP und damit auch die IP-Kinasen und IP-Phosphatasen regulierend auf verschiedene Prozesse der DNA-Replikation, Transkription und Translation zu wirken und könnten möglicherweise dadurch den Zellzyklus und die Proliferation beeinflussen.

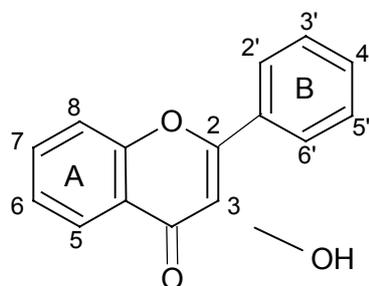
Allerdings werden durch die in dieser Arbeit untersuchten Hemmstoffe auch einige für die DNA-Replikation und die Zellteilung essentielle Enzyme wie DNA-Polymerasen und Topoisomerasen potentiell gehemmt. Ob antiproliferative Effekte tatsächlich auf eine Hemmung der IP6K-2 oder einer anderen IP-Kinase zurückzuführen sind oder aber auf der Hemmung von „Schlüsselenzymen“ wie der Topoisomerase II beruhen, müsste *in vivo* durch pharmakologi-

sche Studien mit Zelllinien geklärt werden. Letztlich basieren die angegebenen IC<sub>50</sub>-Werte auf *in vitro*-Experimenten und die in die Zelle aufgenommene wirksame Konzentration könnte deutlich von diesen Werten abweichen. Welche Enzyme tatsächlich gehemmt werden, hängt nicht zuletzt von der Fähigkeit einer pharmakologisch wirksamen Substanz ab, in die Zelle einzudringen und die Zielmoleküle zu erreichen.

Dennoch könnten die getesteten Hemmstoffe eingesetzt werden, um den InsP-Metabolismus durch Hemmung der IP6K direkt zu unterbrechen, wodurch möglicherweise neue Metabolisierungswege *in vivo* aufgeklärt werden könnten, an deren Umsetzung die IP6K beteiligt ist (4.2.2.).

### 4.3.3. Strukturelemente potenter Hemmstoffe der HsIP6K-2

Alle getesteten Substanzen sind potente IP6K-2-Inhibitoren mit IC<sub>50</sub>-Werten < 1 µM. Bevorzugte Inhibitoren sind Substanzen, die sterisch anspruchsvolle Substituenten mit ausgeprägter 3D-Struktur aufweisen (ECG, ATA; Gossypol, Hypericin). Zusätzlich könnte die Anzahl der negativen Ladungen am Hemmstoffmolekül für die Inhibitorwirkung von Bedeutung sein. Substanzen, die mehrere funktionelle Gruppen mit hoher negativer Ladung wie Carbonylfunktionen und Hydroxygruppen besitzen (ECG, ECG, ATA; Gossypol,.) sind potentere Inhibitoren als solche mit nur wenigen, negativ geladenen funktionellen Gruppen (THF, Quercetin). Interessant ist, dass Quercetin ein weniger potenter Inhibitor als THF ist, obwohl Quercetin eine Hydroxygruppe weniger als THF beinhaltet. Möglicherweise spielt hier die Ausrichtung der funktionellen Gruppen innerhalb der Molekülstruktur eine Rolle. Eventuell behindert im Quercetin die Hydroxygruppe an 3-Position des Pyronrings (Abb. 4.3-1) eine Hemmstoff-Enzym-Interaktion. Da aber die IC<sub>50</sub>-Werte von THF (0,72 µM) und Quercetin (0,78 µM) nicht sehr weit auseinanderliegen, müsste diese Vermutung mit anderen Substanzen, die sich in der Position dieser Gruppe unterscheiden (allgemein Flavonole und Flavone), weiter untersucht werden.



**Abb. 4.3-1: Allgemeine Molekülstruktur eines Flavons.** Flavonole besitzen eine Hydroxygruppe an 3-Position des Pyronrings.

### 4.3.4. Hemmtypen der Inhibitoren ECG, THF und Quercetin in Bezug auf die Substrate $\text{InsP}_6$ und ATP

Obwohl sich die eingesetzten Inhibitoren ECG, THF und Quercetin vom Flavon-Grundgerüst ableiten und strukturell, bis auf den Gallussäurerests substituenten im ECG, sehr ähnlich sind, wurden für die einzelnen Inhibitoren verschiedene Hemmtypen in Bezug auf die Substrate  $\text{InsP}_6$  und ATP gefunden. Dabei verhalten sich ECG und THF für beide Substrate ähnlich zueinander. In Bezug auf  $\text{InsP}_6$  konnte eine kompetitive Hemmung ermittelt werden, während die Hemmung gegenüber ATP einen nichtkompetitiven Hemmtyp zeigt. Dagegen ist die Hemmung durch Quercetin gegenüber  $\text{InsP}_6$  nichtkompetitiv und gegenüber ATP kompetitiv. Für Quercetin ist es bekannt, dass die Inhibitorwirkung auf bestimmte Kinasen (z.B. PKC und DNA-PK) kompetitiv zu ATP ist [Matter *et al.*, 1992; Izzard *et al.*, 1999], d.h. die ATP-Bindung wird direkt beeinflusst. Der  $K_i$ -Wert ist mit  $0,27 \mu\text{M}$  sehr empfindlich, so dass die IP6K-2 bei *in vivo*-Hemmversuchen möglicherweise zu den besonders empfindlich gehemmten Enzymen gehört. Zum Vergleich: der  $K_i$ -Wert für DNA-PK ist  $110 \mu\text{M}$  [Izzard *et al.*, 1999] und für die DNA-Polymerase  $\beta$   $0,47 \mu\text{M}$  [Ono & Nakane, 1990]. Ähnlich empfindlich wie die IP6K-2 wird die IP3K-A gehemmt. Der  $K_i$ -Wert für die Hühner IP3K-A wurde von Hillemeier [2001] mit  $0,2 \mu\text{M}$  bestimmt.

ECG und THF kompetitieren dagegen mit  $\text{InsP}_6$  um die Bindungsstelle am Enzym. Für eine kompetitive Interaktion eines Inhibitors mit einem Enzym muss der Inhibitor strukturell dem natürlichen Substrat des Enzyms ähnlich sein. Für Inhibitoren der IP6K-2 wurde bereits festgestellt, dass solche Moleküle potente Inhibitoren sind, die über eine ausgeprägte 3D-Struktur verfügen und möglichst eine hohe negative Ladungsdichte (wie auch  $\text{InsP}_6$ ) aufweisen. Der Vorteil eines zu  $\text{InsP}_6$  kompetitiven Inhibitors ist eine höhere Selektivität der Hemmung, als zum Beispiel bei einer kompetitiven Hemmung zu ATP. In letzterem Fall werden unter *in vivo*-Bedingungen wahrscheinlich die meisten ATP-verbrauchenden Enzyme betroffen sein. Allerdings werden durch ECG auch andere Enzyme sehr empfindlich gehemmt. So beträgt z.B. der  $K_i$ -Wert für die Hemmung der DNA-Polymerase  $\alpha$   $0,2 \mu\text{M}$  und für die DNA-Polymerase  $\beta$   $0,02 \mu\text{M}$  [Umekawa *et al.*, 1999]. Außerdem bindet ECG u.a. auch hochaffin an die IP3K-A. Der  $K_i$ -Wert für die Isoform aus Huhn beträgt  $0,04 \mu\text{M}$ . Die für die IP6K-2 ermittelten  $K_i$ -Werte für ECG ( $K_i$   $0,05 \mu\text{M}$ ) und THF ( $K_i$   $0,16 \mu\text{M}$ ) sind ebenfalls sehr empfindlich, so dass sich beide Substanzen für den Einsatz in *in vivo*-Versuchen zur Hemmung der IP-Kinasen eignen könnten. Da die Inhibitorwirkung von THF bisher nur im Hinblick auf IP-Kinasen und Topoisomerase II untersucht wurde [Mayr *et al.*, 2005], kann vorerst nicht abgeschätzt werden, welche anderen Enzyme durch diesen Hemmstoff unter *in vivo*-Bedingungen betroffen wären. Allerdings hat dieser Hemmstoff durch niedrige  $\text{IC}_{50}$ -Werte bei IP-Kinase-Messungen und den niedrigen  $K_i$ -Wert für die IP6-Kinase ein gutes Potential für einen relativ empfindlichen (selektiven) IP-Kinase-Hemmer.

4.3.5. Selektivität der untersuchten Inhibitoren für verschiedene IP-Kinasen

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Inhibitoren zeigten sich zuvor auch gegenüber den verschiedenen IP3K-Isoformen und teilweise auch gegenüber der IPMK (ATA, Gossypol) als sehr wirksam [Mayr *et al.*, 2005]. Dabei erwiesen sich für eine potente Hemmung der IP3-Kinasen multiple aromatische Ringsysteme mit mehr als drei phenolischen Hydroxygruppen und mindestens einer Carbonylgruppe als vorteilhaft. Auch hier wurden Moleküle mit komplexen, sog. „zweihändige“ 3D-Strukturen (ATA, Hypericin, Gossypol) bevorzugt. In Flavonen war zudem die Struktur des B-Ringes (Abb. 4.3-1), d.h. die Position und Anzahl der Substituenten, wichtig. Flavonole (mit 3-Hydroxy-Gruppe am Pyronring) zeigten im Allgemeinen eine bessere Hemmwirkung als Flavone. Außerdem konnte ein verstärkter Hemmeffekt bei Flavonolen beobachtet werden, die zusätzlich noch Hydroxygruppen in Nachbarschaft der Carbonylfunktion des Pyronrings aufwiesen. Anders verhielt sich die IPMK. Dieses Enzym wurde nur schlecht oder gar nicht durch potente IP3K-Inhibitoren gehemmt. Hier zeigte sich ein ähnlicher Effekt, wie er für die IP6K-2 beobachtet wurde. Offenbar sind solche Substanzen geeignete IPMK-Hemmer, die aufgrund von Säuregruppen eine hohe negative Ladung aufweisen (z.B. saure Triphenylmethane wie ATA).

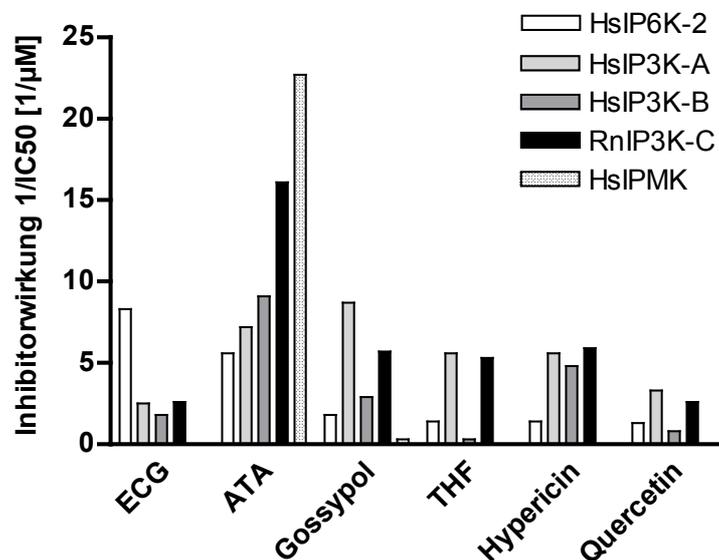


Abb. 4.3-2: Selektivität der getesteten Inhibitoren für verschiedene IP-Kinasen. Aufgetragen wurden die reziproken IC50-Werte, so dass ein hoher Balken mit einer potenten Inhibitorwirkung gleichzusetzen ist. Verändert nach Mayr *et al.*, 2005.

Begründet wurden die Unterschiede in der Hemmwirkung der getesteten Substanzen mit verschiedenen Hemmstoff-Enzym-Interaktionen. Bezüglich der IP3-Kinasen wird davon ausgegangen, dass es sich bei der Hemmstoff-Enzym-Interaktion um eine kovalente oder quasi-kovalente Bindung handelt, wie Auswaschungsversuche mit Triton X-100 und MS-Analysen





Hypericin, empfindlich, es konnte jedoch keine Abhängigkeit von der Anordnung der Hydroxygruppen am Flavon A-Ring bzw. eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Flavonolen beobachtet werden. Vielmehr scheinen die wirksamen Hemstoffe ATA und ECG nach dem „IPMK-Prinzip“ zu funktionieren, wobei sterische „Zwei- bis Mehrhändigkeit“ und hohe negative Ladung für einen potenten Hemmstoff ausschlaggebend sind. Der Hemmtyp, mit dem ein Inhibitor mit der IP6K-2 wechselwirkt, unterscheidet sich grundsätzlich von den für die IP3-Kinasen gefundenen Hemmtypen. Hier zeigten alle getesteten Hemmstoffe einen nicht-kompetitiven Hemmtyp in Bezug auf  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  und einen gemischten Hemmtyp in Bezug auf ATP. Die für die IP6K-2-Inhibitoren gefundenen Hemmtypen unterscheiden sich hemmstoff- und substratspezifisch. Hierbei zeigte sich, dass die IP6K-2 empfindlich kompetitiv zu  $\text{InsP}_6$  und damit relativ spezifisch durch ECG und THF gehemmt wird. Quercetin zeigte sich zwar auch als empfindlicher Hemmer der IP6K-2, kompetitiert allerdings mit ATP um die Bindungsstelle am Enzym und ist damit voraussichtlich unter *in vivo*-Bedingungen ein weniger spezifischer Hemmstoff für das Enzym. Innerhalb der PDKG-Familie zeigt die IP6K-2 eine eigene charakteristische Hemmstoffsensitivität. Möglicherweise ist diese Hemmstoffsensitivität auf IP6K-spezifische Segmenteinschübe zurückzuführen, was aber noch zu überprüfen ist.

Auf zellulärer Ebene ist anhand von Vergleichen der  $\text{IC}_{50}$ -Werte bzw. der  $\text{K}_i$ -Werte für verschiedene Enzyme davon auszugehen, dass die IP6K-2 ein empfindliches Zielmolekül für die getesteten Hemmstoffe darstellt. Allerdings liegen die  $\text{IC}_{50}$ -Werte für die meisten der getesteten Inhibitoren in einem Bereich, der in jedem Fall auch andere IP-Kinasen betrifft. Es ist davon auszugehen, dass bei *in vivo*-Hemmversuchen von IPK nur ECG einen spezifischen Effekt auf die IP6K-2 hat, weil die Empfindlichkeit der IP6K-2 3,6-4,8fach im Vergleich zu IP3-Kinasen erhöht ist (Abb. 4.3-2). Die IPMK wird durch ECG nicht wirksam inhibiert ( $\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{M}$ ). Um die tatsächlichen Zielmoleküle der getesteten Inhibitoren zu identifizieren, sollten *in vivo*-Hemmstoffversuche mit gekoppelten Analysen der  $\text{InsP}$ -Profile der behandelten Zellen durchgeführt werden. Weiterhin sollte die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass eine oder mehrere IP-Kinasen die eigentlichen Zielmoleküle der beschriebenen polyphenolischen Substanzen und damit verantwortlich für die in anderen Studien beobachteten Zellzyklus-Arreste sind. Solche Untersuchungen könnten ein neues Licht auf die Rolle von  $\text{InsP}$  und ihrer Synthesenzyme in der Regulation des Zellzyklus und der Proliferation werfen.

#### 4.4. Lokalisation der HsIP6K-2 in NRK52E- und H1299-Zellen

Für die *in vivo*-Lokalisationsexperimente wurde ein Fusionsprotein der humanen IP6K-2 mit C-terminalem EGFP-Anhang und der Kaninchen anti-Ratte-IP6K-2 Antikörper verwendet (3.4.). Bisher wurden subzelluläre Lokalisationsstudien der humanen IP6K-2 nur mit EGFP-

Fusionsproteinen durchgeführt [Saiardi *et al.*, 2001<sup>b</sup>]. In HEK293-Zellen zeigte die rekombinante IP6K-2 eine exklusiv nukleäre Lokalisation, während die IP6K-Isoform 1 ubiquitär in der Zelle verteilt und die Isoform 3 überwiegend zytoplasmatisch lokalisiert war. In NRK52E-Zellen konnten eigene Beobachtungen eine gleichartige Lokalisation des IP6K-2-Fusionsproteins bestätigen. In H1299-Zellen verhielt sich das Fusionsprotein jedoch anders und zeigte eine ubiquitäre Verteilung. Interessanterweise konnte aber eine offenbar strukturierte EGFP-Fluoreszenz in den Zellkernen beobachtet werden, die sich auf durch DAPI nur schwach anfärbbare Bereiche beschränkte, bei denen es sich deshalb vermutlich um Euchromatin oder um DNA-arme nukleoplasmatische Bereiche handelt.

