

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Biochemie und Signaltransduktion

Direktor: Prof. Itzen

Klonierung, rekombinante Expression, Aufreinigung und Charakterisierung der Inositolphosphatkinasen TvIPK-1 und TvIP6K4 aus Trichomonas vaginalis

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Sabine Roth
aus Bitburg

Hamburg 2022

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 12.12.2022

**Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
Hamburg**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Linda Diehl

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Georg Mayr

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	2
1.1	Das Protozoon <i>Trichomonas vaginalis</i> - Erreger der Trichomoniasis.....	2
1.1.1	Morphologie, Struktur und Aufbau von <i>Trichomonas vaginalis</i>	2
1.1.2	Das Genom von <i>Trichomonas vaginalis</i>	4
1.2	Trichomoniasis – Medizinische Bedeutung.....	4
1.2.1	Epidemiologie.....	4
1.2.2	Ätiologie.....	5
1.2.3	Klinik.....	5
1.2.4	Folgen der Trichomoniasis.....	6
1.2.5	Konventionelle Therapie und Ausblick.....	7
1.3	Nomenklatur und Isomerie der Inositolphosphate.....	7
1.4	Metabolismus der Inositolphosphate.....	8
1.4.1	Monophosphorylierte Inositolphosphate.....	9
1.4.2	Pyrophosphorylierte Inositolphosphate.....	13
1.5	Die Familie der PDKG Kinasen.....	16
1.6	Inositolphosphatkinasen in <i>Trichomonas vaginalis</i>	16
1.7	Zielsetzung.....	18
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Material.....	21
2.1.1	Apparative Ausrüstung.....	21
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	22
2.1.3	Chemikalien.....	23
2.1.4	Kit.....	24
2.1.5	Plasmide.....	24
2.1.6	Primer.....	24
2.1.7	Bakterienstämme.....	25
2.1.8	Enzyme.....	25
2.1.9	Puffer und Lösungen.....	25
2.1.10	Inositolphosphate.....	28
2.2	Software.....	29
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	29
2.3.1	Resolubilisierung von Vektoren.....	29
2.3.2	Präparativer Restriktionsverdau.....	29

2.3.3	Agarosegelelektrophorese	30
2.3.4	DNA-Extraktion aus dem präparativen Agarosegel.....	30
2.3.5	Ligation von DNA-Fragmenten	31
2.3.6	Extraktion der Plasmid-DNA aus den transformierten E.colis (Mini- Präparation)	32
2.3.7	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	33
2.3.8	Analytischer Restriktionsverdau der ligierten Plasmide	33
2.3.9	DNA-Sequenzierung	33
2.4	Mikrobiologische Methoden.....	33
2.4.1	Sterilisation von Gebrauchsmaterial	33
2.4.2	Herstellung von Agarplatten	34
2.4.3	Herstellung von transformationskompetenten Escherichia coli.....	34
2.4.4	Transformation der E.coli	34
2.4.5	Verdünnungsausstrich der transformierten E.coli Stämme.....	35
2.4.6	Herstellung einer Über-Nacht-Kultur.....	35
2.4.7	Bakterielle Expression der TvIPK-1	35
2.4.8	Bakterielle Expression der TvIP6K4.....	36
2.4.9	Lyse der Bakterien und Gewinnung des löslichen Proteins.....	37
2.5	Biochemische Methoden.....	38
2.5.1	Vorbereitung der P11 Phosphocellulose Säule	38
2.5.2	Aufreinigung des Lysats der TvIPK-1 mittels P11 Phosphocellulose- Säulenchromatographie.....	38
2.5.3	Aufreinigung des Lysats der TvIP6K4 mittels P11 Phosphocellulose- Säulenchromatographie.....	39
2.5.4	Affinitätschromatographie der TvIP6K4 als Strep-Tag Fusionsprotein	39
2.5.5	SDS-PAGE Gelelektrophorese	40
2.5.6	Lagerung der Säuleneluat	41
2.5.7	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	41
2.5.8	Testung der aufgereinigten Kinasen.....	42
2.5.9	Vorbereitung der Proben für die HPLC-Analyse mittels Metal-Dye Detection (MDD-HPLC)	44
2.5.10	HPLC-Analyse mittels Metal-Dye Detection (MDD-HPLC).....	45
2.5.11	Gekoppelter enzymatisch-optischer Test	46
3	Ergebnisse.....	49

3.1	Umklonierung der cDNA aus dem Klonierungsvektor in den Expressionsvektor	49
3.2	Rekombinante bakterielle Expression und Reinigung der TvIPK-1.....	51
3.3	Bestimmung der Substratspezifität der TvIPK-1	52
3.3.1	Umsatz von Phytinsäurehydrolyast	53
3.3.2	Umsatz von 1,4 InsP ₂	59
3.3.3	Umsatz von 4,5 InsP ₂	60
3.3.4	Umsatz von 1,2,5 InsP ₃ / 2,3,5 InsP ₃	61
3.3.5	Umsatz von 1,2,6 InsP ₃ / 2,3,4 InsP ₃	62
3.3.6	Umsatz von 1,3,4 InsP ₃	63
3.3.7	Umsatz von 1,4,5 InsP ₃	64
3.3.8	Umsatz von 1,4,6 InsP ₃	65
3.3.9	Umsatz von D-2,4,5 InsP ₃	66
3.3.10	Umsatz von D-3,4,6 InsP ₃	68
3.3.11	Umsatz von 1,2,3,4 InsP ₄	70
3.3.12	Umsatz von 1,2,3,5 InsP ₄	71
3.3.13	Umsatz von D-1,2,3,6 InsP ₄	72
3.3.14	Umsatz von 1,2,4,5 InsP ₄	73
3.3.15	Umsatz von D-1,3,4,5 InsP ₄	75
3.3.16	Umsatz von 1,3,4,6 InsP ₄	77
3.3.17	Umsatz von 1,3,5,6 InsP ₄	78
3.3.18	Umsatz von 1,4,5,6 InsP ₄	79
3.3.19	Umsatz von 2,4,5,6 InsP ₄	80
3.3.20	Umsatz von D-3,4,5,6 InsP ₄	81
3.3.21	Umsatz von 1,2,3,4,5 InsP ₅	82
3.3.22	Umsatz von 1,2,3,4,6 InsP ₅	83
3.3.23	Umsatz von 1,2,4,5,6 InsP ₅	84
3.3.24	Umsatz von 1,3,4,5,6 InsP ₅	86
3.3.25	Umsatz von InsP ₆	87
3.3.26	Überblick über die Substratspezifität der TvIPK-1	88
3.3.27	Kinetische Charakterisierung des Umsatzes des Hauptsubstrates 1,3,4,6 InsP ₄ .	91
3.3.28	K _m -Wert von ATP	91
3.4	Rekombinante bakterielle Expression und Reinigung der TvIP6K4.....	93
3.4.1	Optimierung der Aufreinigung der TvIP6K4.....	94
3.4.2	Ergebnis der optimierten Proteinexpression	96