H1299-Zellen haben besonders große Zellkerne (etwa 50 µm Durchmesser) und sind deshalb gut geeignet, um subzelluläre nukleäre Strukturen zu beobachten. Da es sich bei EGFP-Fusionsproteinen immer um rekombinante Proteine handelt, können solche strukturierten Erscheinungsbilder auch Folge einer durch den EGFP-Anhang gestörten zellulären Zielsteuerung sein. Zudem ist es nicht auszuschließen, dass durch Überexpression eines bestimmten Proteins mögliche Signaltransduktionswege oder Stoffwechselwege derart verändert werden, so dass die Zellen einen teilweise veränderten Phänotyp zeigen. Aus diesem Grund wurde versucht, endogene IP6-Kinase mit einem Antikörper nachzuweisen. Da der einzige verfügbare IP6K-Antikörper polyklonal ist, wurde er zuvor auf seine Spezifität in *Western-Blot*-Experimenten mit Zelllysaten und *in vivo* mit Zellen getestet, die einmal mit dem EGFP-IP6K-2-Fusionsprotein und einmal mit einem EGFP-IPMK-Fusionsprotein transfiziert waren. Der IP6K-Antikörper erwies sich dabei als sehr spezifisch.

Endogene IP6-Kinase (Isoform 1, 2, und/oder 3) ist den Ergebnissen zu Folge überwiegend, aber nicht ausschließlich nukleär lokalisiert und kolokalisiert auch hier mit putativ transkriptionell aktiven Bereichen des Chromatins oder DNA-armen nukleoplasmatischen Bereichen. Eine Lokalisation der IP6K-2 in *Speckles*, die bestimmte nukleäre prä-mRNA *Splicing*-Faktoren enthalten, konnte zwar in Kolokalisationsexperimenten unter Verwendung des IP6K-2-Antikörpers und des SC-35-Antikörpers ausgeschlossen werden, jedoch enthält der Nukleus in Säugerzellen noch weitere distinkte subnukleäre Strukturen, wie z.B. *Paraspeckles* und Cajal-Körper, die ebenfalls RNA-bindende Proteine bzw. prä-mRNA *Splicing*-Faktoren und Komponenten der ribosomalen RNA-Prozessierung enthalten [Lamond & Spector, 2003]. Eine Lokalisation der IP6K-2 mit solchen oder anderen subnukleären Strukturen müsste in weiteren Kolokalisationsexperimenten geprüft werden. Dennoch verstärken sich auch so die Hinweise, dass die IP6K offenbar im Zellkern Reaktionen katalysiert, deren Substrate und/oder Produkte in Prozesse involviert sind, die möglicherweise die Transkription und Translation betreffen, wie es z.B. bei der Chromatin-Remodellierung durch InsP<sub>6</sub> der Fall wäre [Shen *et al.*, 2003].

### 4.5. Bindung von InsP<sub>6</sub> / PP-InsP<sub>5</sub> an fetale Rattenleberextrakte

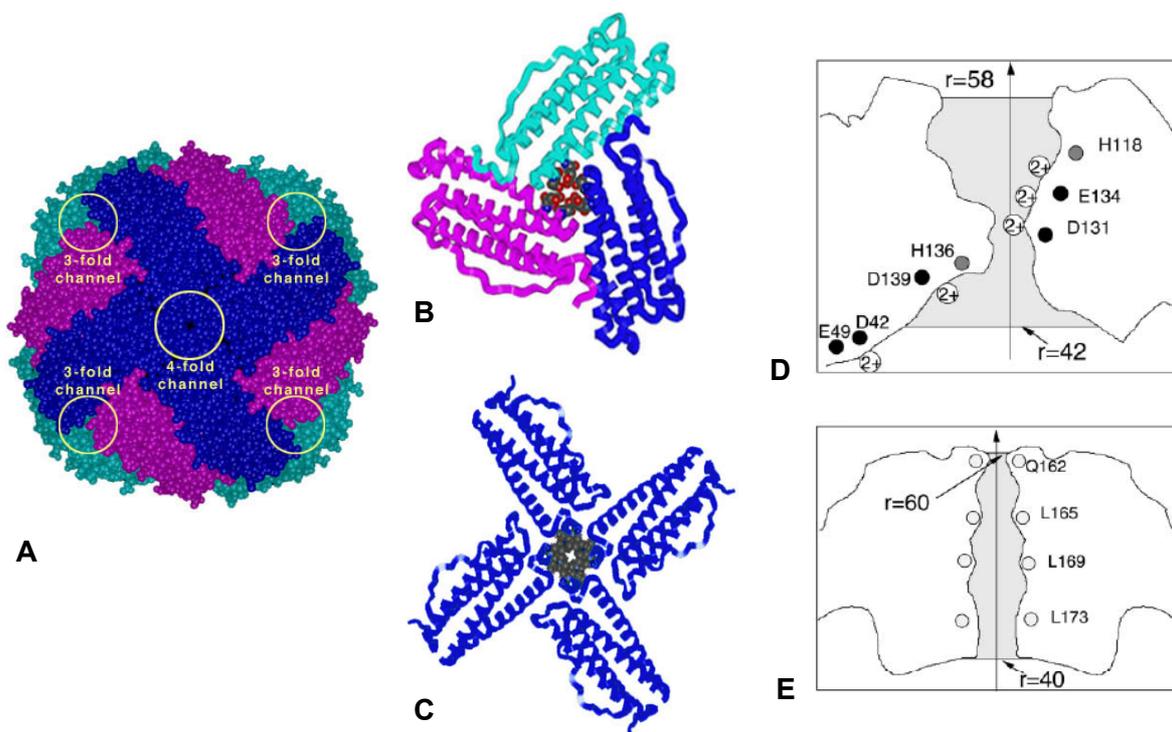
Gereinigte fetale Rattenleberextrakte (P100-Fraktion) ließen sich spezifisch mit [<sup>32</sup>P]-InsP<sub>6</sub>/α-[<sup>32</sup>P]-PP-InsP<sub>5</sub> markieren (3.5.). Dabei traten radioaktive Signale in der SDS-PAGE besonders im oberen Trenngelbereich (~ 200 kDa), in der Lauffront und in den Taschen des Sammelgels auf. Diese radioaktiven Signale nahmen in der Intensität zeitabhängig zu, erwiesen sich als säurestabil und waren offenbar mit Proteinen assoziiert, da sich die radioaktiven Banden mit verschiedenen Proteasen verkleinern und vollständig hydrolysieren ließen. Kleinere Abbaubanden nach Proteasebehandlung konnten nicht festgestellt werden. Demzufolge könnte es sich bei der Bindung der InsP um eine Assoziation mit einem hochmolekularen Proteinkomplex handeln, in dem die InsP „eingeschlossen“ werden oder möglicherweise sogar die (quer)vernetzenden Komponenten sind. Durch eine Behandlung mit Proteasen würde dieser Komplex „geöffnet“ und die InsP oder InsP-Peptide sukzessiv freigesetzt. Das würde erklären, dass keine Abbaubanden nach Proteasebehandlung im Gel nachweisbar waren und sich die radioaktive Bande über einen relativ breiten Bereich des Gels erstreckte, wie es bei verschiedengroßen Oligomeren eines Komplexes der Fall wäre. Sowohl die Zunahme der Intensität der radioaktiven Signale mit der Zeit als auch die Säurestabilität der radioaktiven Banden, deutete auf eine extrem feste ionische oder eine kovalente Bindung der InsP an das Peptidmaterial hin.

Mittels MS-Analysen ließen sich Bestandteile zwei verschiedener Proteinkomplexe, Ribosomen und Ferritin, im Bereich der markierten Proteinbanden identifizieren. Sowohl mit RNA-haltigen ribosomalen Proteinen als auch mit Apo- und Holo ferritin wurden *in vitro*-Bindungsexperimente mit 6[<sup>32</sup>P]-InsP<sub>6</sub>/6[<sup>32</sup>P]-PP-InsP<sub>5</sub> durchgeführt, um die MS-Ergebnisse zu überprüfen (3.6. und 3.7.). Dabei zeigte sich, dass sich Holo ferritin tatsächlich mit InsP markieren ließ. Apoferritin und ribosomale Proteine ließen sich nicht mit radioaktiven InsP markieren. Offenbar ist die Bindung der InsP an Ferritin *in vitro* abhängig vom Eisengehalt des Proteinkomplexes. Diese Vermutung wurde auch dadurch bestätigt, dass die Bindung der InsP an Holo ferritin durch Zugabe eines Eisenchelators gemindert, aber nicht vollständig unterbunden werden konnte.

Zusätzlich wurde versucht, Inositolphosphate aus Präparationen ribosomaler Proteine und käuflichem Apo -und Holo ferritin zu extrahieren. Dabei ließen sich sowohl aus Apo- als auch aus Holo ferritin u.a. verschiedene InsP<sub>5</sub>-Isomere und InsP<sub>6</sub> extrahieren. Dagegen konnten keine hochphosphorylierten InsP gefunden werden, die mit ribosomalen Proteinen assoziiert sind. Die Extraktion der InsP aus Holo ferritin erwies sich als sehr schwierig. Daher wurden verschiedene Extraktionsmethoden getestet, wobei sich mittels saurer Hydrolyse des Proteinkomplexes die 2-3fache Menge InsPs extrahieren ließ als durch Solubilisierung mit Triton

X-100. Auch dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die hochphosphorylierten InsP sehr fest mit dem Ferritin-Komplex assoziiert oder vernetzt sind.

Ferritin ist eines der wichtigsten Speicherproteine für Eisen. Eine gute Übersicht über die molekulare Struktur und die Funktion des Ferritins ist in Crichton [1991: S. 131-162] zu finden. Ferritin liegt als Proteinkomplex in Form einer Hohlkugel vor, die sich aus 24 Untereinheiten zusammensetzt (Abb. 4.5-1 A). Ist diese Hohlkugel nicht mit Eisen beladen, wird von Apoferritin gesprochen, dessen humane Formen aufgrund von gewebespezifischen Mikroheterogenitäten Molekulargewichte von etwa 460-550 kDa besitzen. Apoferritin kann je nach Gewebe und Spezies bis zu 4500 Eisenatome aufnehmen und wird, wenn es mit Eisen beladen ist, Holo ferritin genannt.

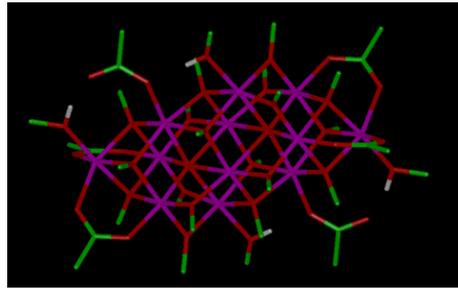


**Abb. 4.5-1: Molekulare Darstellung der Ferritin-Kugel und ihrer Kanäle.** **A:** Darstellung der Apoferritin-Kugel aus Ochsenfrosch (*Rana catesbeiana*) und Sitz der Kanäle. Dabei sind die Untereinheiten zur besseren Übersicht farblich voneinander abgegrenzt. Die Atome sind nach dem Kalottenmodell dargestellt. **B:** Der 3zählige, hydrophile Kanal dient dem Transport von  $\text{Fe}^{2+}$ . Die den Kanal auskleidenden Aminosäuren sind nach dem Kalottenmodell dargestellt, während die Reste der Untereinheiten als Ketten abgebildet sind. **C:** Durch den 4zähligen, hydrophoben Kanal treten wahrscheinlich Protonen aus. Die den Kanal auskleidenden Aminosäuren sind nach dem Kalottenmodell dargestellt, während die Reste der Untereinheiten als Ketten abgebildet sind. (Die Abbildungen sind der Internetseite der *Washington University*, St. Louis entnommen: [www.chemistry.wustl.edu/EduDev/Ferritin](http://www.chemistry.wustl.edu/EduDev/Ferritin).) **D:** Schematische Darstellung eines Längsschnitts durch den 3zähligen Kanal. **E:** Schematische Darstellung eines Längsschnitts durch den 4zähligen Kanal. D: Asparaginsäure, H: Histidin, E: Glutaminsäure, L: Leucin, Q: Glutamin. "r" gibt den Radius des inneren und äußeren Durchmessers in Å der Ferritin-Kugel an dieser Stelle an. Aus: Takahashi & Kuyucak, 2003.

Es gibt zwei Typen von Untereinheiten, welche durch *Self-Assembly* die Ferritinkugel formen und deren Anteile bei der Zusammensetzung der Ferritinkugel gewebe- und artspezifisch

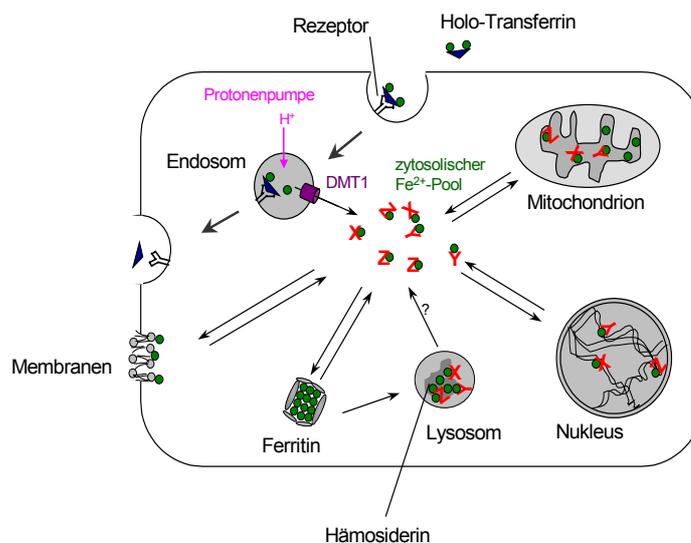
schwanken. Diese Untereinheiten unterscheiden sich nicht nur im Molekulargewicht sondern auch in der Aminosäurekomposition. Die schwere Untereinheit (H; MW = 22 kDa) enthält mehr saure As und überwiegt im Ferritin aus Herzgewebe, während die leichte Untereinheit (L; MW = 20 kDa) eher basisch ist, im Ferritin aus Leber und Milz dominiert und insgesamt allgemeiner verbreitet ist. Die Ferritin-Hülle enthält zwei verschiedene Typen von Kanälen, die eine 3- oder 4zählige Symmetrie aufweisen und mit hydrophoben und hydrophilen Resten ausgekleidet sind (Abb. 4.5-1 B und C). Die Kanäle entstehen dort, wo die 24 Untereinheiten aneinandergrenzen. Die mit hydrophilen As (Asparaginsäure, Glutaminsäure, Histidin) ausgekleidete 3zählige Kanalsorte dient dem Transport der Eisen-Ionen. Die As sind im Zentrum des Kanals so positioniert, dass ein Gradient entlang elektrostatischer Potentiale entsteht, welche die Aufnahme von bis zu drei  $\text{Fe}^{2+}$  in den Kanal ermöglichen [Takahashi & Kuyucak, 2003]. Die andere hydrophobe, 4zählige Kanalsorte ist mit Leucinen und Glutaminen ausgekleidet und für zweiwertige Ionen undurchlässig. Es wird angenommen, dass durch diese Kanalsorte Protonen austreten, die bei der Umwandlung und von  $\text{Fe}^{2+}$  zu Ferrihydrit entstehen [Takahashi & Kuyucak, 2003]. Die Ferritin-Kanäle haben in kristallisiertem Ferritin einen Durchmesser von etwa 0,4 nm [Crichton, 1991: S. 141]. Es konnte aber beobachtet werden, dass Moleküle bis zu 13 Å (1,3 nm) die Poren passieren können [Yang & Nagayama, 1995], wobei der Mechanismus, mit dem sich die Poren erweitern, bisher nicht genau bekannt ist. Mikroskopische Untersuchungen zeigten jedoch, dass durch dynamische Dissoziation und Assoziation von Ferritin-Untereinheiten kurzlebige Öffnungen von 2-3 nm in der Ferritin-Kugel entstehen [Masover, 1993].

Das Eisen wird vor allem als  $\text{Fe}^{2+}$  vom Ferritin aufgenommen. Der initiale Vorgang der Eiseninkorporation benötigt eine Nukleationsphase an bestimmten Stellen des Ferritin-Proteins. An diesen Nukleationsstellen, die sich an oder in der Nähe der hydrophilen Kanäle befinden, findet eine Oxidation durch molekularen Sauerstoff des  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{3+}$  statt. Liganden an der Ferritinoberfläche richten den Eisen-Nukleationskern aus und katalysieren wahrscheinlich auch seine Oxidation. Nukleationsstellen mit sog. Ferroxidase-Aktivität beschränken sich auf die H-Untereinheiten. Die in die Nukleation und Oxidation involvierten As-Liganden sind Glutaminsäuren, Asparaginsäure und Histidin [Barnés *et al.*, 2002]. Außerdem wird angenommen, dass Phosphat-Ionen in die Bindung des Eisens an das Protein beteiligt sind. Sie sollen Oberflächen-Hydroxygruppen ersetzen, wobei positiv geladene Lysine und Arginine an der Innenseite der Ferritin-Kugel abgedeckt werden [Crichton, 1991: S.139]. Ist ein Nukleationskern entstanden, wird an diesem weiteres Eisen oxidiert, so dass der Eisenkern von dort aus wächst. Das Eisen wird innerhalb des Ferritin-Proteins in Form einer mehr oder weniger phosphathaltigen Fe(III)oxo-Hydroxid-Struktur gespeichert (Abb. 4.5-2).



**Abb. 4.5-2: Vereinfachtes Modell des Eisenmineral-Kerns.** Kohlenstoff ist grün, Sauerstoff rot, Wasserstoff weiß und Eisen in Magenta dargestellt. (Die Abbildung wurde der Internetseite der *Washington University*, St. Louis entnommen: [www.chemistry.wustl.edu/EduDev/Ferritin](http://www.chemistry.wustl.edu/EduDev/Ferritin).)

Eisen wird im Blut als  $\text{Fe}^{3+}$  fast ausschließlich an ein Trägerprotein, Transferrin, gebunden transportiert. Die Aufnahme des Eisens in die Zellen erfolgt endozytotisch über die Internalisierung von Transferrin-Rezeptor-Komplexen (Abb. 4.5-3).



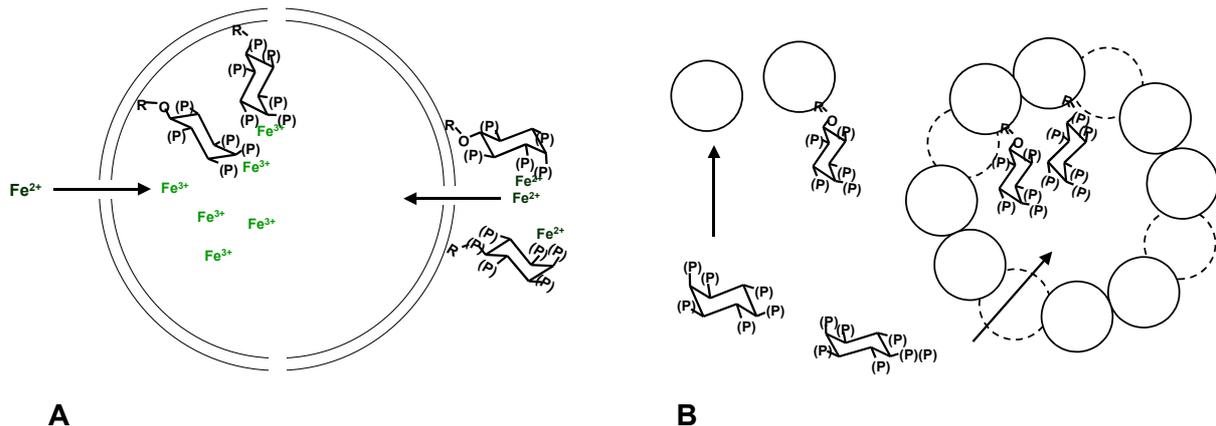
**Abb. 4.5-3: Schematische Darstellung der rezeptorvermittelten Transferrin-Endozytose.** Mit Eisen beladenes Transferrin (Holo-Transferrin) bindet an Rezeptoren an der Zelloberfläche und wird endozytotisch aufgenommen. Eisen wird nach Ansäuerung des Endosoms vom Transferrin-Rezeptor-Komplex getrennt und wahrscheinlich über DMT1 (Divalenter Metall-Transporter 1) aus dem Endosom freigesetzt. Eisen wird dann über niedermolekulare Liganden (X, Y, Z) zu verschiedenen Zielen in der Zelle transportiert. Ferritin-Moleküle können miteinander aggregieren und werden dann von Lysosomen zu eisenhaltigem Hämosiderin degradiert. Die Abbildung wurde verändert nach Petrat *et al.*, 2002.

Das Endosom wird über eine membranständige ATP-abhängige Protonenpumpe angesäuert und es erfolgt die Trennung des Eisens vom Transferrin. Das Eisen wird über einen Divalenten Metalltransporter 1 (DMT1) bzw. DMT2 in intestinalen Kryptzellen aus dem Endosom freigesetzt und von in Art und Struktur unbekanntem niedermolekularen, zytosolischen Liganden gebunden und z.B. zu den Mitochondrien oder zum Ferritin transportiert [Rolfs & Hediger, 2001]. Es wird spekuliert, dass es sich bei diesen niedermolekularen Liganden u.a. um

AMP oder ADP handeln könnte, da diese beiden Moleküle in *in vitro*-Experimenten mit Zelllysaten die höchste Affinität zu Eisen zeigten [Pollack *et al.*, 1985 und Weaver & Pollack, 1989]. Die Konzentration des zytosolischen Eisens wird mit 0,6-12,3  $\mu\text{M}$  angegeben. Die starke Konzentrationsschwankung der gemessenen zytosolischen Eisen-Konzentrationen sind auf die Verwendung verschiedener Chelatoren zum Nachweis des Eisens zurückzuführen. Dieses zytosolische Eisen wird auch als „chelatierbares“ Eisen bezeichnet, da es sich mit Hilfe von verschiedenen fluoreszierenden Indikatoren wie z.B. Calcein-Acetoxy-methylester (Calcein AM), 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-desferrioxamin (NBD-DFO) oder Phengrün SK-diacetat (PG SK) nachweisen lässt. Da nun je nach verwendetem Chelator, unterschiedliche Eisen-Konzentrationen gemessen werden, sind sehr wahrscheinlich unterschiedliche Liganden in den intrazellulären Eisentransport beteiligt, die je nach Bindungsaffinität des Chelators gegenüber Eisen detektiert werden [Petrat *et al.*, 2002].

Es gibt noch einige weitere Mechanismen der zellulären Eisenaufnahme, von denen vor allem die Aufnahme über DMT1 in den Enterozyten des Darms zu nennen ist. DMT1 ist ein Transmembranprotein, dass  $\text{Fe}^{2+}$  über einen protonengekoppelten, energie- und pH-abhängigen Prozess in die Zelle transportiert und sowohl in der Plasmamembran verschiedener Zelltypen als auch, wie bereits erwähnt, in Endosomen und Lysosomen lokalisiert ist [Rolfs & Hediger, 2001]. Besonders Zellen des Immunsystems verfügen über alternative Wege der Eisenaufnahme, wie die rezeptorvermittelte Aufnahme von eisenhaltigen Proteinen (Laktoferrin) oder die Aufnahme von Hämoglobin bzw. Phagozytose von Erythrozyten [Weiss, 2002].

Die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse könnten daraufhin deuten, dass InsP und insbesondere hochphosphorylierte InsP eine Funktion im zellulären Eisenstoffwechsel haben. Offenbar sind verschiedene InsP mit Ferritin assoziiert, wobei sich überwiegend D-Ins(1,3,4,5,6) $\text{P}_5$  und InsP<sub>6</sub> aus HoloFerritin extrahieren ließen. Eine aufgrund des hohen Eisengehalts ausschließlich unspezifische Absorption der InsP an HoloFerritin kann weitgehend ausgeschlossen werden, da sich auch aus nahezu eisenfreiem Apoferritin kleinere Mengen InsP extrahieren ließen. Dies legt nahe, dass die InsP möglicherweise wie die beschriebenen Phosphat-Ionen eine Funktion bei der Maskierung von positiven Ladungen an der Ferritin-Oberfläche haben und so koordinativ auf die Bildung des Eisenkerns wirken (Abb. 4.5-4 A).

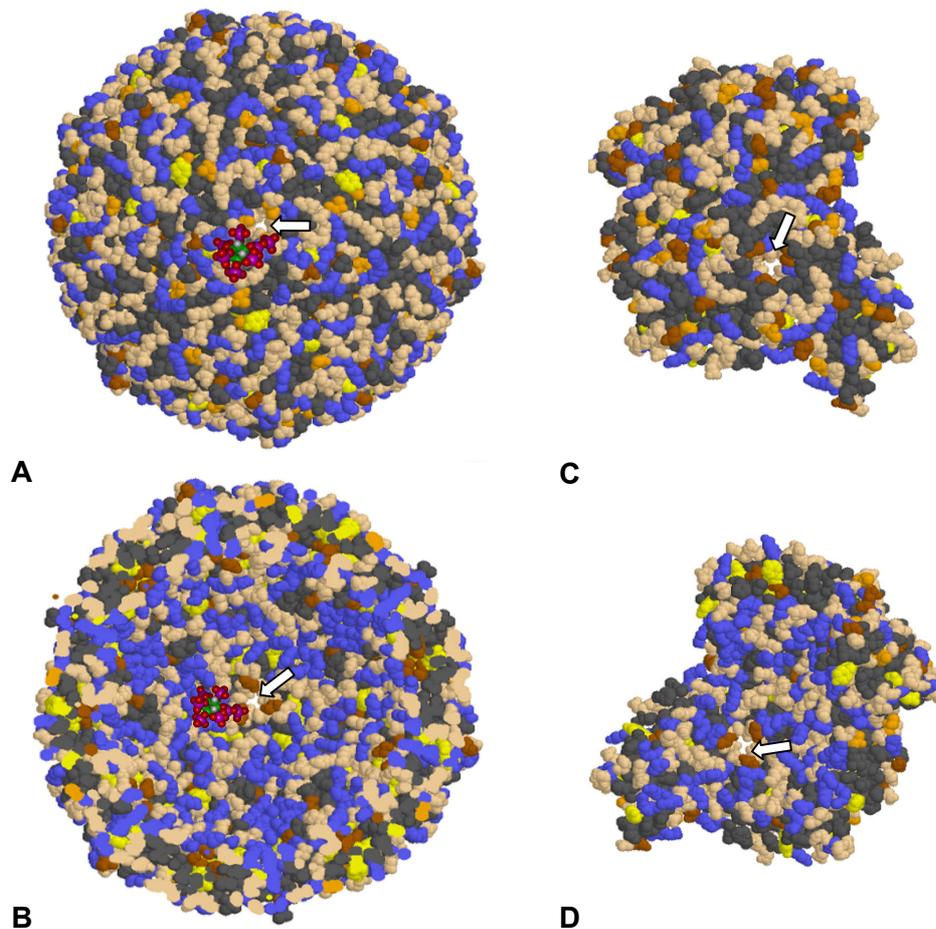


**Abb. 4.5-4: Modell zur Bindung von hochphosphorylierten InsP an Ferritin. A:** Theoretische Positionierung von InsP am Ferritin. InsP könnten an der Innenseite der Ferritin-Kugel lokalisiert sein und dort eine Funktion bei Positionierung des Fe<sup>3+</sup> bei der Nukleation und Ausbildung des Fe(III)oxo-Hydroxid-Moleküls haben oder aber an der Außenseite der Ferritin-Kugel Fe<sup>2+</sup> über Ligandenaustausch oder Diffusion in der Nähe der 3zähligen Kanäle abgeben. **B:** Die Bindung der InsP an Ferritin könnte über monomere Untereinheiten erfolgen, die später zur Ferritin-Kugel assoziieren. Andererseits könnten InsP über erweiterte Poren im Ferritin in das Kugellinnere gelangen und dort an das Protein kovalent oder extrem stark komplexiert binden. Phosphatgruppen der InsP sind vereinfacht als (P) dargestellt. R bezeichnet einen Aminosäurerest.

Die InsP wären aufgrund ihrer Größe (InsP<sub>6</sub>: etwa 1 nm) eventuell in der Lage, direkt durch die Ferritin-Poren in das Kugellinnere zu gelangen. Allerdings muss noch die Hydrathülle des Moleküls berücksichtigt werden, so dass dieses real eher 1,5-2 nm groß ist und ein Transport durch die Kanalporen damit fraglich ist. Andererseits wäre es auch denkbar, dass die InsP an Ferritin-Monomere binden und erst nach deren Assoziation zur Ferritin-Kugel in deren Innenraum eingeschlossen werden (Abb. 4.5-4 B).

Die Bindung könnte in diesem Fall sehr fest aufgrund von ionischen Wechselwirkungen zwischen basischen Aminosäuren und den stark negativ geladenen InsP erfolgen. Es wäre auch denkbar, dass eine kovalente Bindung existiert, die nicht enzymatisch und autokatalytisch entsteht. Solche autokatalytischen Reaktionen treten z.B. bei der Chromophorbildung des GFP-Proteins zwischen As auf [Reid & Flynn, 1997]. Die molekulare Darstellung der As-Reste in Apoferritin zeigt, dass sich sowohl auf der Außenseite als auch im Inneren des Proteinkomplexes in unmittelbarer Nachbarschaft der 3zähligen Eisen-Transport-Kanäle sowohl Serine als auch Threonine sowie basische Reste befinden, die für eine putative Phytylierung prädestiniert sind bzw. die eine Bindung der InsP in diesem Bereich begünstigen würden (Abb. 4.5-5). Anhand eines auf das Apoferritin-Molekül aus Ochsenfrosch raufmodellierten Kalottenmodells eines PP-InsP<sub>5</sub>-Moleküls (Abb. 4.5-5 A und B) wird deutlich, dass PP-InsP<sub>5</sub> und auch InsP<sub>6</sub> aufgrund ihrer Molekülgröße tatsächlich in der Lage wären, hydrophobe As-Reste zu maskieren, die eine Eisen-Nukleation oder einen Eisen-Transport durch die Kanäle behindern könnten. Ein *in vitro*-Nachweis solch einer Bindung ließe sich möglicherweise über

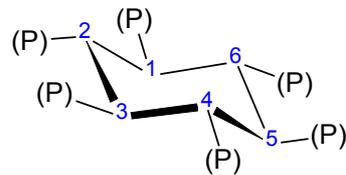
eine Veränderung der Aminosäureintegrität, die bei einer kovalenten Modifikation auftreten würde, durch eine Chromatographie der As ermitteln.



**Abb. 4.5-5: Molekulare Darstellung von putativen funktionellen Aminosäureresten in Apoferritin im Bereich der 3zähligen Kanäle.** Apoferritin aus Ochsenfrosch (*Rana catesbeiana*) in Außen- (A) und Innenansicht (B). Das Molekül besitzt einen Radius von etwa 80 Å. Zum Größenvergleich wurde das Kalottenmodell eines PP-InsP<sub>5</sub>-Moleküls (CPK-Farben) auf den Proteinkomplex modelliert. C zeigt die Außen- und D die Innenansicht eines Fragments aus Milz-Apoferritin aus Pferd (*Equus caballus*). Blau: basische As; grau: hydrophobe As; braun: Serin; orange: Threonin; gelb: Tyrosin. Die weißen Pfeile weisen auf die Kanalporen (A und B: verändert nach Ha *et al.*, 1999; C und D: verändert nach Granier *et al.*, 2001)

Eine weitergehende Möglichkeit für die Funktion von hochphosphorylierten InsP im Eisenstoffwechsel könnte in einer Funktion als zelluläre Eisentransportmoleküle liegen. Diese Transportliganden sind, wie oben beschrieben, bisher unbekannt. Es gibt Hinweise, dass Mono- und Dinukleotide zytosolisches Eisen binden. Die Bindung des Eisens erfolgt dabei höchstwahrscheinlich über die negativ geladene(n) Phosphatgruppe(n) [Pollack *et al.*, 1985 und Weaver & Pollack, 1989]. Speziell für *myo*-InsP<sub>6</sub>, D-Ins(1,2,3,4,6)P<sub>5</sub> und D-(Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub>/D-Ins(Ins(1,2,3,5,6)P<sub>5</sub> konnten bereits ausgezeichnete Fe<sup>3+</sup>-Chelatoreigenschaften beobachtet werden, während *scyllo*-InsP<sub>6</sub> (Abb. 4.5-6) und D-Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> sowie D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub>/D-Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub> deutlich weniger potente Chela-

toren waren [Hawkins *et al.*, 1993]. Vermutlich sind die D-1'-, D-2'- und D-3'-Phosphatgruppen (äquatorial-axial-äquatorial) ausschlaggebend für die Chelatorwirkung.