3.5	Bestimmung der Substratspezifität der TvIP6K4	98
3.5.1	Umsatz von Phytinsäurehydrolysat	99
3.5.2	Umsatz von InsP ₇ Standard	101
3.5.3	Umsatz von 1,2,4,5 InsP ₄	103
3.5.4	Umsatz von 1,2,4,6 InsP ₄	105
3.5.5	Umsatz von 2,4,5,6 InsP ₄	106
3.5.6	Umsatz von 2,3,4,5,6 InsP ₅	107
3.5.7	Umsatz von 1,2,3,4,5 InsP ₅	109
3.5.8	Umsatz von 1,2,3,4,6 InsP ₅	110
3.5.9	Umsatz von 1,2,4,5,6 InsP ₅	112
3.5.10	Umsatz von 1,3,4,5,6 InsP ₅	114
3.5.11	Umsatz von InsP ₆	116
3.5.12	Umsatz von 4/6PP-InsP ₅	118
3.5.13	Umsatz von 5PP-InsP ₅	119
3.5.14	Überblick über die Substratspezifität der TvIP6K4	121
4	Diskussion.....	123
4.1	Charakterisierung der Substratelektivität der TvIPK-1	123
4.2	Stereochemie der Substratbindung	124
4.3	Substrate recognition mapping der TvIPMK.....	126
4.4	Enantiomerelektivität der TvIPMK.....	129
4.5	Der Inositolphosphatmetabolismus der TvIPMK in <i>Trichomonas vaginalis</i>	130
4.6	Diskussion der Bedeutung der TvIPMK.....	131
4.7	Charakterisierung der Substratelektivität der TvIP6K4	136
4.7.1	Prädiktion von Modellstrukturen der pyrophosphorylierten Inositolphosphate	139
4.8	Der Inositolphosphatmetabolismus der TvIP6K4 in <i>Trichomonas vaginalis</i>	141
4.9	Diskussion der Bedeutung der TvIP6K4	143
4.10	Ausblick	145
4.10.1	Phylogenie der Inositolphosphatkinasen mit Entwicklung eines InsP ₆ Syntheseweges und Unmöglichkeit einer Spezifitätsvorhersage aus der Aminosäuresequenz	145
4.10.2	TvIPMK und TvIP6K4 – Mögliche Targets für antimikrobielle Therapien? ...	151
5	Zusammenfassung	154
5.1	Abstract.....	155
6	Abkürzungsverzeichnis.....	156

7	Tabellenverzeichnis	160
8	Abbildungsverzeichnis	161
9	Literaturverzeichnis	165
10	Anhang.....	192
11	Danksagung	195
12	Lebenslauf.....	197
13	Eidesstattliche Versicherung	198

1 Einleitung

1.1 Das Protozoon *Trichomonas vaginalis* - Erreger der Trichomoniasis

Der Protist *Trichomonas vaginalis* ist der Erreger der Geschlechtskrankheit Trichomoniasis, der zweithäufigsten Geschlechtskrankheit überhaupt mit weltweit 110,4 Millionen Erkrankten (Rowley et al., 2019).

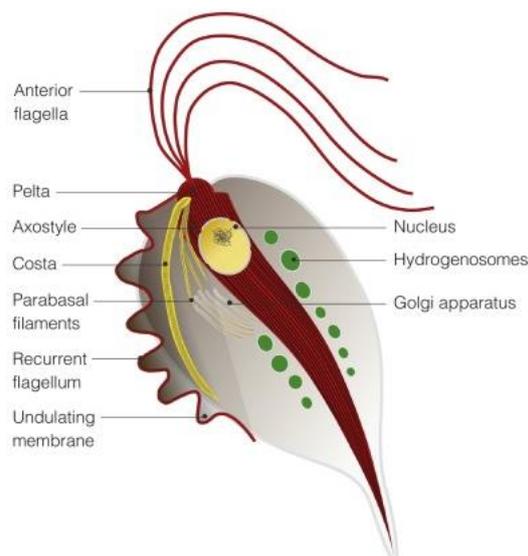
1.1.1 Morphologie, Struktur und Aufbau von *Trichomonas vaginalis*

Bei dem Erreger handelt es sich um ein parasitisches Protozoon, welches Teil der Familie der Trichomonadidae ist und zur Gattung *Trichomonas* gehört (Walochnik and Aspök, 2002). *Trichomonas vaginalis* existiert in dem Trophozoiten- und dem Pseudocystenstadium, wobei Hirt ein weiteres amoeboides Stadium beschreibt (Hirt, 2013, Pereira-Neves et al., 2003).

Das Trophozoitenstadium wird für die infektiöse Form von *Trichomonas vaginalis* gehalten (Hirt, 2013).

Beim Pseudocystenstadium handelt es sich um eine stressadaptierte Form von *Trichomonas vaginalis*, die eine wichtige Rolle im Lebenszyklus von *Trichomonas vaginalis* einnimmt (Afzan and Suresh, 2012). So ist die Pseudocystenform zur Mitose fähig (Pereira-Neves et al. 2003) und kann experimentell bei Mäusen eine Trichomoniasis auslösen und weist dabei sogar eine höhere Infektiosität und Invasivität als Trophozoiten auf (Hussein and Atwa, 2008, Pereira-Neves et al., 2003).

Die amoeboiden Form mit vergrößerter Oberfläche entsteht in Kultur bei Kontakt mit Vaginalepithel (Petrin et al., 1998).



aus Preisner et al. (2016) The cytoskeleton of parabasal parasites comprises proteins that share properties common to intermediate filament proteins. Protist. 167: 529 Fig. 1 The cytoskeleton of *T. gallinarum* and *T. vaginalis*.

Abbildung 1: Schematische Darstellung von *Trichomonas vaginalis*

Trichomonaden sind Flagellaten und besitzen als solche im Trophozoitenstadium fünf Geißeln, die aus einem Parabasalapparat in der Nähe des Zellkerns entspringen und am Vorderpol austreten (Honigberg and Brugerolle, 1990). Vier der fünf Geißeln flottieren frei (Schlüter, 2019). Die 5. Geißel ist rekurrent dem Zellkörper angelagert und Teil einer undulierenden Membran (Honigberg and Brugerolle, 1990), die durch eine skelettale Costa verstärkt wird, welche am Parabasalapparat inseriert (Benchimol, 2004, Walochnik and Aspök, 2002). Sie schützt die Plasmamembran vor den Scherkräften, die die Bewegungen der rekurrenten Geißel generieren (Benchimol, 2004, Preisner et al., 2016). Im Bereich des Parabasalapparats befindet sich der Golgi Apparat (Benchimol, 2004). Darüber hinaus durchzieht ein Axostyl den Protisten vom vorderen Bereich der sogenannten Pelta bis zum Hinterpol (Benchimol 2004). Im vorderen Bereich des Axostyls findet sich ein länglicher Nukleus, welcher vom rauen endoplasmatischen Retikulum umgeben wird (Benchimol, 2004). Der Nukleus enthält einen Chromosomensatz bestehend aus 6 haploiden Chromosomen (Drmotá and Král, 1997). Der Axostyl-Pelta Komplex, die Costa, die Basalkörper, das MTOC, sowie die Parabasalfilamente bilden das Cytoskelett (Benchimol, 2004).

Im Pseudocystenstadium ändert *Trichomonas vaginalis* seine Form und Morphologie. Der Protist nimmt in diesem Stadium eine sphärische Form an, ist unbeweglich und besitzt keine echte Zystenwand (Pereira-Neves et al., 2003). Sämtliche Geißeln sind internalisiert (Pereira-Neves et al., 2003). Axostyle und Costa verlieren ihre axiale Ausrichtung zugunsten einer gebogenen Ausrichtung (Pereira-Neves et al., 2003).

Charakteristisch für *Trichomonas vaginalis* ist das Fehlen mehrerer Organellen, die sich gewöhnlich in eukaryotischen Organismen finden, namentlich Mitochondrien, Peroxisomen und Glycosomen (Benchimol, 2004, Müller, 1990). Anstelle von Mitochondrien besitzt *Trichomonas vaginalis* Hydrogenosomen, die wie Mitochondrien von einer äußeren und inneren Membran umgeben sind (Benchimol, 2004, Honigberg et al., 1984). Sie dienen dem fermentativen, anaeroben Energiestoffwechsel (Mack and Müller, 1980). Anders als in Mitochondrien erfolgt die Energiegewinnung nicht mithilfe der oxidativen Phosphorylierung, sondern durch Substratkettenphosphorylierung, bei der als Endprodukt Wasserstoff entsteht (Müller, 1993).