**Abb. 4.5-6: Molekülstruktur von *scyllo*-InsP<sub>6</sub>.** Die Kohlenstoffatome sind nach D-Nomenklatur durchnummeriert. Phosphatgruppen sind vereinfacht als (P) dargestellt.

Dieselbe Studie zeigt, dass durch Zusatz von *myo*-InsP<sub>6</sub> in einem Xanthin-Oxidase/Hypoxanthin-Reaktionsansatz die Eisen-katalysierte Hydroxylradikalbildung vollständig inhibiert werden konnte. Verschiedene Hydroxylradikale können in Zellen z.B. durch Peroxidation von Lipiden und Aminosäuren Schäden hervorrufen. Hydroxylradikale entstehen in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) häufig über metallkatalysierte Reaktionen wie die Fenton- oder die Haber-Weiss-Reaktion. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wird durch verschiedene zelluläre Enzyme, wie z.B. die Xanthin-Oxidase oder die Superoxid-Dismutase produziert [Elstner, 1990: S.19-27]. InsP<sub>6</sub>, das in tierischen Zellen in hohen Konzentrationen von 10-60 µM vorliegt [Irvine & Schell, 2001], wäre damit ein ausreichend vorhandenes und sicheres zelluläres Transportmolekül für Eisen. Die Bindung der Eisen-Transport-InsP könnte dann an der Außenseite des Ferritin-Moleküls erfolgen, wo sie Fe<sup>2+</sup> entweder durch einen Ligandenaustausch oder aber über einen Diffusionsgradienten in Richtung der 3zähligen Kanäle abgeben könnten (Abb. 4.5-4 A). Der Nachweis solch einer Bindung von Eisen an InsP *in vivo* dürfte allerdings schwierig sein. Bei einer chromatographischen Extraktion von InsP aus Zellhomogenaten würden diese wahrscheinlich aufgrund ihrer hohen negativen Ladung verschiedene Kationen binden. Fluoreszierende InsP, die bei Kationen-Bindung ihr Emmissionsspektrum ändern, sind bisher nicht verfügbar. Vorstellbar wäre lediglich eine Annäherung an die Identität der zytosolischen Eisen-Liganden über *in vitro*-Vergleiche von Bindungsaffinitäten bekannter Eisenchelatoren mit denen potentieller *in vivo*-Liganden wie InsP<sub>6</sub>.

### 5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die prokaryotisch exprimierte humane Inositolhexakisphosphat-Kinase 2 (IP6K-2) eingehend molekular charakterisiert. Das rekombinante gereinigte Enzym zeigte eine gute enzymatische Aktivität, eine hochaffine Bindung an  $\text{InsP}_6$  sowie eine mit Literaturdaten vergleichbare Bindung an ATP. Anhand von Substrat-Produkt-Analysen, bei denen verschiedene Inositolphosphate ( $\text{InsP}_3$ -,  $\text{InsP}_4$ - und  $\text{InsP}_5$ -Isomere) eingesetzt wurden, konnte eine spezifische Substraterkennung für eine ganze Reihe hochphosphorylierter Inositolphosphate ( $\text{InsP}_4$  und höher) und nicht nur  $\text{InsP}_6$  durch das Enzym ermittelt werden. Dabei wurde ein Muster entwickelt, durch das Pyrophosphorylierungsstellen verschiedener  $\text{InsP}_5$ -Isomere vorhergesagt werden können. Aufgrund der gefundenen, putativen Substrate der IP6K-2 war es möglich, einen alternativer Syntheseweg zum  $\text{InsP}_6$  zu zeigen.

In dieser Arbeit durchgeführten Inhibitorstudien zeigten, dass die IP6K-2 in Folge ihrer Hemmstoffsensitivität ein potentiell zelluläres Ziel für verschiedene polyphenolische Substanzen ist. Es erwiesen sich solche Substanzen als gute IP6K-2-Inhibitoren, die aufgrund von Säuregruppen über eine hohe negative Ladung verfügen und eine sterisch anspruchsvolle „zweihändige“ Molekülstruktur besitzen ((-)-Epicatechin-3-gallat und Aurintricarbonsäure). Dabei wies die IP6K-2 ein eigenes spezifisches Hemmstoffprofil im Vergleich zu anderen Inositolphosphat-Kinasen der PDKG-Familie auf, wodurch eine selektive Inhibierung einzelner Inositolphosphat-Kinasen *in vivo* möglich wäre.

Lokalisationsstudien mit einem EGFP-IP6K-2-Fusionsprotein in verschiedenen Zelllinien ließen eine spezifische Verteilung des Proteins auf putativ transkriptionell aktive Bereiche im Zellkern erkennen, wobei dies durch Nachweis endogener IP6K belegt werden konnte. Im Kontext mit Literaturdaten gesehen, erscheint die IP6K als interessantes und empfindliches Ziel bei der Regulation von Zellteilung, Zellwachstum und Proliferation.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit konnte eine mögliche neue zelluläre Funktion von hochphosphorylierten  $\text{InsP}$  demonstriert werden. Es wurde gezeigt, dass ein  $\text{InsP}_6$ /PP- $\text{InsP}_5$ -Gemisch spezifisch an Ferritin bindet. Umgekehrt konnten verschiedene, wahrscheinlich kovalent gebundene, hochphosphorylierte Inositolphosphate aus HoloFerritin extrahiert werden. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass  $\text{InsP}_6$  und/oder PP- $\text{InsP}_5$  eine Funktion im zellulären Eisenhaushalt innehaben. Diese könnte sowohl im zellulären zytosolischen Eisentransport als auch in einer posttranslationalen Modifikation des Ferritins liegen, wobei letztere die Eisenaufnahme durch Ferritin bzw. die Eisennukleation beeinflussen könnte.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abel, K., Anderson, R.A., & Shears, S.B. (2001) Phosphatidylinositol and inositol phosphate metabolism. *J Cell Sci* 114, 2207-2208
- Agostinis, P., Vandenbogaerde, A., Donella-Deana, A., Pinna, L.A., Lee, K.T., Goris, J., Merlevede, W., Vandenheede, J.R. & de Witte, P. (1995) Photosensitized inhibition of growth factor-regulated protein kinases by hypericin. *Biochem Pharmacol* 49 (11), 1615-1622
- Agostinis, P., Vantieghem, A., Merlevede, W. & de Witte, P.A. (2002) Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *Int J Biochem Cell Biol* 34 (3), 221-241
- Agranoff, B.W. (1978) Cyclitol confusion. *Trends Biochem Sci* 3, N283-N285
- Albert, C., Safrany, S.T., Bembenek, M.E., Reddy, K.M., Reddy, K.K., Falck, J.R., Bröcker, M., Shears, S.B. & Mayr, G.W. (1997) Biological variability in the structures of diphosphoinositol polyphosphates in *Dyctyostelium discoideum* and mammalian cells. *Biochem J* 327, 553-560
- Barker, J.C. & Bergren, P.-O. (1999) Inositol hexakisphosphate and  $\beta$ -cell stimulus-secretion coupling. *Anticancer Res* 19, 3737-3742
- Barker, C.J., Wright, J., Hughes, P.J., Kirk, C.J. & Michell, R.H. (2004) Complex changes in cellular inositol phosphate complement accompany transit through the cell cycle. *Biochem J* 380, 465-473
- Barker, C.J., Wright, J., Kirk, C.J. & Michell, R.H. (1995) Inositol 1,2,3-trisphosphate is a product of InsP<sub>6</sub> dephosphorylation in WRK-1 rat mammary epithelial cells and exhibits transient concentration changes during the cell cycle. *Biochem Soc Trans.* 23 (2), 169S
- Barnés, C.M., Theil, E.C. & Raymond, K.N. (2002) Iron uptake in ferritin is blocked by binding of [Cr(TREN)(H<sub>2</sub>O)(OH)]<sup>2+</sup>, a slow dissociation model for [Fe(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]<sup>2+</sup>. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (8), 5195-5200
- Benchokroun, Y., Couprie, J. & Larsen, A.K. (1995) Aurintricarboxylic acid, a putative inhibitor of apoptosis, is a potent inhibitor of DNA topoisomerase II *in vitro* and in Chinese hamster fibrosarcoma cells. *Biochem Pharmacol* 49 (3), 305-313
- Benezra, M., Ben-Sasson, S.A., Regan, J., Chang, M., Bar-Shavit, R. & Vlodaysky, I. (1994) Antiproliferative activity to vascular smooth muscle cells and receptor binding of heparin-mimicking polyaromatic anionic compounds. *Arterioscler Thromb* 14 (12), 1992-1999
- Berridge, M.J., Lipp, P. & Bootman (2000) The versatility and the universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 11-21
- Bertsch, U., Deschermeier, C., Fanick, W., Girkontaite, I., Hillemeier, K., Johnen, H., Weglöhner, W., Emmrich, W. & Mayr, G.W. (2000) The second messenger binding site of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase is centered in the catalytic domain and related to the inositol trisphosphate receptor site. *J Biol Chem* 275 (3), 1557-1564
- Bertsch, U., Haefs, M., Möller, M., Deschermeier, C., Fanick, W., Kitzerow, A., Ozaki, S., Meyer, H.E. & Mayr, G.W. (1999) A novel A-isoform-like inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase from chicken erythrocytes exhibits alternative splicing and conservation of intron positions between vertebrates and invertebrates. *Gene* 223, 61-71
- Bird, G.S., & Putney, J.W., Jr. (1996) Effect of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate on inositol trisphosphate-activated Ca<sup>2+</sup> signaling in mouse lacrimal acinar cells. *J Biol Chem* 271, 6766-6770
- Bork, P.M., Bacher, S., Schmitz, M.L., Kaspers, U. & Heinrich, M. (1999) Hypericin as a non-antioxidant inhibitor of NF-kappa B. *Planta Med* 65 (4), 297-300
- Brehm, M.A., Schreiber, I., Bertsch, U., Wegner, A. & Mayr, G.W. (2004) Identification of the actin-binding domain of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-kinase isoform B (IP3K-B). *Biochem J* 382, 353-362
- Bushunow, P., Reidenberg, M.M., Wasenko, J., Winfield, J., Lorenzo, B., Lemke, S., Himpler, B., Corona, R. & Coyle, T. (1999) Gossypol treatment of recurrent adult malignant gliomas. *J Neurooncol* 43, 79-86

- Byrum, J., Jordan, S., Safrany, S.T. & Rodgers, W. (2004) Visualization of inositol phosphate-dependent mobility of Ku: depletion of the DNA-PK cofactor InsP<sub>6</sub> inhibits Ku mobility. *Nucleic Acids Res* 32 (9), 2776-2784
- Catchpoole, D.R. & Stewart, B.W. (1994) Inhibition of topoisomerase II by aurintricarboxylic acid: implications for mechanisms of apoptosis. *Anticancer Res* 14 (3a), 853-856
- Chang, S.-C., Miller, A.L., Feng, Y., Wentz, S.R. & Majerus, P.W. (2002) The human homologue of the rat inositol phosphate multikinase is an inositol 1,3,4,6-tetrakisphosphate 5-kinase. *J Biol Chem* 277 (46), 43836-43843
- Choi, K.Y., Kim, H.K., Lee, S.Y., Moon, K.H., Sim, S.S., Kim, J.W., Chung, H.K., & Rhee, S.G. (1990) Molecular cloning and expression of a complementary DNA for inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase. *Science* 248, 64-66
- Chung, F.L., Schwartz, J., Herzog, C.R. & Yang, Y.M.. (2003) Tea and cancer prevention: studies in animals and humans. *J Nutr* 133 (10), 3268S-3274S
- Communi, D., Dewaste, V. & Erneux, C. (1999) Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C-mediated phosphorylation and activation of D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B in astrocytes. *J Biol Chem* 274 (21), 14734-14742
- Communi, D., Vanweyenberg, V., & Erneux, C. (1997) D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase A is activated by receptor activation through a calcium:calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation mechanism. *EMBO J* 16 (8), 1943-1952
- Connolly, T.M., Bansal, V.S., Bross, T.E., Irvine, R.F. & Majerus, P.W. (1987) The metabolism of tris- and tetraphosphates of inositol by 5-phosphomonoesterases and 3-kinase enzymes. *J Biol Chem* 262, 2146-2149
- Coutinho, E.M. (2002) Gossypol: a contraceptive for men. *Contraception* 65 (4), 259-263
- Crichton, R.R. (1991) *Inorganic biochemistry of iron metabolism*, 1. Aufl. Ellis Horwood Ltd., Chichester
- Cullen, P.J., Hsuan, J.J., Truong, O., Letcher, A.J., Jackson, T.R., Dawson, A.P. & Irvine, R.F. (1995) Identification of a specific Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>-binding protein as a member of the GAP1 family. *Nature* 376, 527-530
- Cullen, P.J., Irvine, R.F. & Dawson, A.P. (1990) Synergistic control of Ca<sup>2+</sup> mobilization in permeabilized mouse L1210 lymphoma cells by inositol 2,4,5-trisphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate. *Biochem J* 271(2), 549-553
- Cullen, P.J. & Lockyer, P.J. (2002) Integration of calcium and Ras signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 339-348
- de Witte, P., Agostinis, P., Van Lint, J., Merlevede, W. & Vandenheede, J.R. (1993) Inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity by hypericin. *Biochem Pharmacol* 46 (11), 1929-1936
- Deng, X., Ruvolo, P., Carr, B. & May, W.S.Jr. (2000) Survival function of ERK1/2 as IL-3-activated, staurosporine-resistant Bcl2 kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (4) 1578-1583
- Deschermeier, Christina (2002) *Molekulare Erkennung von Inositolphosphaten durch ihre Rezeptorproteine – Untersuchung von Struktur-Funktions-Beziehungen am Beispiel der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase*. Dissertation
- Deschner, E.E., Ruperto, J., Wong, G. & Newmark, H.L. (1991) Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis* 12 (7), 1193-1196
- Dewaste, V., Moreau, C., De Smedt, F., Bex, F., De Smedt, H., Wuytack, F., Missiaen, L. & Erneux, C. (2003) The three isoenzymes of human inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase show specific intracellular localization but comparable Ca<sup>2+</sup> responses upon transfection in COS-7 cells. *Biochem J* 374, 41-49
- Dewaste, V., Pouillon, V., Moreau, C., Shears, S., Takazawa, K. & Erneux, C. (2000) Cloning and expression of a cDNA encoding human inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C. *Biochem J* 352, 343-351