Weiterhin verfügt *Trichomonas vaginalis* über folgende Organellen: den Golgi Apparat, das endoplasmatische Retikulum, Lysosomen und Endosomen (Benchimol, 2004). Der Golgi-Apparat dient der Sekretion von Adhäsinen (Benchimol, 2004). Die rauen endoplasmatischen Retikuli formen die äußere Kernmembran und dienen der

Calciumaufnahme (Benchimol, 2004). Endosomen spielen eine Rolle bei der Endozytose (Benchimol, 2004), Lysosomen bei der Phagozytose (Pereira-Neves and Benchimol, 2007).

1.1.2 Das Genom von *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis besitzt unter den bislang sequenzierten Protisten das größte bekannte Genom (Woehle et al., 2014). Dieses umfasst 160 Megabasen, codiert für circa 60000 Proteine und verteilt sich auf einen haploiden Chromosomensatz von 6 Chromosomen (Lehker and Alderete, 1999, Yuh et al., 1997, Zubáčová et al., 2008, Carlton et al., 2007). In 65 Genen finden sich Introns (Carlton et al., 2007). Gleichzeitig besteht das Genom zu 65% aus repetitiven Anteilen (Carlton et al., 2007). Als mögliche Ursache hierfür wird die Transition des Protisten von der Darmgegend in den Urogenitaltrakt diskutiert (Carlton et al., 2007). Da eine Selektion von Nachteil gewesen wäre, kam es zur Genomexpansion, welche vor allem das Kinom betrifft und Gene, die für den Membrantransport verantwortlich sind (Carlton et al., 2007). Bei der Anpassung an die neue Umgebung spielen insbesondere die Gene, die für den Membrantransport kodieren, eine entscheidende Rolle, da die Sekretion pathogener Proteine, Endozytose von Wirtsproteinen, Phagozytose von Bakterien und Wirtszellen von ihnen abhängt (Carlton et al., 2007). Zusätzlich resultiert eine Genomexpansion in einer vergrößerten Zelle. Bezüglich des vergrößerten Zellvolumens werden verschiedene Vorteile diskutiert. So könnte dieses die Kolonisation der vaginalen Schleimhaut erleichtern und so der Adaptation an den Urogenitaltrakt dienen (Carlton et al., 2007, Gregory, 2001). Außerdem könnte es für die Phagozytose von Bakterien (Rendón-Maldonado et al., 1998) und zum Schutz vor Phagozytose durch Wirtsmakrophagen von Vorteil sein (Carlton et al., 2007).

1.2 Trichomoniasis – Medizinische Bedeutung

1.2.1 Epidemiologie

Der Protist *Trichomonas vaginalis* ist der Erreger der Geschlechtskrankheit Trichomoniasis. Mit 110,4 Millionen Erkrankten weltweit ist es die zweithäufigste Geschlechtskrankheit überhaupt (Rowley et al., 2019). Allein im Jahr 2016 erkrankten weltweit schätzungsweise 156 Millionen Menschen an Trichomoniasis (Rowley et al., 2019).

1.2.2 Ätiologie

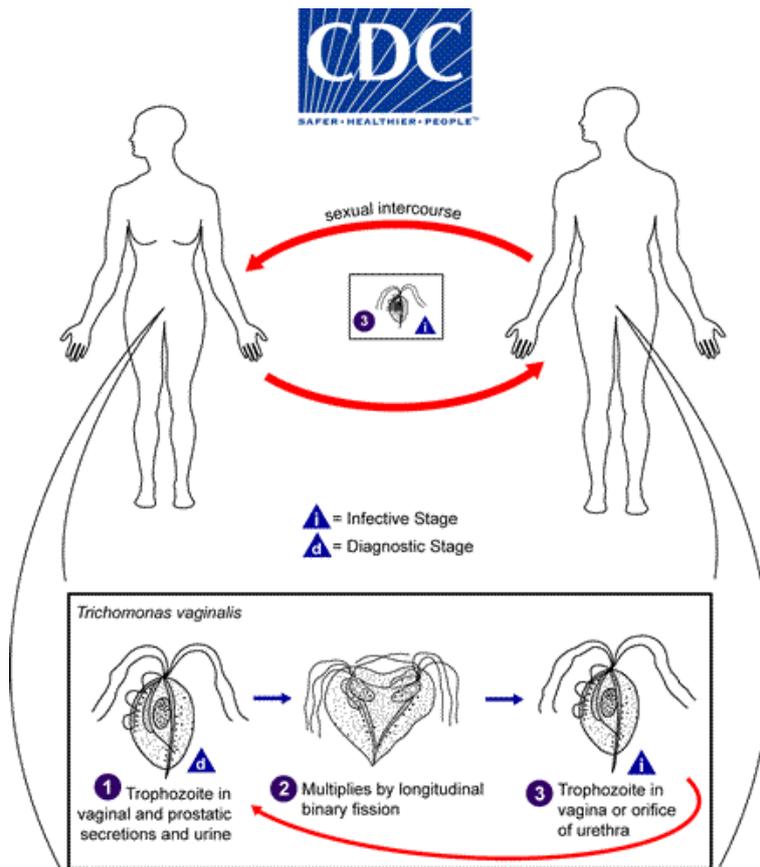


Abbildung 2: Der Lebenszyklus von *Trichomonas vaginalis*

aus www.CDC.gov
Trichomoniasis (online im Internet) URL:

<https://www.cdc.gov/dpdx/trichomoniasis/index.html>

(Stand: 08.01.2020, 17:09)

- 1: Trophozoit im urethralen, prostatischen oder vaginalen Sekret
- 2: Mitose des Trophozoiten durch longitudinale Zellteilung
- 3: Trophozoit in Vagina oder Harnröhre

Die Abbildung zeigt den Lebenszyklus von *Trichomonas vaginalis* in seiner Form als Trophozoit, welche zur mitotischen Teilung befähigt ist (Hirt, 2013, Walochnik and Aspök, 2002). Der Trophozoit findet sich in urethralem, prostatischem und vaginalem Sekret (Catterall and Nicol, 1960). Die Übertragung kann sexuell und perinatal erfolgen (Al-Salihi et al., 1974, Catterall and Nicol, 1960, Crowther, 1962, Trintis et al., 2010). Weiterhin wird eine mögliche nichtsexuelle Übertragung über gemeinschaftlich benutzte Toiletten oder Badetücher diskutiert; hierzu gibt es jedoch bislang unzureichende Evidenz (Adu-Sarkodie, 1995, Crucitti et al., 2011).

1.2.3 Klinik

Bei der großen Mehrheit der Patienten, respektiv 85% der Frauen und 77% der Männer verläuft die Infektion asymptomatisch (Seña et al., 2007, Sutton et al., 2007). Die Inkubationszeit beträgt fünf bis achtundzwanzig Tage (Meites, 2013). Symptomatisch berichten Patientinnen über Ausfluss, brennende Schmerzen, Pruritus und Dysurie

(Kissinger, 2015, Meites, 2013). Akut manifestiert sich die Trichomoniasis mit einer diffusen Vaginitis, Vulvitis und schaumigem, übel riechenden, gelblich bis grünlichem Fluor, sowie mit einer Urethritis (Adegbaju and Morenikeji, 2008, Meites, 2013, Lewis, 2014). Als Komplikationen können Infektionen der Adnexe, des Endometriums und der Bartholin Drüsen auftreten (Kissinger, 2015). Die akute Form kann nach vier Wochen in eine chronische Form übergehen, die exazerbieren kann (Schlüter, 2019). Diese äußert sich mit Pruritus und vaginalem Ausfluss (Adegbaju and Morenikeji, 2008).