- Dewaste, V., Roymans, D., Moreau, C. & Erneux, C. (2002) Cloning and expression of full-length cDNA encoding human 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B. *Biochem Biophys Res Commun* 291, 400-405
- D'Santos, C.S., Communi, D., Ludgate, M., Vanweyenberg, V., Takazawa, K. & Erneux, C. (1994) Identification of high molecular weight forms of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase in rat thymus and human lymphocytes. *Cell Signal* 6 (3), 335-344
- Eggleton, P. (1999) Effect of IP<sub>6</sub> on human neutrophil cytokine production and cell morphology. *Anticancer Res* 19, 3711-3716
- El Alami, M., Messenguy, F., Scherens, B. & Dubois, E. (2003) Arg82p is a bifunctional protein whose inositol polyphosphate kinase activity is essential for nitrogen and PHO gene expression but not for Mcm1p chaperoning in yeast. *Mol Microbiol* 49(2), 457-468
- Elstner, E.F. (1990) *Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin*. BI-Wissenschaftlicher Verlag, Mannheim, Wien, Zürich
- Fahnert, B. (2004) Folding-promoting agents in recombinant protein production. *Methods Mol Biol* 267, 53-74
- Fernandez, J.M., Bilgin, M.D. & Grossweiner, L.I. (1997) Singlet oxygen generation by photodynamic agents. *J Photochem Photobiol B37*, 131 - 140
- Ferry, S., Matsuda, M., Yoshida, H. & Hirata, M. (2002) Inositol hexakisphosphate blocks tumor cell growth by activating apoptotic machinery as well as by inhibiting the Akt/NFkappaB-mediated cell survival pathway. *Carcinogenesis* 23 (12), 2031-2041
- Flack, M.R., Pyle, R.G., Mullen, N.M., Lorenzo, B., Wu, Y.W., Knazek, R.A., Nisula, B.C. & Reidenberg, M.M. (1993) Oral gossypol in the treatment of metastatic adrenal cancer. *J. Clin. Endocrinol Metabol* 76, 1019 - 1024
- Freifelder, D. (1982) *Physical Biochemistry*, 2. Aufl. W.H. Freeman and Company, San Francisco
- Frew, T., Powis, G., Berggren, M., Abraham, R.T., Ashendel, C.L., Zalkow, L.H., Hudson, C., Qazia, S., Gruszecka-Kowalik, E. & Merriman, R. (1994) A multiwell assay for inhibitors of phosphatidylinositol-3-kinase and the identification of natural product inhibitors. *Anticancer Res* 14, 2425-2428
- Gaidarov, I., Krupnick, J.G., Falck, J.R., Benovic, J.L. & Keen, J.H. (1999) Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding. *EMBO J* 18 (4), 871-881
- Gonzales, B., Schell, M.J., Letcher, A.J., Veprintsev, D.B., Irvine, R.F. & Williams, R.I. (2004) Structure of a human inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase: substrate binding reveals why it is not a phosphoinositid 3-kinase. *Mol Cell* 15, 689-701
- Graf, E. & Empson, K. (1987) Phytic acid-a natural antioxidant. *J Biol Chem* 262 (24), 11647-11650
- Graf, E., Mahoney, J.R., Bryant, R.G. & Eaton, J.W. (1984) Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. *J Biol Chem* 259 (6), 3620-3624
- Granier, T., Gallois, B., Langlois d'Estaintot, B., Dautant, A., Chevalier, J.M., Mellado, J.M., Beaumont, C., Santambrogio, P., Arosio, P. & Precigoux, G. (2001) Structure of mouse L-chain ferritin at 1.6 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57, 1491-1497
- Grimley, P.M., Fang, H., Rui, H., Petricoin, E.F. 3rd, Ray, S., Dong, F., Fields, K.H., Hu, R., Zoon, K.C., Audet, S. & Beeler, J. (1998) Prolonged STAT1 activation related to the growth arrest of malignant lymphoma cells by interferon-alpha. *Blood* 91 (89), 3017-3027
- Gu, Z.P., Mao, B.Y., Wang, Y.X., Zhang, R.A., Tan, Y.Z., Chen, Z.X., Cao, L., You, G.D. & Segal, S.J. (2000) Low dose gossypol for male contraception. *Asian J Androl* 2 (4), 283-287
- Gundelfinger, E.D., Kessels, M.M. & Qualmann, B. (2003) Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 127-139
- Guse, A.H. & Emrich, F. (1991) T-cell receptor-mediated metabolism of inositol polyphosphates in Jurkat T-lymphocytes. *J Biol Chem* 266 (36), 24498-24502
- Guse, A.H., Goldwisch, A., Weber, K. & Mayr, G.W. (1995) Non-radioactive, isomer-specific inositol phosphate mass determinations: high-performance liquid chromatography-micro-metal-dye

- detection strongly improves speed and sensitivity of analyses from cells and micro-enzyme assays. *J Chromatogr B* 672, 189-198
- Guse, A.H. (2004) Regulation of calcium signaling by the second messenger cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR). *Curr Mol Med* 4 (3), 239-248
- Gutfreund, H. (1971) *Enzymes: Physical Principles* Wiley & Sons Ltd., London
- Ha, Y., Shi, D., Small, G.W., Theil, E.C. & Allewell, N.M. (1999) Crystal structure of bullfrog M ferritin at 2.8 Å resolution: analysis of subunit interactions and the binuclear metal center. *J Biol Inorg Chem* 4 (3), 243-256
- Haimsohn, M., Beery, R., Karasik, A., Kanety, H. & Geier, A. (2002) Aurintricarboxylic acid induces a distinct activation of the IGF-I receptor signaling within MDA-231 cells. *Endocrinology* 143 (3), 837-845
- Hallick, R.B., Chelm, B.K., Gray, P.W., & Orozco, E.M. jr. (1977) Use of aurintricarboxylic acid as an inhibitor of nucleases during nucleic acid isolation. *Nucleic Acids Res* 4 (9), 3055-3064
- Hamilton, H.B., Hinton, D.R., Law, R.E., Gopalakrishna, R., Su, Y.Z., Chen, Z.H., Weiss, M.H., Couldwell, W.T. (1996) Inhibition of cellular growth and induction of apoptosis in pituitary adenoma cell lines by the protein kinase C inhibitor hypericin: potential therapeutic application. *J Neurosurg* 85 (2), 329-334
- Hanakahi, L.A. & West, S. (2002) Specific interaction of IP<sub>6</sub> with human Ku70/80, the DNA-binding subunit of DNA-PK. *EMBO J* 21 (8), 2038-2044
- Harris, M.S., Sakamoto, T., Kimura, H., He, S. Spee, C., Gopalakrishna, R., Gundimeda, U., Yoo, J.S., Hinton, D.R. & Ryan, S.J. (1996) Hypericin inhibits cell growth and induces apoptosis in retinal pigment epithelial cells: possible involvement of protein kinase C. *Curr Eye Res* 15 (3), 255-262
- Haverland, Sven (2001) *Neue Ergebnisse zum Inositolphosphatstoffwechsel*. Dissertation
- Hawkins, P.T., Poyner, D.R., Jackson, T.R., Letcher, A.J., Lander, D.A. & Irvine, R.F. (1993) Inhibition of iron-catalysed hydroxyl radical formation by inositol polyphosphates: a possible physiological function for myo-inositol hexakisphosphate. *Biochem J* 294, 929-934
- Henning, W. (1995) *Genetik*, 1. Aufl. Springer Verlag, Berlin
- Hermosura, M.C., Takeuchi, H., Fleig, A., Riley, A.M., Potter, B.V., Hirata, M. & Penner, R. (2000) InsP<sub>4</sub> facilitates store-operated calcium influx by inhibition of InsP<sub>3</sub> 5-phosphatase. *Nature* 408, 735-740
- Hillemeier, Kirsten (2001) *Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase: Identifizierung und zelluläre Effekte pflanzlicher Hemmstoffe sowie Erstellung eines Substratselektivitätsprofils*. Dissertation
- Hilton, J.M., Plomann, M., Ritter, B., Modregger, J., Freeman, H.N., Falck, J.R., Krishna, U.M. & Tobin, A.B. (2001) Phosphorylation of a synaptic vesicle associated protein by inositol hexakisphosphat-regulated protein kinase. *J Biol Chem* 276 (19), 16341-16347
- Ho, M.W., Kaetzel, M.A., Armstrong, D.L. & Shears, S.B. (2001) Regulation of a human chloride channel. A paradigm for integrating input from calcium, type II calmodulin-dependent protein kinase, and inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate. *J Biol Chem* 276 (22), 18673-18680
- Hou, D.X., Uto, T., Tng, X., Takeshita, T., Tanigawa, S., Imamura, I., Ose, T. & Fujii, M. (2004) Involvement of reactive oxygen-species-independent mitochondrial pathway in gossypol-induced apoptosis. *Arch Biochem Biophys* 428 (2), 179-187
- Høy, M., Berggren, P.-O. & Gromada, J. (2003) Involvement of protein kinase C-ε in inositol hexakisphosphate-induced exocytosis in mouse pancreatic β-cells. *J Biol Chem* 278 (37), 35168-35171
- Huang, C.-F., Voglmaier, S.M., Bembenek, M.E., Saiardi, A. & Snyder, S.H. (1998) Identification and purification of diphosphoinositol pentakisphosphate kinase which synthesizes the inositol pyrophosphate bis(diphospho)inositol tetrakisphosphate. *Biochemistry* 37, 14998-15004
- Hughes, A.R., Takemura, H. & Putney, J.W. jr. (1988) Kinetics of inositol 1,4,5-trisphosphate and inositol cyclic 1:2,4,5-trisphosphate metabolism in intact rat parotid acinar cells. *J Biol Chem* 263 (21), 10314-10319

- Igaue, I., Miyauchi, S., & Saito, K.; Hrsg. A. Fujiwara (1982) Formation of myo-inositol phosphates in a rice cell suspension culture. Proceedings of the 5th International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. Maruzen, Tokyo
- Irvine, R.F. & Schell, M.J. (2001) Back in the water: the return of the inositol phosphates. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 327-338
- Ismailov, I.I., Fuller, C.M., Berdiev, B.K., Shlyonsky, V.G., Benos, D.J. & Barrett, K.E. (1996) A biologic function for an "orphan" messenger: D-myo-inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate selectively blocks epithelial calcium-activated chloride channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (19), 10505-10509
- Ives, E.B., Nichols, J., Wenthe, S.R. & York, J.D. (2000) Biochemical and functional characterization of inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase. *J Biol Chem* 274 (47), 36575-36583
- Izzard, R.A., Jackson, S.P. & Smith, C.M. (1999) Competitive and noncompetitive inhibition of the DNA-dependent protein kinase. *Cancer Res* 59, 2581-2586
- Jänig, G.-R., Ruckpaul, K. & Jung, F. (1971) Interaction of haemoglobin with ions binding of inositol hexaphosphate to human haemoglobin A. *FEBS Lett* 17 (2), 173-176
- Jenkinson, S., Challiss, R.A. & Nahorski, S.R. (1992) Evidence for lithium-sensitive inositol 4,5-bisphosphate accumulation in muscarinic cholinceptor-stimulated cerebral-cortex slices. *Biochem J* 287, 437-442
- Kang, T.B. & Liang, N.C. (1997) Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukemia cells. *Biochem Pharmacol* 54 (9), 1013-1018
- Kavutcu, M. & Melzig, M.F. (1999) *In vitro* effects of selected flavonoids on the 5'-nucleotidase activity. *Die Pharmazie* 54 (6), 457-459
- Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K. & Yao, M. (1999) Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. *Biosci Biotechnol Biochem* 63 (5), 896-899
- Kovacic, P. (2003) Mechanism of drug and toxic actions of gossypol: focus on reactive oxygen species and electron transfer. *Curr Med Chem* 10 (24), 2711-2718
- Krauss, G. (2003) Biochemistry of signal transduction and regulation. 3. Aufl. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lamond, A.I. & Spector, D.L. (2003) Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 605-612
- Laussmann, T., Pikzack, C., Thiel, U., Mayr, G.W. & Vogel, G. (2000) Diphospho-myo-inositol phosphates during the life cycle of *Dictyostelium* and *Polysphondylium*. *Eur J Biochem* 267, 2447-2451
- Lemtiri-Chlieh, F., MacRobbie, E.A.C. & Brearley, C.A. (2000) Inositol hexakisphosphate is a physiological signal regulating the K<sup>+</sup>-inward rectifying conductance in guard cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (15), 8687-8692
- Lindner, Karsten (2000) Diphosphoinositolphosphate: Charakterisierung der Biosynthesenzyme und ihrer Rolle *in vivo*. Diplomarbeit
- Llinas, R., Sugimori, M., Lang, E.J., Morita, M., Fukuda, M., Niinobe, M. & Mikoshiba, K. (1994) The inositol high-polyphosphate series blocks synaptic transmission by preventing vesicular fusion: a squid giant synapse study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (26), 12990-12993
- Loferer, H., Wunderlich, M., Hennecke, H. & Glockshuber, R. (1995) A bacterial thioredoxin-like protein that is exposed to the periplasm has redox properties comparable with those of cytoplasmic thioredoxins. *J Biol Chem* 270 (44), 26178-26183
- Lu, Y.-J., He, Y. & Sui, S.-F. (2002) Inositol hexakisphosphate (InsP<sub>6</sub>) can weaken the Ca<sup>2+</sup>-dependent membrane binding of C2AB domain of synaptotagmin I. *FEBS Lett* 527, 22-26
- Luckhoff, A. & Clapham, D.E. (1992) Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates an endothelial Ca<sup>2+</sup>-permeable channel. *Nature* 355, 356-358

- Luo, H.R., Saiardi, A., Nagata, E., Ye, K., Yu, H., Jung, T.S., *et al.* (2001) GRAB: a physiologic guanine nucleotide exchange factor Rab3a, which interacts with inositol hexakisphosphate kinase. *Neuron* 31, 439-451
- Luo, H.R., Saiardi, A., Yu, H., Nagata, E., Ye, K. & Snyder, S.H. (2002) Inositol pyrophosphates are required for DNA hyperrecombination in protein kinase C1 mutant yeast. *Biochemistry* 41, 2509-2515
- Lynch, B.J., Muqit, M.M., Walker, T.R. & Chilvers, E.R. (1997) [<sup>3</sup>H]inositol polyphosphate metabolism in muscarinic cholinergic-stimulated airways smooth muscle: accumulation of [<sup>3</sup>H]inositol 4,5 bisphosphate via a lithium-sensitive inositol polyphosphate 1-phosphatase. *J Pharmacol Exp Ther* 280 (2), 974-982
- Ma, Y. & Lieber, M. (2002) Binding of inositol hexakisphosphate (IP<sub>6</sub>) to Ku but not to DNA-PKcs. *J Biol Chem* 277 (13), 10756-10759
- Majerus, P.W., Kisseleva, M.V. & Norris, F.A. (1999) The role of phosphatases in inositol signaling reactions. *J Biol Chem* 274 (16), 10669-10672
- Marchisio, M., Grimley, P.M., Di Baldassarre, A., Santavenere, E. & Miscia, S. (2004) Novel shift of Jak/Stat signalling characterizes the protective effect of aurintricarboxylic acid (ATA) from tumor necrosis factor- $\alpha$  toxicity in human B lymphocytes. *Int J Immunopathol Pharmacol* 17 (1), 5-14
- Massover, W.H. (1993) Ultrastructure of ferritin and apoferritin: a review. *Micron* 24 (4) 389-437
- Matter, W.F., Brown, R.F. & Vlahos, C.J. (1992) The inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase by quercetin and analogs. *Biochem Biophys Res Commun* 186 (2), 624-631
- Mayr, G.W.; Hrsg. Irvine, R.F. (1990) Mass determination of inositol phosphates by high-performance liquid chromatography with postcolumn complexometry (metal-dye-detection). *Methods in Inositide Research*, Raven Press, New York
- Mayr, G.W., Radenberg, T., Thiel, U., Vogel, G. & Stephens, L.R. (1992) Phosphoinositol diphosphates: non-enzymic formation *in vitro* and occurrence *in vivo* in the cellular slime mold *Dictyostelium*. *Carbohydr Res* 234, 247-262
- Mayr, G.W., Windhorst, S. & Hillemeier, K. (2005) Antiproliferative plant and synthetic polyphenolics are specific inhibitors of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinases and inositol polyphosphate multikinase. *J Biol Chem* akzeptiertes Manuskript
- McConell, F.M., Stephens, L.R. & Shears, S.B. (1991) Multiple isomers of inositolpentakisphosphate in *Epstein-Barr-virus-transformed* (T5-1) B-lymphocytes. Identification of inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate, D-inositol 1,2,4,5,6-pentakisphosphate and L-inositol 1,2,4,5,6-pentakisphosphate. *Biochem J* 280, 323-329
- Mennini, T. & Gobbi, M. (2004) The antidepressant mechanism of *Hypericum perforatum*. *Life Sci* 75 (9), 1021-1027
- Miller, G.J. & Hurley, J.H. (2004) Crystal structure of the catalytic core of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase. *Mol Cell* 15, 703-711
- Mizutani, A., Fukuda, M., Niinobe, M. & Mikoshiba, K. (1997) Regulation of AP-2-synaptotagmin interaction by inositol high polyphosphates. *Biochem Biophys Res Commun* 240 (1) 128-131
- Molnár, J., Béládi, I., Domonkos, K., Földeák, S., Boda, K. & Veckenstedt, A. (1981) Antitumor activity of flavonoids on NK/Ly ascites tumor cells, *Neoplasma* 28, 11-18
- Morrison, H., Bauer, J.A., Hu, J., *et al.* (2002) Inositol hexakisphosphate kinase 2 sensitizes ovarian carcinoma cells to multiple cancer therapeutics. *Oncogene* 21, 1882-1889
- Morrison, H., Bauer, J.A., Kalvakolanu, D.V. & Lindner, D.J. (2001) Inositol hexakisphosphate kinase 2 mediates growth suppressive and apoptotic effects of interferon- $\beta$  in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* 276 (27), 24965-24970
- Nagata, E., Luo, H.R., Saiardi, A., Bae, B., Suzuki, N. & Snyder, S.H. (2005) Inositol hexakisphosphate kinase-2: a physiologic mediator of cell death. *J Biol Chem* 280 (2), 1634-1640
- Nair, H.K., Kesava, V.K.R., Aalinkeel, R., Mahajan, S., Chawda, R. & Schwartz, S.A. (2004) Inhibition of prostate cancer cell colony formation by the flavonoid quercetin correlates with