Symptomatisch zeigt sich die Infektion bei Männern mit Ausfluss aus Harnröhre und Dysurie (Seña et al., 2007, Weston and Nicol, 1963). Klinisch findet sich eine Urethritis und Prostatitis (Krieger et al., 1993, Lee et al., 2012).

1.2.4 Folgen der Trichomoniasis

Die Erkrankung Trichomoniasis stellt ein erhöhtes Risiko für weitere Erkrankungen dar. Für andere Geschlechtskrankheiten sind folgende Zusammenhänge bekannt: Im Zuge einer Trichomoniasis besteht ein erhöhtes Risiko für eine Neuinfektion mit HIV (Hughes et al., 2012, Laga et al., 1993). Ebenso findet sich eine signifikante Assoziation zwischen dem Vorliegen einer Trichomoniasis und Syphilis, sowie genitaler HSV-1 bzw. HSV-2 Koinfektion (Allsworth et al., 2009). Auch eine Infektion mit Chlamydien ist in der Altersgruppe der 14-25 Jährigen signifikant mit dem gleichzeitigen Vorliegen einer *Trichomonas vaginalis* Infektion assoziiert (Allsworth et al., 2009).

Im Rahmen einer Schwangerschaft hat die Infektion mögliche negative Auswirkungen. So ist die Erkrankung ein Risikofaktor für das Auftreten von Frühgeburten mit und ohne niedrigem Geburtsgewicht, sowie für einen vorzeitigen Blasensprung (Cotch et al., 1997, Mann et al., 2010, Minkoff et al., 1984). Weiterhin ist die Erkrankung signifikant mit einer Reduktion des Gestationsalters und einem verminderten Geburtsgewicht assoziiert (Small for gestational age) (Cotch et al., 1997, Hardy et al., 1984). In weiteren Studien wurde eine Assoziation zwischen Trichomoniasis bei Schwangeren und Auftreten von ADHS oder mentaler Retardierung festgestellt (Mann et al., 2009, Mann and McDermott, 2011). Bei gleichzeitigem Vorliegen einer HIV Infektion und einer Trichomoniasis besteht perinatal ebenso ein erhöhtes Risiko der vertikalen Übertragung von HIV auf das Kind (Gumbo et al., 2010).

Darüber hinaus hat die Erkrankung, Auswirkungen auf die Fertilität. Bei Frauen wurde im Zusammenhang mit Trichomoniasis ein erhöhtes relatives Risiko für eine tubale Infertilität festgestellt (Sherman et al., 1987). Die Auswirkung auf die Fertilität von Männern ist bislang unklar (Fode et al., 2016).

In Bezug auf Neoplasien konnte gezeigt werden, dass die Trichomoniasis signifikant mit dem Auftreten von zervikalen Dysplasien, zervikalen intraepithelialen Neoplasien und dem invasiven Zervixkarzinom assoziiert ist (Frost, 1962, Gram et al., 1992, Thomas, 1973, Viikki, 2000, Zhang and Begg, 1994).

1.2.5 Konventionelle Therapie und Ausblick

Die Therapie der Wahl für Trichomoniasis ist Metronidazol, das zur Gruppe der Nitroimidazole zählt (Wendel and Workowski, 2007). Unabhängig von der klinischen Symptomatik sollten beide Partner therapiert werden, da dies die Reinfektionsrate um das Vierfache reduziert (Lyng and Christensen, 1981, Petrin et al., 1998). Aktuell wurde in 9,6% von untersuchten *Trichomonas vaginalis* Stämmen Resistenzen gegenüber Nitroimidazolen gefunden (Schwebke and Barrientes, 2006). Bei 7-10% der therapierten Patienten kommt es zu Therapieversagen, welches einerseits auf die Resistenz des Krankheitserregers und andererseits auf die Resistenz des Patienten gegenüber der Therapie, zum Beispiel durch Reinfektion, zurück zu führen ist (Alessio and Nyirjesy, 2019, Kissinger et al., 2008, Kissinger, 2015). Die Prävalenz von resistenten Erregern liegt dabei bei 2-5% (Seña et al., 2014, Kissinger, 2015).

1.3 Nomenklatur und Isomerie der Inositolphosphate

Inositolphosphate beruhen auf einem Inositol als Grundgerüst (Michell, 2008). Bei Inosit handelt es sich um ein zyklisches Cyclohexanhexol mit sechs mögliche Phosphorylierungsstellen in Form von Hydroxylgruppen, was in 63 Kombinationsmöglichkeiten für monophosphorylierte InsP_n resultiert (Irvine and Schell, 2001). Hinzu kommt die Möglichkeit der Pyrophosphorylierung, wobei Diphosphoinositolphosphate entstehen. Inositol existiert in 9 Isomerformen, namentlich *cis*-, *epi*-, *allo*-, *D/L-chiro*, *neo*-, *myo*-, *muco*-, *scyllo*-, *dextro*- und *levo*-Inositol. *Cis*-, *epi*-, *allo*-Inositole sind dabei synthetisch hergestellte Isomere (Ballereau et al., 1999, Stockton et al., 2014, Thomas et al., 2016). *Myo*-Inositol ist das am häufigsten vorkommende natürliche Inositol (Agranoff, 1983). Die Bezeichnung der Inositole und Inositolphosphate beruht auf der neuen relaxierten IUPAC Nomenklatur von 1989 (1989b). Diese lässt sich mithilfe der Agranoff-Regel erläutern. Dabei erfolgt die Benennung der D-Phosphoinositide in Analogie zu einer Schildkröte (Agranoff, 1983). Dabei machte sich Agranoff zur Nutze, dass in der Sesselkonformation die 2-Hydroxylgruppe axial steht, wohingegen alle anderen äquatorial ausgerichtet sind. Die 2-Hydroxylgruppe entspricht dem Kopf der Schildkröte und der 2-Position; die rechtsseitige Vorderflosse entspricht der 1-Position (Irvine and Schell, 2001). Die

weitere Nummerierung erfolgt nun gegen den Uhrzeigersinn (Irvine and Schell, 2001). Legt man eine Spiegelebene von der 2-Position zur 5-Position so erleichtert dies außerdem die Identifizierung der D- und L-Konfiguration der sich ergebenden Enantiomere.

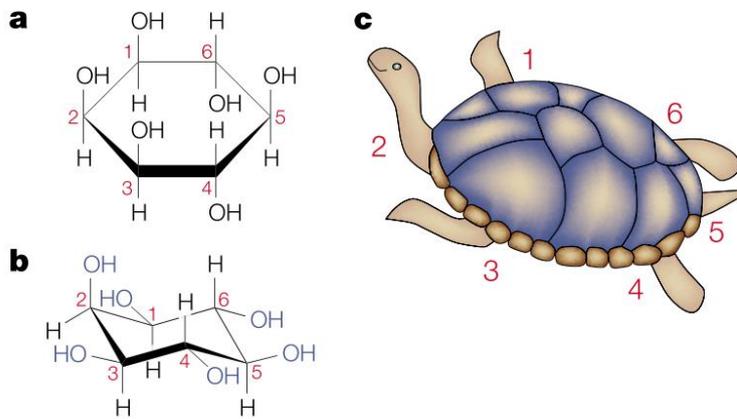


Abbildung 3: Strukturformel von D-myo-Inositol (a) in Harworth Projektion (b) in Sesselkonformation und (c) in Form der „Agranoff-Schildkröte“

Modifiziert nach Irvine, R. F. & Schell, M. J. 2001. Back in the water: the return of the inositol phosphates. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2, 328 Box 1: Nomenclature, structure and enantiomers.