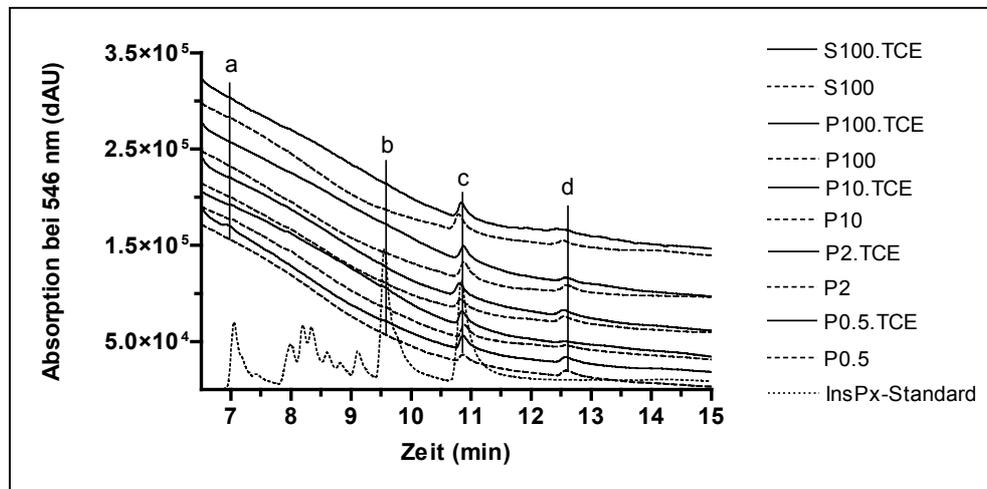
- modulation of specific regulatory genes. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11 (1), 63-69
- Nalaskowski, M.M., Bertsch, U., Fanick, W., Stockebrand, M.C., Schmale, H. & Mayr, G.W. (2003) Rat inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C is enzymatically specialized for basal cellular inositol trisphosphate phosphorylation and shuttles actively between nucleus and cytoplasm. *J Biol Chem* 278 (22), 19765-19776
- Nalaskowski, M.M., Deschermeier, C., Fanick, W. & Mayr, G.W. (2002) The human homologue of yeast ArgRIII protein is an inositol phosphate multikinase with predominantly nuclear localization. *Biochem J* 366 549-556
- Nalaskowski, M.M. & Mayr, G.W. (2004) The families of kinases removing the  $\text{Ca}^{2+}$  releasing second messenger  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ . *Curr Mol Med* 4 (3), 277-290
- Norris, A.F., Ungewickell, E. & Majerus, P.W. (1995) Inositol hexakisphosphate binds to clathrin assembly protein 3 (AP-3/Ap180) and inhibits cage assembly *in vitro*. *J Biol Chem* 270(1), 214-217
- Odom, A.R., Stahlberg, A., Wenthe, S.R. & York, J.D. (2000) A role for nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate kinase in transcriptional control. *Science* 287, 2026-2029
- Okada, N. & Koizumi, S. (1995) A neuroprotective compound, aurin tricarboxylic acid, stimulates the tyrosine phosphorylation cascade in PC12 cells. *J Biol Chem* 270 (27) 16464-16469
- Ongusaha, P.P., Hughes, P.J., Davey, J. & Michell, R.H. (1998) Inositol hexakisphosphate in *Schizosaccharomyces pombe*: synthesis from  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  and osmotic regulation. *Biochem J* 335, 671-679
- Ono, K. & Nakane, H. (1990) Mechanisms of inhibition of various cellular DNA and RNA polymerases by several flavonoids. *J Biochem (Tokyo)* 108 (4), 609-613
- Ornstein, L. (1964) Disc electrophoresis-I: Background and theory. *Ann N Y Acad Sci* 121, 321-349
- Pattni, K., Millard, T.H. & Banting, G. (2003) Calpain cleavage of the B isoform of  $\text{IP}_3$ -kinase separates the catalytic domain from the anchoring domain. *Biochem J* 375 643-651
- Peterson, C. L. (2002) Chromatin remodeling enzymes: taming the machines: Third in review series on chromatin dynamics. *EMBO rep* 3 (4), 319-322
- Petrat, F., de Groot, H., Sustmann, R. & Rauen, U. (2002) The chelatable iron pool in living cells: a methodically defined quantity. *Biol Chem* 383, 489-502
- Piccolo, E., Vignati, S., Maffucci, T., Innominato, P.F., Riley, A.M., Potter, B.V.L., Pandolfi, P.P., Brogini, M., Iacobelli, S., Innocenti, P. & Falasca, M. (2004) Inositol pentakisphosphate promotes apoptosis through the PI 3-K/Akt pathway. *Oncogene* 23 (9), 1754-1765
- Pollack, S., Campana, T. & Weaver, J. (1985) Low molecular weight iron in guinea pig reticulocytes. *Am J Hematol* 19 (1), 75-84
- Rechsteiner, M. & Rogers, S.W. (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21, 267-271
- Reid, B.G. & Flynn, G.C. (1997) Chromophore formation in green fluorescent protein. *Biochemistry* 36 (22), 6786-6791
- Renström, E., Ivarsson, R. & Shears, S.B. (2002) Inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate inhibits insulin granule acidification and fusogenic potential. *J Biol Chem* 277 (30), 26717-26720
- Rolfs, A. & Hediger, M.A. (2001) Intestinal metal ion absorption: an update. *Curr Opin Gastroenterol* 17, 177-183
- Safrany, S.T., Caffrey, J.J., Yang, X. & Shears, S.B. (1999) Diphosphoinositol polyphosphates: the final frontier for inositide research?. *Biol Chem* 380, 945-951
- Saiardi, A., Caffrey, J.J., Snyder, S.H. & Shears, S.B. (2000) The inositol hexakisphosphate kinase family. Catalytic flexibility and function in yeast vacuole biogenesis. *J Biol Chem* 275 (32), 24686-24692
- Saiardi, A., Erdjument-Bromage, H., Snowman, A.M., Tempst, P. & Snyder, S.H. (1999) Synthesis of diphosphoinositol pentakisphosphate by a newly identified family of higher inositol polyphosphate kinases. *Curr Biol* 9, 1323-1326

- Saiardi, A., Nagata, E., Luo, H.R., Sawa, A., Luo, X., Snowman, A.M. & Snyder, S.H. (2001)<sup>a</sup> Mammalian inositol polyphosphate multikinase synthesizes inositol pyrophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (5), 2306-2311
- Saiardi, A., Nagata, E., Luo, H.R., Snowman, A.M. & Snyder, S.H. (2001)<sup>b</sup> A novel inositol hexakisphosphate kinase: identification and characterization. *J Biol Chem* 276 (42), 39179-39185
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463 - 5467
- Schell, M.J., Erneux, C. & Irvine, R.F. (2001) Inositol(1,4,5)-trisphosphate 3-kinase A associates with F-actin and dendritic spines via its N-terminus. *J Biol Chem* 276 (40), 37537-37546
- Segel, I.H. (1976) *Biochemical calculations*, 2. Aufl. John Wiley & Sons, Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore
- Shears, S.B. (2000) Transcriptional regulation: a new dominion for inositol phosphate signaling? *Bioessays* 22, 786-789
- Shears, S.B. (2001) Assessing the omnipotence of inositol hexakisphosphate. *Cell Signal* 13, 151-158
- Shears, S.B. (2004) How versatile are inositol phosphate kinases? *Biochem J* 377, 265-280
- Shen, X., Xiao, H., Ranallo, R., Wu, W.-H. & Wu, C. (2003) Modulation of ATP-dependent chromatin-remodeling complexes by inositol polyphosphates. *Science* 299 112-114
- Singh, R.P., Agarwal, C. Agarwal, R. (2003) Inositol hexaphosphate inhibits growth, and induces G1 arrest and apoptotic death of prostate carcinoma DU145 cells: modulation of CDK1-CDK-cyclin and pRb-related protein-E2F complexes. *Carcinogenesis* 24 (3), 555-563
- Singhal, R.L., Yeh, Y.A., Praja, N., Olah, E., Sledge, G.W. jr. & Weber, G. (1995) Quercetin down-regulates signal transduction in human breast carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 208 (1), 425-431
- Soriano, S., Thomas, S., High, S., Griffiths, G., D'Santos, C. & Cullen, P. (1997) Membrane association, localization and topology of rat inositol 1,4,5,-trisphosphate 3-kinase B: implications for membrane traffic and Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Biochem J* 324, 579-589
- Steger, D.J., Haswell, E.S., Miller, A.L., Wenthe, S.R. & O'Shea (2003) Regulation of chromatin remodeling by inositol polyphosphates. *Science* 299, 114-116
- Stephens, L., Radenberg, T., Thiel, U., Vogel, G., Khoo, K.H., Dell, A. Jackson, T.R., Hawkins, P.T., & Mayr, G.W. (1993) The detection, purification, structural characterization, and metabolism of diphosphoinositol pentakisphosphate(s) and bisdiphosphoinositol tetrakisphosphate(s). *J Biol Chem* 268 (6), 4009-4015
- Takahashi, I., Nakanishi, S., Kobayashi, E., Nakano, H., Suzuki, K. Tamaoki, T. (1989) Hypericin and pseudohypericin specifically inhibit protein kinase C: possible relation to the antiretroviral activity. *Biochem Biophys Res Commun* 165 (3), 1207-12012
- Takahashi, T. & Kuyucak, S. (2003) Functional properties of threefold and fourfold channels in ferritin deduced electrostatic calculations. *Biophys J* 84, 2256-2263
- Takazawa, K., Perret, J., Dumont, J.E. & Erneux, C. (1991) Molecular cloning and expression of a human brain inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 174 (2), 529-535
- Umekawa, H., Takada, Y., Furuichi, Y., Takahashi, T., Achiwa, Y., Komiya, T., & Yoshida, S. (1999) Inhibition of eukaryotic DNA polymerase alpha by persimmon (*Diospyros kaki*) and related polyphenols. *Biochem Mol Biol Int* 47, 795-801
- Van Poznak, C., Seidman, A.D., Reidenberg, M.M., Moasser, M.M., Sklarin, N., Van Zee, K., Borgen, P., Gollub, M., Bacotti, D., Yao, T.J., Bloch, R., Ligueros, M., Sonenberg, M., Norton, L. & Hudis, C. (2001) Oral gossypol in treatment of patients with refractory metastatic breast cancer: a phase I/II clinical trial. *Breast Cancer Res Treat* 66 (3), 239-248
- Vanweyenberg, V., Communi, D., D'Santos CS, & Erneux, C. (1995) Tissue- and cell-specific expression of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-kinase isoenzymes. *Biochem J* 306, 429-435

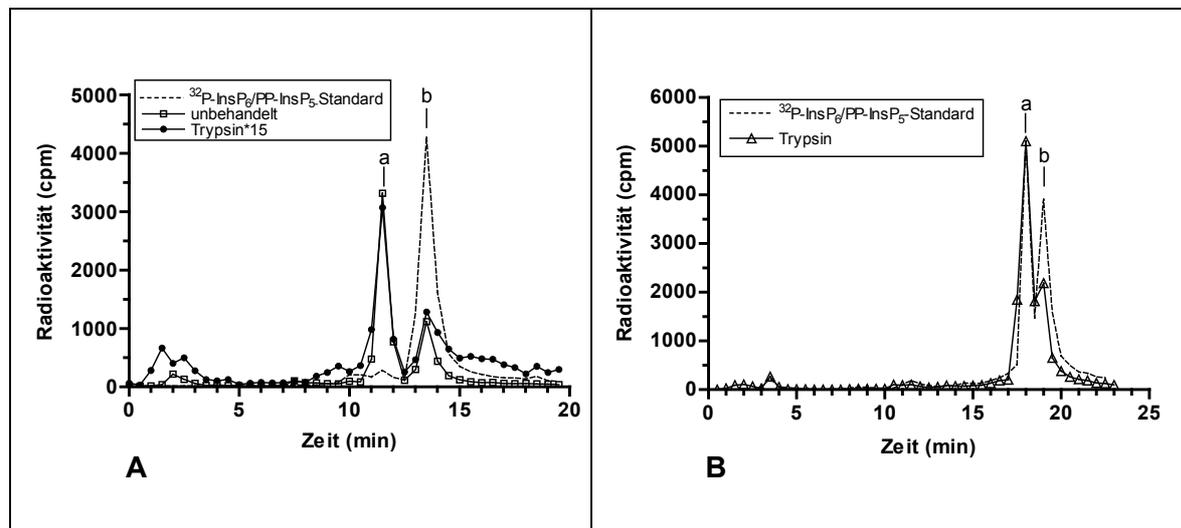
- Verbsky, J.W., Wilson, M.P., Kisseleva, M.V., Majerus, P.W. & Wente, S.R. (2002) The synthesis of inositol hexakisphosphate: characterization of human inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase. *J Biol Chem* 277(35), 31857-31862
- Voglmaier, S.M., Bembenek, M.E., Kaplin, A.I., Dormán, G., Olzewski, J.D., Prestwich, G.D. & Snyder, S.H. (1996) Purified inositol hexakisphosphate kinase is an ATP synthase: diphosphoinositol pentakisphosphate as a high-energy phosphate donor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4305-4310
- Voglmaier, S.M., Keen, J.H., Murphy, J.E., Ferris, C.D., Prestwich, G.D., Snyder, S.H. & Theibert, A.B. (1992) Inositol hexakisphosphate receptor identified as the clathrin assembly protein AP-2. *Biochem Biophys Res Commun* 197 (1), 158-163
- Walker, J.V. & Nitiss, J.L. (2002) DNA topoisomerase II as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Invest* 20, 570-589
- Weaver, J., Pollack, S. & Zhan, H. (1989) Low molecular weight iron from guinea pig reticulocytes isolated by Sephadex G-25 chromatography. *Eur J Haematol* 43 (4), 321-327
- Wei, Y.Q., Zhao, X., Kariya, Y., Flukata, H., Teshigawara, K. & Uchida, A. (1994) induction of apoptosis by quercetin: involvement of heat shock protein. *Cancer Res* 54 (18), 4952-4957
- Weiss, G. (2002) Eisen, Infektion und Anämie - eine klassische Triade. *Wien Klin Wochenschr* 114 (10-11), 357-367
- Wilson, M.P. & Majerus, P.W. (1996) Isolation of inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase, cDNA cloning, and expression of the recombinant enzyme. *J Biol Chem* 271 (20), 11904-11910
- Xie, W., Kaetzel, M.A., Bruzik, K.S., Dedman, J.R., Shears, S.B. & Nelson, D.J. (1996) Inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate inhibits the calmodulin-dependent protein kinase II-activated chloride conductance in T84 colonic epithelial cells. *J Biol Chem* 271 (24), 14092-14097
- Yang, D. & Nagayama, K. (1993) Permeation of small molecules into the cavity of ferritin as revealed by proton nuclear magnetic resonance relaxation. *Biochem J* 307, 253-256
- Yang, S.N., Yu, J., Mayr, G.W., Hofmann, F., Larsson, O. & Berggren, P.O. (2001) Inositol hexakisphosphate increases L-type  $Ca^{2+}$  channel activity by stimulation of adenylyl cyclase. *FASEB J* 15 (10), 1753-1763
- Ye, W., Ali, N., Bembenek, M.F., Shears, S.B. & Lafer, E.M. (1995) Inhibition of clathrin assembly by high affinity binding of specific inositol polyphosphates to the synapse-specific clathrin assembly protein AP-3. *J Biol Chem* 270 (4), 1564-1568
- Ye, Y.X., Akera, T. & Ng, Y.C. (1989) Modification of the positive inotropic effects of catecholamines, cardiac glycosides and  $Ca^{2+}$  by the orally active male contraceptive, gossypol, in isolated guinea-pig heart. *Life Sci* 45 (20), 1853-1861.
- York, J.D., Odom, A.R., Murphy, R., Ives, E.B. & Wente, S.R. (1999) A phospholipase C -dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export. *Science* 285, 96-100
- Yoshida, M., Sakai, T., Hosokawa, N., Marui, N., Matsumoto, K., Fujioka, A., Nishino, H., & Aoike, A. (1990) The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. *FEBS Lett* 260 (1), 10-13
- Zhang, M., Liu, H., Guo, R., Ling, Y., Wu, X., Li, B., Roller, P.P., Wang, S. & Yang, D. (2003) Molecular mechanism of gossypol-induced cell growth inhibition and cell death of HAT-29 human colon carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 66 (1), 93-103
- Zhang, T., Caffrey, J.J., & Shears, S.B. (2001) The transcriptional regulator, Arg82, is a hybrid kinase with both monophosphoinositol and diphosphoinositol polyphosphate synthase activity. *FEBS Lett* 494 (3), 208-212
- Zhang, W., Law, R.E., Hinton, D.R. & Couldwell, W.T. (1997) Inhibition of human malignant glioma cell motility and invasion *in vitro* by hypericin, a potent protein kinase C inhibitor. *Cancer Lett* 120 (1), 31-38
- Zi, X., Singh, R.P. & Agarwal, R. (2000) Impairment of erbB1 receptor and fluid-phase endocytosis and associated mitogenic signaling by inositol hexaphosphate in human prostate carcinoma DU145 cells. *Carcinogenesis* 21 (12), 2225-2235