1.4 Metabolismus der Inositolphosphate

Inositolphosphate spielen eine wichtige Rolle bei diversen zellulären Funktionen. Insbesondere sind sie von Bedeutung als second messenger bei der Signaltransduktion, aber auch beim vesikulären Transport, der Zellteilung, der Apoptose, der Genregulation, der DNA Reparatur, Zytoprotektion und in Form von Phosphatidylinositol der Polyphosphoinositide als Membrankonstituenten (Alcázar-Román and Wente, 2008, Duronio, 2008, Gardocki et al., 2005, Michell, 2008, Seeds et al., 2007, Vicinanza et al., 2008, Yancey, 2005). Evolutionär wird diskutiert, dass Archaeen und die Vorfahren der Eukaryoten Schwestertaxen sind, welche von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen (Poole and Penny, 2007). Die Nutzung von Inositolen ist in Archaeen weit verbreitet und bei Eukaryoten allgegenwärtig (Michell, 2008). Nur wenige Bakterien verwenden – mit Ausnahme der Actinobakterien – Inositole oder dessen Derivate. Daher wird davon ausgegangen, dass ein archaealer Kontributor die Synthese und Nutzung von Inositolen in den gemeinsamen Vorfahren der Eukaryoten eingebracht hat (Michell, 2008). Auffällig ist

in diesem Zusammenhang, dass in parasitischen Eukaryoten wie Apicomplexa ein Verlust von Inositolphosphatkinasen, namentlich Inositoltriphosphatkinasen und Inositolpentakisphosphat-2-kinasen beobachtet wurde (Laha et al., 2021).

1.4.1 Monophosphorylierte Inositolphosphate

Bei Eukaryoten sind verschiedene Stoffwechselwege für die Synthese von Inositolderivaten bekannt (Laha et al., 2021). Sie werden in der nachfolgenden Darstellung gezeigt und nachfolgend beschrieben. Die Stoffwechselwege, die ausschließlich Eukaryoten betreffen sind beige unterlegt.

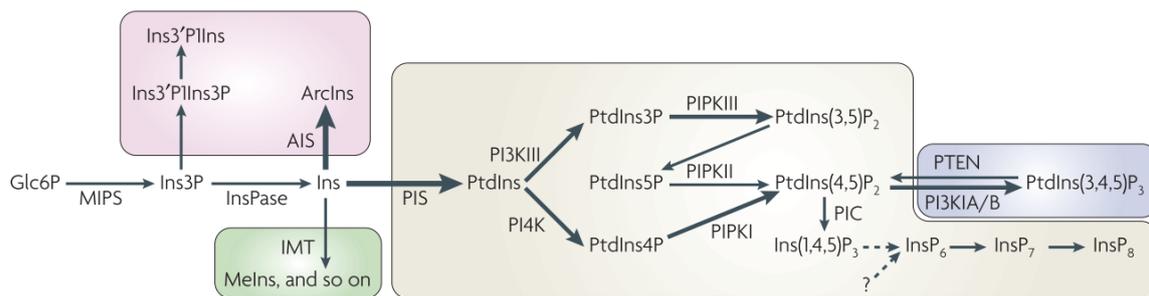


Abbildung 4: Stoffwechselwege für die Synthese von Inositolderivaten

Farbcodierung:

- pink: Stoffwechsel der Archaen
- grün: Stoffwechsel der Pflanzen
- beige: Stoffwechsel der Eukaryoten
- blau: Stoffwechsel der Metazoen
- keine Farbe: Stoffwechsel von Archaen, Pflanzen, Eukaryoten und Metazoen

Abkürzungen:

AIS: Archaetidylinositol Synthase

ArcIns: Archaetidylinositol

Glc6P: Glucose-6-Phosphat

IMT: Inositolmethyltransferase

Ins3'P1Ins: Di-Inositol-1,3-phosphate

Ins3'P1Ins3P: Di-Inositol-1,3-phosphate-1-phosphate

InsPase: Inositolmonophosphatase

MeIns: Methylinositol

MIPS: Inositol3Phosphat Synthase

PI3KIA/B PtdIns(4,5)P₂ 3-Kinase Typ A und B

PI3KIII: PtdIns-3-Kinase

PI4K: PtdIns-4-Kinase
PIC: Phosphoinositidase C
PIPKI: PtdIns4P-5-Kinase
PIPKII: PtdIns5P-4-Kinase
PIPKIII: PtdIns3P-5-Kinase
PIS: PtdIns Synthase
PtdIns: Phosphatidylinositol
PTEN: PtdIns (3,4,5)P₃-3-Phosphatase

aus Michell RH (2008). Inositol derivatives: evolution and functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 9: 153 Fig. 2 Metabolic pathways for the synthesis of inositol derivatives.

Der erste Schritt der Inositolsynthese besteht in der Zyklisierung von D-Glucose-6-Phosphat (Glc6P) zu D-myo-Inositol-3-Phosphat (Ins3P) durch die NAD⁺ abhängige Myo-Inositol-3-Phosphat-Synthase (MIPS) (Majumder et al., 2003, Stieglitz et al., 2005). Anschließend dephosphoryliert die Inositolmonophosphatase Ins3P zu Inositol (Stieglitz et al., 2007). Aus Inositol können Eukaryoten und Eubakterien das Membranlipid Phosphatidylinositol synthetisieren. Hierzu transferiert die Phosphatidylinositolsynthase eine Phosphatidylgruppe eines CDP-Diacylglycerol auf die D1 Gruppe eines Inositols (Gardocki et al., 2005). Phosphatidylinositol ist der Ausgangspunkt für die Synthese von PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ in Eukaryoten. Phosphatidylinositol wird membranständig durch die PtdIns4-Kinase an der 4-Stelle phosphoryliert. PtdIns4P hat verschiedene Funktionen, so ist es zum Beispiel ein Cofaktor beim Transport von den Vorläufern von Glycosphingolipiden durch den Golgi Komplex (D'Angelo et al., 2007). Außerdem ist es Hauptausgangspunkt für die Synthese von PtdIns(4,5)P₂ durch die PtdIns4P-5-Kinase. PtdIns(4,5)P₂ kommen Funktionen bei Signaltransduktion, der Exozytose und der Zellmobilität zu. PtdIns(4,5)P₂ ist wichtig für die intrazelluläre Signaltransduktion, da es Ausgangspunkt der Synthese von InsP₃ ist. Durch Aktivierung von Oberflächenrezeptoren wird die Phospholipase C aktiviert. Folgende Wege sind bekannt:

1. Aktivierung der PLC β durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Rebecchi and Pentylala, 2000)
2. Aktivierung der PLC γ durch Rezeptor-Tyrosinkinasen (Patterson et al., 2005)
3. Aktivierung der PLC ϵ durch GTPasen (Bunney and Katan, 2006)

PLC β werden durch Liganden wie zum Beispiel Metaboliten oder Hormone über G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktiviert. G-Protein gekoppelte Rezeptoren sind heterotrimere Proteine, die aus einer G α -, G β - und G γ -Untereinheit bestehen (Rebecchi and Pentylala, 2000). Letztere bilden einen stabilen Komplex. Im inaktiven Zustand liegt die G α -Untereinheit GDP-gebunden vor. Durch Bindung eines Liganden, wie zum Beispiel Metaboliten oder Hormone kommt es zum Austausch von GDP gegen GTP und die G α -Untereinheit dissoziiert (Exton, 1996, Rebecchi and Pentylala, 2000). Die G β/γ Untereinheit und die G α Untereinheit können PLC β aktivieren (Boyer et al., 1994, Exton, 1996, Hepler et al., 1993, Lee et al., 1992, Wu et al., 1992).

PLC γ wird durch Tyrosinkinase aktiviert. Wachstumsfaktoren, Immunglobuline oder Zytokine binden an die extrazelluläre Domäne der membranständigen Rezeptor-Tyrosinkinase. Anschließend kommt es zur Dimerisierung und Autophosphorylierung der intrazellulär gelegenen Tyrosinkinasedomänen, welche PLC γ aktivieren (Kamat and Carpenter, 1997, Rebecchi and Pentylala, 2000).

PLC ϵ wird wie PLC β ebenfalls durch die G β/γ -Untereinheit oder die G α -Untereinheit aktiviert, aber auch über monomere GTPasen wie Rho und Ras (Harden and Sondek, 2006, Lopez et al., 2001, Wing et al., 2003a, Wing et al., 2003b). Im Besonderen ist außerdem hervorzuheben, dass PLC ϵ vermutlich die Signaltransduktion von heterotrimeren G-Proteinen und monomeren G-Proteinen, wie Rho und Ras, miteinander verknüpft, indem es als Guanin Exchange Factor fungiert (Wing et al., 2003a).

PLC β und PLC γ katalysieren nach ihrer Aktivierung die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphonat zu Inositol-1,4,5-triphosphat und Diacylglycerin (Creba et al., 1983). Letzteres aktiviert die Proteinkinase C. Das InsP $_3$ wiederum führt zur Freisetzung von Ca $^{2+}$ aus dem endoplasmatischen Retikulum und somit zum Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration (Streb et al., 1983).

Das 1,4,5 InsP $_3$ wird in Eukaryoten weiter phosphoryliert (Michell, 2008). Für *Dictyostelium discoideum* konnte sogar gezeigt werden, dass durch sequentielle Phosphorylierung hoch polyphosphorylierte Inositole aus Inositol entstehen (Stephens and Irvine, 1990). Die am häufigsten in Zellen vorkommenden Inositolphosphate sind Ins (1,3,4,5,6)P $_5$ und InsP $_6$ (Irvine and Schell, 2001, Menniti et al., 1993b, Stephens and Irvine, 1990, Stephens et al., 1991). Die Tatsache, dass Eukaryoten zahlreiche Wege zur Synthese von InsP $_6$ entwickelt haben, weist daraufhin, dass InsP $_6$ eine bedeutende Rolle in der Zellfunktion zukommt (Michell, 2008).

Der Stoffwechsel der Inositolphosphate unterscheidet sich bei den verschiedenen Organismen hinsichtlich der Synthesewege und der gebildeten Isomere voneinander. Abbildung 5 fasst die verschiedenen bekannten Stoffwechselweg bei Hefen und Mammalia zusammen.

Zu den Enzymen des Stoffwechselweges gehören die Inositoltriphosphat-3-Kinase (Berridge and Irvine, 1989, Erneux et al., 1992, Takazawa et al., 1991b, Takazawa et al., 1991a), die Inositolpolyphosphatmultikinase (Nalaskowski et al., 2002, Saiardi et al., 1999, Saiardi et al., 2000, Saiardi et al., 2001a), die Inositol-1,3,4-triphosphat-5/6-Kinase (Wilson and Majerus, 1996, Yang and Shears, 2000) und die Inositolpentakisphosphat-2-Kinase (Verbsky et al., 2002, York et al., 1999). Dem gegenüber stehen Inositolpolyphosphatphosphatasen (Ali et al., 1993, Majerus et al., 1999, Nogimori et al., 1991).

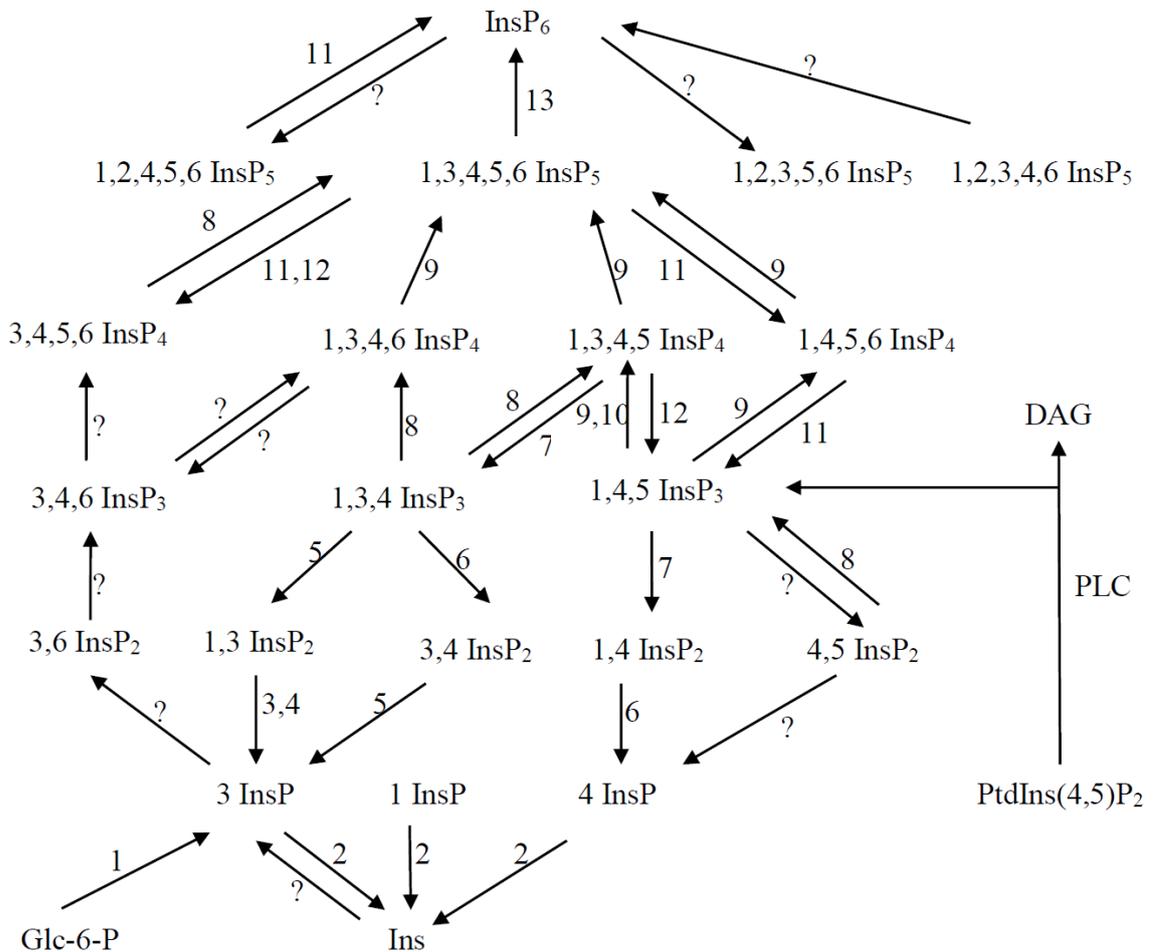


Abbildung 5: Inositolphosphatmetabolismus bis InsP₆

Die Abbildung ist modifiziert nach (Abel et al., 2001, Berridge and Irvine, 1989, Dijken et al., 1996, Eisenberg, 1967, Irvine and Schell, 2001)