## Anhang

## A1. Abbildungen



**Abb. A-1: HPLC-Analyse der Überstände von  $6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ / $[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6$ -markierten Rattenleberextrakten nach saurer Hydrolyse.** Aliquots mit gereinigtem und  $6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ / $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6$ -markiertem Rattenleberextrakt wurden 20 min bei  $95\text{ }^\circ\text{C}$  in 10%iger TCE erhitzt (durchgezogene Linien). Als Kontrollen dienten mit 10%iger TCE behandelte Aliquots, die solange auf Eis inkubiert wurden (gestrichelte Linien). Die gefällten Proteine wurden abzentrifugiert und die Überstände mit MDD-HPLC analysiert.  $\text{InsP}_3$  (a), D- $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$ / $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$  (b),  $\text{InsP}_6$  (c); PP- $\text{InsP}_5$  (d) war teilweise, aber nicht vollständig zu  $\text{InsP}_6$  hydrolysiert, was an einer leichten Zunahme des  $\text{InsP}_6$ -Peaks zu erkennen ist. Die Legende gibt die Reihenfolge der im Chromatogramm dargestellten Proben von oben nach unten an.



**Abb. A-2: Analyse der  $\text{InsP}$ -Zusammensetzung von radioaktiv-markiertem Rattenleberextrakt der P100-Fraktion nach Behandlung mit Trypsin.** Die Proteine wurden vor der Proteolyse mit TCE gewaschen (A) oder im Standardreaktionsansatz direkt mit Trypsin verdaut (B). Die gesamte Probe (etwa  $0,9\text{ mg}$  Protein) wurde über eine Mini-Q-Säule an der HPLC fraktioniert. Es wurden alle 30 s Fraktionen gesammelt, deren Radioaktivität bestimmt wurde. Als Vergleich wurde das Elutionsprofil eines Aliquots der  $6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$ -Synthese aufgetragen und einer unbehandelten Probe.  $6[^{32}\text{P}]\text{-InsP}_6$  (a);  $6[^{32}\text{P}]\text{-PP-InsP}_5$  (b).

## A2. HPLC-Gradienten

MQIPFLKURZ							
Zeit (min)	Flussrate ( $\mu\text{l}/\text{min}$ )	% A	% B	Zeit (min)	Flussrate ( $\mu\text{l}/\text{min}$ )	% A	% B
0	500	97	3	0	500	97	3
1,9	500	97	3	1,9	500	97	3
2,9	500	95	5	2,9	500	95	5
3,6	500	93	7	3,6	500	93	7
4,1	500	91	9	4,1	500	91	9
7,4	500	90	10	7,4	500	90	10
7,7	500	89	11	7,7	500	89	11
7,9	500	87	13	7,9	500	87	13
8,2	500	85	15	8,2	500	85	15
8,6	500	83	17	8,6	500	83	17
9,2	500	82	18	9,2	500	82	18
10,2	500	81	19	10,2	500	81	19
11,4	500	75	25	11,4	500	75	25
11,9	500	72	28	11,9	500	72	28
12,7	500	65	35	12,7	500	65	35
13,5	500	55	45	13,5	500	55	45
14,9	500	30	70	14,9	500	30	70
15,8	500	16	84	15,8	500	16	84
16,3	500	10	90	16,3	500	10	90
16,6	500	7	93	16,6	500	7	93
16,9	500	5	95	16,9	500	5	95
17,4	500	3	97	17,4	500	3	97
17,6	500	0	100	17,6	500	0	100
21,5	500	0	100	24	500	0	100
21,6	500	100	0	24,1	500	100	0
23,6	500	100	0	26,1	500	100	0
23,8	500	100	0	26,2	500	100	0

MQIP7-8				MQIP7-8.wash			
Zeit (min)	Flussrate ( $\mu\text{l}/\text{min}$ )	% A	% B	Zeit (min)	Flussrate ( $\mu\text{l}/\text{min}$ )	% A	% B
0	500	97	3	0	500	97	3
1,0	500	96	4	1,0	500	96	4
3,0	500	95	5	3,0	500	95	5
3,3	500	91	9	4,3	500	95	5
7,2	500	47	53	5,0	500	91	9
7,4	500	45	55	7,2	500	47	53
7,6	500	44	56	7,4	500	45	55
7,9	500	42	58	7,6	500	44	56
8,4	500	40	60	7,9	500	42	58
10,4	500	30	70	8,4	500	40	60
15,4	500	0	100	10,4	500	30	70
17,4	500	0	100	15,4	500	0	100
17,5	500	100	0	17,4	500	0	100
20,0	500	100	0	17,5	500	100	0
20,2	500	100	0	20,0	500	100	0
				20,2	500	100	0

### A3. Verzeichnis der Abkürzungen

(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	Ammoniumsulfat
(PP) <sub>2</sub> -InsP <sub>4</sub>	Bisdiphosphoinositol-tetrakisphosphat
°C	Grad Celsius
μ	mikro
3D	3-dimensional
Å	Angström
A	Adenosin
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AK	Antikörper
Akt	Akt-Proteinkinase / Proteinkinase B
AP	Alkalische Phosphatase
AP-2, -180	Adapter-Protein-2, -180
APS	Ammoniumpersulfat
As	Aminosäure
AS	Ammoniumsulfat
ATA	Aurintricarbonsäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AU	Flächeneinheit
b	Basen
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ion
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cADPR	zyklische Adenosindiphosphat-Ribose
Calcein AM	Calcein-Acetoxy-methylester
CaM	Calmodulin
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> /CaM-abhängige Proteinkinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CDC	<i>cell division control</i>
CDK	<i>Cyclin-Dependent Kinase</i> , Cyclin-abhängige Kinase
CDKI	<i>Cyclin-Dependent Kinase-Inhibitor</i> , Cyclin-abhängige-Kinase Inhibitor
cDNA	komplementäre (kodierende) Desoxyribonukleinsäure
CID	kollisionsinduzierte Dissoziation
Cl <sup>-</sup>	Chlorid-Ion
cpm	<i>counts per minute</i>
d	Schichtdicke
D	dextro
Da	Dalton
DAG	Diazylglyzerol
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
ddH <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxynukleosid-5'-triphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
DIPP	Diphosphoinositolphosphat-Phosphatasen
DMF	Dimethylformamid
DMT1	Divalenter Metalltransporter 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DR4	<i>Death Receptor 4</i>
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Enzym
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ECG	(-)-Epicatechin-3-gallat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EGF	<i>epidermal growth factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGFR	EGF-Rezeptor
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extrazellulär-Signal-regulierte Kinase
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
Fe <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup>	zwei-, dreiwertiges Eisen
FYVE-Domäne	Fab1p, YOTB, Vac1p, EEA1-Domäne
G	Guanosin
g	Gramm; Erdbeschleunigung
G0, 1, 2	Gap-Phase 0, 1, 2
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDI	Guanin-Nukleotid-Dissoziations-Inhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>Guanine-Nucleotide-Exchange-Factor</i> , Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Gg	<i>Gallus gallus</i>
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GRAB	GEF für Rab3a
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H <sup>+</sup>	Wasserstoff-Ion
H <sup>3</sup>	Tritium
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
His	Histidin
HMW	<i>high molecular weight</i>
HP	Homogenisierungspuffer
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
Hs	<i>Homo sapiens</i>
I	Inhibitor
IC50	Inhibitor-Konzentration, bei der die Enzymhemmung halbmaximal ist
IC60	Inhibitor-Konzentration, bei einer Enzymhemmung von 60 % vorliegt
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IK-Lsg.	Inkubationslösung
IL	Interleukin
Ins(1,4,5)P <sub>3</sub>	D- <i>myo</i> -Inositol 1,4,5-trisphosphat
Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> R	D- <i>myo</i> -Inositol 1,4,5-trisphosphat-Rezeptor
InsP	Inositolphosphat/e
IP3-5/6-K/IP4-1-K	D- <i>myo</i> -Inositol-1,3,4-tetrakisphosphat-5/6-Kinase/ D- <i>myo</i> -Inositol-3,4,5,6-tetrakisphosphat-1-Kinase
IP3K	D- <i>myo</i> -Inositol -1,4,5-trisphosphat 3-Kinase
IP5-2-K	D- <i>myo</i> -Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat-2-Kinase
IP6K	Inositolhexakisphosphat-Kinase
IPK	Inositolphosphatkinase
IPMK	Inositolpolyphosphat-Multikinase
IPP	Inositolphosphatphosphatase
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
Jak	Janus-Kinase
k	Kilo
k	Konstante
K <sup>+</sup>	Kalium-Ion
k <sub>cat</sub>	katalytische Konstante, Wechselzahl
KCl	Kaliumchlorid
Kd	Dissoziationskonstante
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
Ki	Inhibitionskonstante
Km	Michaelis-Menten-Konstante

Km <sub>app</sub>	apparenter Km-Wert
KOH	Kalilaug
l	Liter
L1	1,2-Dimethyl-3-hydroxy-4-pyridon
LDH	L-Lactatdehydrogenase
Li <sup>+</sup>	Lithium-Ion
LiOH	Lithium-Hydroxid
LMW	<i>low molecular weight</i>
M	Mitose-Phase
m	Meter
M	molar
m	milli
MAP	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MDD	<i>metal dye detection</i>
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium-Ion
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute
MIPP	Multipel Inositolphosphat-Phosphatasen
Mm	<i>Mus musculus</i>
MnCl <sub>2</sub>	Manganchlorid
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
n	nano
Na <sup>+</sup>	Natrium-Ion
NAADP	Nikotinsäure-Adenin-Dinukleotidphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NADH	hydriertes Nikotinsäureamidadenindinukleotid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natronlauge
NBD-DFO	7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-desferrioxamin
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NES	Nucleäres-Export-Signal
NF	Nuklear-Faktor
Ni	Nickel
NLS	Nucleäres-Lokalisations-Signal
O	Sauerstoff
OD	optische Dichte
p	pico
P	Produkt/e
P	Phosphor
P <sup>32</sup>	radioaktives Phosphor-Isotop
P0.5, P2, P10, P100	Pellets aus differentieller Zentrifugation bei 500 g, 2000 g, 10 000 g, 100 000 g
PAR	4-(2-Pyridyl)-(2)-azo-resorcin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
PG SK	Phengrün SK-diazetat
PH-Domäne	Pleckstrin homologe-Domäne
PIK	Phosphatidylinositolkinase
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PI4K	Phosphatidylinositol 4-Kinase
PIP	Phosphatidylinositolphosphatase
PK	Pyruvatkinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMCA	Plasmamembran-lokalisierte Calcium-ATPasen

PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PP-InsP	Inositolpyrophosphat
PP-InsP <sub>4</sub>	Diphosphotetrakisphosphat
PP-InsP <sub>5</sub>	Diphosphoinositolpentakisphosphat
PTB-Domäne	Phosphotyrosin-Bindungs-Domäne
PtdInsP	Phosphatidylinositolphosphat/e
PTEN	Phosphatase und Tensin homolog
R	Rest
RbCl	Rubidiumchlorid
Rn	<i>Rattus norvegicus</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RyR	Ryanodin-Rezeptor
S	Synthese-Phase
s	Sekunde
S	Substrat
S	Schwefel
S.	Seite
S100	Überstand aus differentieller Zentrifugation bei 100 000 g
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SERKA	Sarkoplasmatisches/Endoplasmatisches Retikulum-lokalisierte Calcium-ATPasen
SH-Domäne	src-homologe Domäne
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
Stat	Signal-Transduktor und -Aktivator der Transkription
STKM-	Puffer Sucrose/Tris/KCl/MgCl <sub>2</sub> -Puffer
T	Thymidin
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat/EDTA-Puffer
TBS	Tris Buffer Saline
TCE	Trichloressigsäure
TEA	Triethanolamin
TEMED	N, N, N', N' – Tetramethylethylendiamin
THF	3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon
TNF	Tumor-Nekrosis-Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTBS	Tween/Tris Buffer Saline
U	enzymatische Einheit ( <i>unit</i> ; 1 U entspricht 1 µmol/min)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
v	Geschwindigkeit
v/v	Volumen/Volumen
Vmax	maximale Umsatzgeschwindigkeit
Vmax, spez.	spezifische maximale Enzymaktivität
w/v	Gewicht/Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galaktopyranosid
Y	Yttrium

#### A4. Abkürzungen der Aminosäuren

Aminosäure	Einbuchstaben- bezeichnung	Aminosäure	Einbuchstaben- bezeichnung
Alanin	A	Leucin	L
Arginin	R	Lysin	K
Asparagin	N	Methionin	M
Asparaginsäure	D	Phenylalanin	F
Cystein	C	Prolin	P
Glutamin	Q	Serin	S
Glutaminsäure	E	Threonin	T
Glyzin	G	Tryptophan	W
Histidin	H	Tyrosin	Y
Isoleucin	I	Valin	V