- 1: MIPS: Myo-Inositol-3-Phosphat-Synthase
- 2: Inositolmonophosphat-Phosphatase
- 3: Ins(1,3)P₂-3-Phosphatase Typ I
- 4: Ins(1,3)P₂-3-Phosphatase Typ II
- 5: Ins(3,4)P₂/Ins(1,3,4)P₃-4-Phosphatase
- 6: Inositol(1,4)P₂/Ins(1,3,4)P₃-1-Phosphatase
- 7: D-Ins(1,4,5)P₃/D-Ins(1,3,4,5)P₄-5-Phosphatase
- 8: Ins(1,3,4)P₃-5,6-Kinase/Ins(3,4,5,6)P₄-1-Kinase
- 9: Inositol Polyphosphat Multikinase
- 10: Ins(1,4,5)P₃-3-Kinase
- 11: Multiple Inositol Polyphosphat Phosphatase 1
- 12: Phosphatase and tensin homolog
- 13: Ins(1,3,4,5,6)P₅-2-Kinase

1.4.2 Pyrophosphorylierte Inositolphosphate

Durch Pyrophosphorylierung einzelner Positionen des Inositolrings entstehen die energiereichen Diphosphoinositolphosphate. Die Bildung von pyrophosphorylierten Inositolphosphaten wird in Hefen und in Säugetieren durch die Zunahme der zellulären Energieladung angetrieben (Wundenberg and Mayr Georg, 2012). Außerdem tritt sie auf bei einem Mangel an anorganischem Phosphat, bei osmotischem Stress und durch Rezeptor vermittelte Signaltransduktion (Wundenberg and Mayr Georg, 2012). Die energiereichen pyrophosphorylierten Inositolphosphate wurden erstmals in den 1990er Jahren entdeckt (Mayr et al., 1992, Menniti et al., 1993a, Stephens et al., 1993). Bezeichnend war dabei rasche Turnover durch Kinase/Phosphatase Zyklen (Glennon and Shears, 1993, Menniti et al., 1993a). Die meisten bislang identifizierten pyrophosphorylierten Inositolphosphate leiten sich dabei von InsP₆ und 1,3,4,5,6 InsP₅ ab (Wundenberg and Mayr Georg, 2012). Bis dato sind zwei große Klassen von Kinasen, die für die Synthese der pyrophosphorylierten Inositolphosphate zuständig sind und eine Phosphatasegruppe, welche die Pyrophosphatgruppe hydrolysieren kann, bekannt (Wundenberg and Mayr Georg, 2012). Die zuerst entdeckten Kinasen gehören zur Familie der PDKG Kinasen (s. Absatz 1.5). Dabei handelt es sich um die InsP₆ Kinasen mit den Isoformen 1,2 und 3, die in Mammalia gefunden wurden und um die γ InsP₆ Kinase, die in Hefen gefunden wurde (Saiardi et al., 1999, Schell et al., 1999, Voglmaier et al., 1996). Die InsP₆ Kinasen in Mammalia pyrophosphorylieren 1,3,4,5,6 InsP₅ und InsP₆. Die

bevorzugte Phosphorylierungsstellen für 1,3,4,5,6 InsP₅ sind die 1-, 3- und 5-Position (Draškovič et al., 2008). Die bevorzugte Phosphorylierungsstelle für InsP₆ ist die 5-Position (Draškovič et al., 2008, Saiardi et al., 1999, Wundenberg and Mayr Georg, 2012). Bemerkenswert ist darüber hinaus die Fähigkeit der InsP₆ Kinase in Mammalia InsP₇ durch Einführung ein Triphosphatgruppe weiter zu phosphorylieren (Draškovič et al., 2008). Die zweite große Klasse von Kinasen umfasst die Vip1 Kinase in Hefen und die 5PPIP5K1 und PPIP5K2 in Mammalia. Diese Enzyme besitzen die Fähigkeit, InsP₆ und 5-PP-InsP₅ an der 1-Position zu pyrophosphorylieren (Fridy et al., 2007, Lin et al., 2009, Wang et al., 2012). Gegenspieler dieser Kinasen sind Diphosphoinositolpolyphosphat-Phosphohydrolasen. Sie umfassen die humanen DIPP mit den 5 Isoformen 1, 2 α , 2 β , 3 α 3 β und in Hefen die entsprechenden DIPP namens Ddp1 und Aps1 (Hidaka et al., 2002, Leslie et al., 2002, Safrany et al., 1999). All diese Phosphohydrolasen sind Teil der Nudix Hydrolasen Familie und können in Abwesenheit eines Nukleosids Diphosphatgruppen hydrolysieren (McLennan, 2006).

Die bekannten Stoffwechselwege für pyrophosphorylierte Inositolphosphate in Mammalia und Hefen sind in der nachfolgenden Abbildung zusammengefasst.

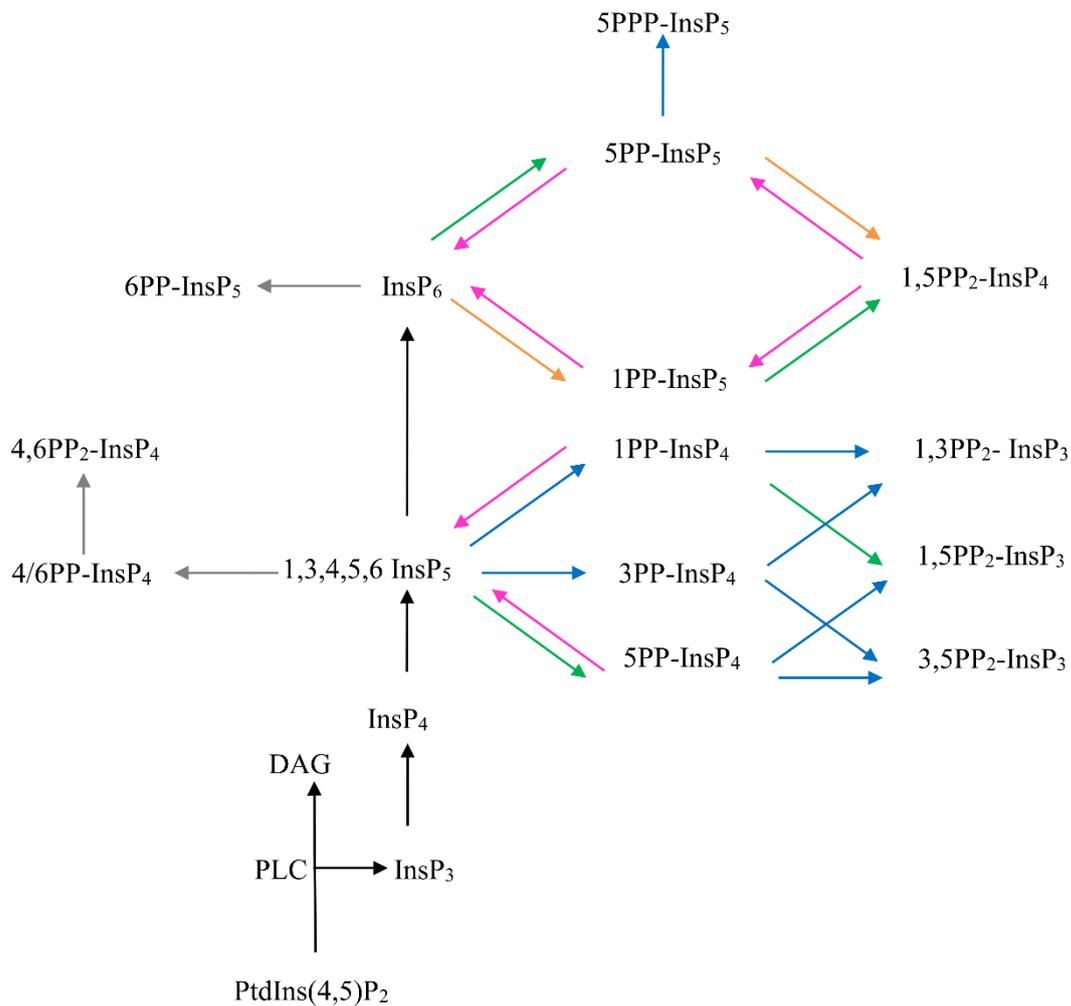


Abbildung 6: Inositolphosphatmetabolismus pyrophosphorylierter Inositolphosphate in Mammalia und Hefen