#### A5. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1-1: Struktur von Inositolphosphaten und Phosphatidylinositolphosphaten.....	5
Abb. 1.1-2: Nummerierung von Inositolphosphaten.....	6
Abb. 1.2-1: Schematische Darstellung der Bildung von Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> und DAG.....	7
Abb. 1.2-2: Schematische Darstellung der Calcium-freisetzenden Elemente.....	8
Abb. 1.3-1: Schematische Darstellung funktioneller Bereiche humaner PDKG-Kinasen.....	14
Abb. 1.4-1: Stoffwechselwege des Phosphatidylinositolphosphat-Metabolismus.....	21
Abb. 1.4-2: Der Inositolphosphat-Metabolismus in Tieren.....	22
Abb. 2.1-1: Vollständige Nukleotid- und Aminosäuresequenz der humanen IP6K-2.....	26
Abb. 2.4-1: Schematische Darstellung des Aufbaus der MDD-HPLC.....	49
Abb. 2.4-2: Enzymatische Synthese von 6[ <sup>32</sup> P]-InsP <sub>6</sub> aus D-Ins(1,2,3,4,5)P <sub>5</sub> .....	53
Abb. 2.4-3: Enzymatische Synthese von 6[ <sup>32</sup> P]-PP-InsP <sub>5</sub> .....	53
Abb. 2.4-4: Arbeitsschema zur Vorbereitung der Proben für die SDS-PAGE.....	60
Abb. 3.1-1: Immunologischer Nachweis rekombinanter GST-IP6K-2 durch <i>Western-Blot</i> .....	74
Abb. 3.1-2: Beispiel für <i>Single Transient</i> -Messung mit dem gekoppelten optischen Test zur Bestimmung apparenter Km-Werte.....	75
Abb. 3.1-3: Beispiel für die Auswertung der IP6K-2-Kinetiken in GraphPad Prism 4.....	76
Abb. 3.1-4: Bestimmung von spez. Vmax für InsP <sub>6</sub> durch doppelt-reziproke Darstellung nach Lineweaver-Burk.....	77
Abb. 3.1-5: Bestimmung des Km-Wertes für das Substrat InsP <sub>6</sub> und des Ki-Wertes für PP-InsP <sub>5</sub> .....	77
Abb. 3.1-6: Bestimmung des spezifischen Vmax- und des apparenten Km-Werts für das Substrat ATP durch doppelt-reziproke Darstellung nach Lineweaver-Burk.....	78
Abb. 3.2-1: MDD-HPLC Chromatogramme der InsP <sub>x</sub> -Standards bei verschiedenen Gradienten.....	80
Abb. 3.2-2: Produktanalysen der IP6K-2-Umsätze der Enantiomere D-Ins(1,2,4,5,6)P <sub>5</sub> und D-Ins(2,3,4,5,6)P <sub>5</sub> .....	81
Abb. 3.2-3: Schematische Darstellung der vermutlichen Reaktionswege der IP6K-2 ausgehend von den Substraten D-Ins(1,2,4,5,6)P <sub>5</sub> und D-Ins(2,3,4,5,6)P <sub>5</sub> .....	81
Abb. 3.2-4: Säurekatalysierte Hydrolyse von PP-InsP <sub>5</sub> .....	84
Abb. 3.2-5: Produktanalysen der IP6K-2-Umsätze der Enantiomere D-Ins(1,2,3,4,5)P <sub>5</sub> und D-Ins(1,2,3,5,6)P <sub>5</sub> .....	84
Abb. 3.2-6: Schematische Darstellung der vermutlichen Reaktionswege der IP6K-2 ausgehend von den Substraten D-Ins(1,2,3,4,5)P <sub>5</sub> und D-Ins(1,2,3,5,6)P <sub>5</sub> .....	84
Abb. 3.2-7: Produktanalysen der IP6K-2-Umsätze der InsP <sub>5</sub> -Isomere D-Ins(1,3,4,5,6)P <sub>5</sub> und D-Ins(1,2,3,4,6)P <sub>5</sub> .....	85
Abb. 3.2-8: Schematische Darstellung der vermutlichen Reaktionswege der IP6K-2 ausgehend von den Substraten D-Ins(1,3,4,5,6)P <sub>5</sub> und D-Ins(1,2,3,4,6)P <sub>5</sub> .....	86
Abb. 3.2-9: Produktanalysen der IP6K-2-Umsätze verschiedener InsP <sub>4</sub> -Isomere.....	87
Abb. 3.2-10: Schematische Darstellung der vermutlichen Reaktionswege der IP6K-2 ausgehend von den Substraten D-Ins(1,2,4,5)P <sub>4</sub> , D-Ins(1,3,4,6)P <sub>4</sub> und D-Ins(2,4,5,6)P <sub>4</sub> .....	87
Abb. 3.3-1: Struktur von Epicatechingallat (ECG).....	90
Abb. 3.3-2: Struktur von Aurintricarbon-säure (ATA).....	90
Abb. 3.3-3: Struktur von Gossypol.....	90
Abb. 3.3-4: Struktur von Hypericin.....	90
Abb. 3.3-5: Struktur von 3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon (THF).....	90

Abb. 3.3-6: Struktur von Quercetin.....	90
Abb. 3.3-7: Konzentrations-Wirkungskurven für verschiedene polyphenolische Substanzen.....	91
Abb. 3.3-8: Allgemeine Geschwindigkeitsgleichung für die reversible Enzymhemmung. ....	92
Abb. 3.3-9: Mechanismus der kompetitiven Hemmung. ....	93
Abb. 3.3-10: Graphische Darstellung der Hemmwirkung durch ECG, THF und Quercetin. ....	94
Abb. 3.4-1: Lokalisation von EGFP und des EGFP-IP6K-2-Fusionsproteins in NRK52E-Zellen. ....	95
Abb. 3.4-2: Lokalisation des EGFP-IP6K-2-Fusionsproteins in H1299-Zellen.....	96
Abb. 3.4-3: Überprüfung des IP6K-2-Antikörpers mit Hilfe des EGFP-IP6K-2-Fusionsproteins in H1299-Zellen. ....	97
Abb. 3.4-4: Überprüfung des IP6K-2-Antikörpers mit Hilfe eines EGFP-IPMK-Fusionsproteins in H1299-Zellen. ....	97
Abb. 3.4-5: Lokalisation endogener IP6K in H1299-Zellen .....	98
Abb. 3.4-6: Immunologischer Nachweis von HsIP6K-2 in Lysaten von H1299-Zellen durch <i>Western-Blot</i> . ....	99
Abb. 3.5-1: Mögliche Phitylierungsreaktion von PP-InsP <sub>5</sub> über die Aminosäure Serin an ein Peptid .	99
Abb. 3.5-2: Flussdiagramm der Arbeitsschritte zur Identifizierung von Akzeptormolekülen für hochphosphorylierte InsP. ....	101
Abb. 3.5-3: Umsatz von Inositolphosphaten <i>in vitro</i> durch gereinigte fetale Rattenleberextrakte. ....	102
Abb. 3.5-4: Synthese von 6[ <sup>32</sup> P]-InsP <sub>6</sub> und 6[ <sup>32</sup> P]-PP-InsP <sub>5</sub> . ....	103
Abb. 3.5-5: Synthese von 5β[ <sup>32</sup> P]-PP-InsP <sub>5</sub> . ....	104
Abb. 3.5-6: Markierung gereinigter fetaler Rattenleberextrakte mit 6[ <sup>32</sup> P]-PP-InsP <sub>5</sub> /6[ <sup>32</sup> P]-InsP <sub>6</sub> .....	106
Abb. 3.5-7: Calcium- und Magnesiumabhängigkeit der Markierung gereinigter fetaler Rattenleberextrakte mit 6[ <sup>32</sup> P]-PP-InsP <sub>5</sub> /6[ <sup>32</sup> P]-InsP <sub>6</sub> .....	107
Abb. 3.5-8: Einfluss der TCE-Fällung der Proben auf das Laufverhalten der radioaktiv-markierten Rattenleberextrakte. ....	108
Abb. 3.5-9: Einfluss der TCE-Behandlung auf das Laufverhalten von 6[ <sup>32</sup> P]-PP-InsP <sub>5</sub> /6[ <sup>32</sup> P]-InsP <sub>6</sub> . ....	108
Abb. 3.5-10: Zeitabhängigkeit der Markierung von Rattenleberextrakt der P100-Fraktion durch 6[ <sup>32</sup> P]-PP-InsP <sub>5</sub> /6[ <sup>32</sup> P]-InsP <sub>6</sub> . ....	110
Abb. 3.5-11: Graphische Darstellung der Zeit- und Temperaturabhängigkeit der Markierung von gereinigtem Rattenleberextrakt durch 6[ <sup>32</sup> P]-PP-InsP <sub>5</sub> /6[ <sup>32</sup> P]-InsP <sub>6</sub> .....	110
Abb. 3.5-12: Säurestabilität der hochmolekularen radioaktiven Bande. ....	111
Abb. 3.5-13: Säurestabilität der hochmolekularen radioaktiven Bande. ....	112
Abb. 3.5-14: Stabilität der hochmolekularen radioaktiven Bande gegenüber Alkali, Proteasen und DNase I.....	113
Abb. 3.5-15: Alkalische Hydrolyse von Inositolphosphaten aus Extrakten der P100-Fraktion. ....	113
Abb. 3.5-16: Proteolyse von radioaktiv-markiertem Rattenleberextrakt der P100-Fraktion.....	114
Abb. 3.5-17: Proteolyse von radioaktiv-markiertem Rattenleberextrakt der P100-Fraktion nach vorheriger TCE-Behandlung. ....	115
Abb. 3.5-18: Phosphorylierung von gereinigten Rattenleberextrakten mit 5β[ <sup>32</sup> P]-PP-InsP <sub>5</sub> und γ-[ <sup>32</sup> P]-ATP.....	116
Abb. 3.5-19: Zeitabhängigkeit der Phosphorylierung von Rattenleberextrakten mit 5β[ <sup>32</sup> P]-PP-InsP <sub>5</sub> . ....	116
Abb. 3.5-20: Gewinnung von SDS-Gelbanden für die MS-Analyse von 6[ <sup>32</sup> P]-InsP <sub>6</sub> /6[ <sup>32</sup> P]-PP-InsP <sub>5</sub> -markiertem Rattenleberextrakt. ....	118
Abb. 3.5-21: Fragmentierung von Peptiden zur Sequenzbestimmung mit Tandem-MS.....	119
Abb. 3.5-22: MS/MS-Spektrum (SEQUEST) eines Peptidfragments.....	119
Abb. 3.5-23: Berechnung der Molekulargewichte möglicher Peptid-Modifikationen durch InsP <sub>x</sub> . ....	120
Abb. 3.6-1: Bindung von hochphosphorylierten Inositolphosphaten an Ferritin.....	122
Abb. 3.6-2: Zeitabhängigkeit der Markierung von Holo ferritin mit 6[ <sup>32</sup> P]-InsP <sub>6</sub> /6[ <sup>32</sup> P]-PP-InsP <sub>5</sub> . ....	123
Abb. 3.6-3: Intensitätsscan der radioaktiven Signale in mit 6[ <sup>32</sup> P]-InsP <sub>6</sub> /6[ <sup>32</sup> P]-PP-InsP <sub>5</sub> -markiertem Holo ferritin.....	124
Abb. 3.6-4: Intensitätsscan der radioaktiven Signale in mit 6[ <sup>32</sup> P]-InsP <sub>6</sub> /6[ <sup>32</sup> P]-PP-InsP <sub>5</sub> -inkubiertem Fe <sup>2+</sup> .....	124
Abb. 3.6-5: Chromatogramm der MDD-HPLC eines InsP <sub>x</sub> -Standards (Gradient MQIPFLKURZ). ....	125
Abb. 3.6-6: Extraktion von Inositolphosphaten aus Apoferritin und Holo ferritin mit alkalischer Hydrolyse bzw. der Pronase-Proteolyse.. ....	126
Abb. 3.6-7: Extraktion von InsP aus Holo ferritin.....	126
Abb. 3.6-8: Zeitlicher Verlauf der Extraktion von InsP aus Holo ferritin. ....	128
Abb. 3.7-1: Bindung von hochphosphorylierten Inositolphosphaten an ribosomale Proteine.....	129
Abb. 3.7-2: Extraktion von InsP mit saurer und alkalischer Hydrolyse aus ribosomalen Komplexen..	129
Abb. 4.2-1: Rotation von Inositolphosphatisomeren um optische Achsen und Nummerierung der C-Atome am Beispiel von D-Ins(1,4,5,6)P <sub>4</sub> . ....	132

Abb. 4.2-2: Strukturen von $\text{InsP}_4$ -Isomeren, die nicht durch die IP6K-2 umgesetzt wurden.....	133
Abb. 4.2-3: Strukturen von $\text{InsP}_4$ -Substraten der IP6K-2.....	133
Abb. 4.2-4: Strukturen von $\text{InsP}_5$ -Substraten der IP6K-2.....	134
Abb. 4.2-5: Struktur von $\text{D-Ins}(1,2,3,5,6)\text{P}_5$ .....	135
Abb. 4.2-6: Pyrophosphorylierung von $\text{InsP}_6$ und $\text{D-Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ durch die IP6K-2.....	136
Abb. 4.2-7: Putative Pyrophosphorylierungsstellen verschiedener $\text{InsP}_5$ -Isomere.....	136
Abb. 4.2-8: Neue Phosphorylierungswege im Inositolphosphat-Metabolismus von Tieren.....	140
Abb. 4.3-1: Allgemeine Molekülstruktur eines Flavons.....	147
Abb. 4.3-2: Selektivität der getesteten Inhibitoren für verschiedene IP-Kinasen.....	149
Abb. 4.3-3: Darstellung der Hemmstoffbindungsstellen in verschiedenen IP-Kinasen.....	150
Abb. 4.3-4: Darstellung der 3D-Struktur der katalytischen Domäne der humanen IP3K-A.....	151
Abb. 4.5-1: Molekulare Darstellung der Ferritin-Kugel und ihrer Kanäle.....	155
Abb. 4.5-2: Vereinfachtes Modell des Eisenmineral-Kerns.....	157
Abb. 4.5-3: Schematische Darstellung der rezeptorvermittelten Transferrin-Endozytose.....	157
Abb. 4.5-4: Modell zur Bindung von hochphosphorylierten $\text{InsP}$ an Ferritin.....	159
Abb. 4.5-5: Molekulare Darstellung von putativen funktionellen Aminosäureresten in Apoferritin im Bereich der 3zähligen Kanäle.....	160
Abb. 4.5-6: Molekülstruktur von <i>scyllo</i> - $\text{InsP}_6$ .....	161

## A6. Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1-1: Auswertung der IP6K-2-Kinetiken.....	76
Tab. 3.1-2: Ermittelte maximale Reaktionsgeschwindigkeiten, $K_m$ - und $K_i$ -Werte für die IP6K-2-Reaktion unter Standard- und Hochsalzbedingungen sowie bei niedriger ATP-Konzentration... 78	78
Tab. 3.1-3: Ermittelte maximale Reaktionsgeschwindigkeit und $K_{m_{app}}$ -Wert für ATP bei Substratsättigung.....	78
Tab. 3.2-1: Spezifische Aktivitäten, apparente $K_m$ -Werte und $k_{cat}$ ausgewählter alternative Substrate der IP6K-2.....	88
Tab. 3.2-2: Umsatz verschiedener $\text{InsP}$ .....	89
Tab. 3.3-1: Zusammenfassung der $IC_{50}$ -Werte mit Standardabweichungen für verschiedene Inhibitoren der IP6K-2.....	91
Tab. 3.3-2: Zusammenfassung der Wirkung der Hemmstoffe auf die IP6K-2-Aktivität bezüglich dem Substrat $\text{InsP}_6$ .....	95
Tab. 3.3-3: Zusammenfassung der Wirkung der Hemmstoffe auf die IP6K-2-Aktivität bezüglich dem Substrat ATP.....	95
Tab. 3.5-1: Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung der Gelbanden.....	121
Tab. 3.6-1: Detektierte $\text{InsP}$ -Isomere nach Solubilisierung, saurer oder alkalischer Extraktion von Apo- oder Holo ferritin.....	127
Tab. 3.6-2: Menge der in 48 h aus Holo ferritin mit Triton X-100 oder TCE extrahierten $\text{InsP}$ .....	127
Tab. 4.1-1: Vergleich der enzymatischen Charakteristika von unterschiedlich gewonnenen IP6K....	131
Tab. 4.2-1: Aufstellung der strukturellen Merkmale der getesteten $\text{InsP}_4$ - und $\text{InsP}_5$ -Isomere.....	138

# Lebenslauf

## **Natalie Bischoff**

geboren 1973 in Hamburg

### **Ausbildung**

- 03/2001 – 02/2005                      Promotion, FB Biologie, Universität Hamburg
- 10/1994 – 01/2001                      Studium der Biologie, Universität Hamburg  
Titel der Diplomarbeit: „Der Einfluss zytotoxischer Chemikalien auf das Wachstum und das Zytoskelett von Tabakpollenschläuchen“  
Hauptfach Botanik – Nebenfächer Zoologie / Bodenkunde
- 06/1993                                      Abitur, Gymnasium Heidberg, Hamburg

### **Tätigkeiten**

- 03/2001 – 03/2004                      Wiss. Mitarbeiterin, Inst. f. Biochemie u. Molekularbiologie I, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
- 07/2000 – 01/2001                      Zytotoxikologische Untersuchungen für Kunden aus Industrie und Universität, Hamburg
- 04/2000 – 05/2000                      Durchführung von Führungen in einer naturkundlichen Ausstellung, Woite, Bauch und Partner GmbH, Hamburg
- 03/1998 – 03/2000                      Studentische Hilfskraft, Institut für Bodenkunde, Hamburg

### **Publikationen**

Udo Kristen, **Natalie Bischoff**, Saskia Lisboa, Enno Schirmer, Sören Witt & Hartmut Quader; ATLA 30, 323-329, May/June 2002: Morphology of Cell Injury: an Approach to the EDIT Programme by the Use of Tobacco Pollen Tubes.