Die Abbildung ist modifiziert nach (Caffrey et al., 2000, Drašković et al., 2008, Lin et al., 2009, Wang et al., 2012, Wundenberg and Mayr Georg, 2012)

- 1: Inositolhexakisphosphatkinase IP6K; 2. Inositolhexakisphosphatkinase in Hefen yIP6K
- 3: Pyrophosphoinositolpentakisphosphat Kinase: Vip und PPIP5K
- 4: Diphosphoinositol-polyphosphat Phosphohydrolasen: DIPP;
- 5: InsP₅/InsP₆-6-Phosphokinase TvIP6K-1



1.5 Die Familie der PDKG Kinasen

Zu der Familie der PDKG Kinasen gehören die IP6K mit ihren 3 Isoformen, die IPMK und die IP3K A, B und C (Nalaskowski and Mayr, 2004, Saiardi et al., 1999). Den Kinasen gemeinsam sind vier hochkonservierte Aminosäuredomänen, wobei das PDKG Motiv namensgebend ist (Choi et al., 1990, Nalaskowski and Mayr, 2004, Saiardi et al., 1999, Takazawa et al., 1990). Beim PDKG Motiv (**P-C-[VAI]-[ML]-D-X-K-[ML]-G**) handelt es sich um eine Domäne, die eine wichtige Rolle bei der Bindung des Inositolphosphats und des ATPs spielt (Bertsch et al., 2000, Nalaskowski and Mayr, 2004). Bei den anderen drei Motiven handelt es sich um das DFGA-, das GFR (**G-[FV]-R**)- und das SSSL-Motiv (Nalaskowski and Mayr, 2004). Das C-terminale DFGA-Motiv spielt eine wichtige Rolle bei der ATP Bindung (Nalaskowski and Mayr, 2004). Das GFR-Motiv, welches stromabwärts vom PDKG Motiv liegt ist wichtig für die Inositolphosphatbindung (Nalaskowski and Mayr, 2004). Das SSSL-Motiv ist entscheidend für die katalytische Aktivität (Nalaskowski and Mayr, 2004, Saiardi et al., 2001b, Saiardi et al., 2001c). Die nachfolgende Abbildung stellt schematisch die Familie der PDKG Kinasen dar.



Abbildung 7: Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz einer PDKG-Kinase

Die Abbildung ist modifiziert nach (Irvine and Schell, 2001)

1.6 Inositolphosphatkinasen in *Trichomonas vaginalis*

Auf der Basis von Shotgun-Konsensus Sequenzen wurden von Prof. Dr. Mayr DNA Contigs erstellt, sodass Proteinsequenzen putativer Inositolphosphatkinasen vorhergesagt werden, welche alle zur Familie der PDKG Kinasen gehören (s. Abbildung 8) (Carlton et al., 2007, Wundenberg et al., 2019). Namentlich handelt es sich dabei um die 4 Inositolhexakisphosphatkinasen TvIP6K1, TvIP6K2, TvIP6K3 und TvIP6K4, sowie um zwei Inositolphosphatkinasen namens TvIPK1 und TvIPK2 (Wundenberg et al., 2019). Für die TvIP6K1 wurden mehrere Substrate identifiziert, namentlich 1,2,4,5 InsP₄ drei verschiedene InsP₅ – 1,3,4,5,6 InsP₅, 1,2,3,5,6 InsP₅ und 1,2,4,5,6 InsP₅ - sowie InsP₆ (Wundenberg et al., 2019). InsP₆ war dabei das Substrat mit der höchsten Umsatzrate. Interessanterweise ist es auch das in *Trichomonas vaginalis* am häufigsten vorkommende

Inositolphosphat und wird mengenmäßig dicht von PP-InsP₄ gefolgt (Wundenberg et al., 2019). Die Analysen der Substratumsetzung ergaben, dass es sich bei der TvIP6K1 um eine Inositolpenta- und hexakisphosphat-6-Phosphokinase (IP6-6K) handelt, welches in der Lage ist InsP₆, 1,3,4,5,6 InsP₅ und 1,2,3,5,6 InsP₅ an der 6-Position zu pyrophosphorylieren (Wundenberg et al., 2019). Die nachfolgende Tabelle fasst die verschiedenen Reaktionen, welche die TvIP6K1 katalysiert, sowie deren Umsatzraten in einer Übersicht zusammen.

Substrat	Produkte	Spezifische Umsatzrate (nmol/min./mg)
InsP ₆	6PP-InsP ₅	499
1,2,3,5,6 InsP ₅	6PP-InsP ₄	195
1,3,4,5,6 InsP ₅	4/6PP-InsP ₄ → 4,6PP ₂ -InsP ₃	160
1,2,4,5,6 InsP ₅	InsP ₆ → 6PP-InsP ₅	140
1,2,4,5 InsP ₄	1,2,3,4,5 InsP ₅	55

Tabelle 1: Substratanalyse der TvIP6K1

modifiziert nach Wundenberg T. et al. 2019. A novel 6-pyrophosphorylating IP6 kinase (IP6-6K) discovered in the protozoon *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 227, 58, Tab. 1 Initial rates of various inositol phosphates phosphorylated by TvIP6K1.

Somit wurde erstmals eine InsP₅/InsP₆-6-Phosphokinase identifiziert, welche zur Familie der PDKG Familien gehört (Wundenberg et al., 2019). Welche Bedeutung diese pyrophosphorylierten Inositolphosphate für *Trichomonas vaginalis* haben ist noch unklar. Bekannt ist das pyrophosphorylierte Inositolphosphate bei Mammalia und Hefen eine Rolle bei der Apoptose, dem Vesikeltransport, der DNA-Reparatur und dem posttranslationalen Proteinmodifikationen spielen (Laussmann et al., 1996, Pesesse et al., 2004, Thota and Bhandari, 2015, Wundenberg and Mayr, 2012). Weiterhin konnte Gould et al. für orthologe Gene von *Trichomonas vaginalis* beweisen, dass sich deren Expression unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen ändert. So wird die Genexpression von TvIP6K2 und TvIP6K3 bei Sauerstoffexposition heraufreguliert, während TvIP6K4 bei Sauerstoffexposition herunter reguliert wird (Gould et al., 2013). Welche Kinase für die Produktion der beiden vorherrschenden Inositolphosphate, nämlich InsP₆ und PP-InsP₄ zuständig ist, kann nur durch die weitere Charakterisierung der übrigen Inositolphosphatkinasen geklärt werden.

1.7 Zielsetzung

Bei dem humanpathogenen Protozoon *Trichomonas vaginalis* handelt es sich um den Erreger der Trichomoniasis, die weltweit am zweithäufigsten vorkommenden Geschlechtskrankheit. Standardmäßig erfolgt die Therapie dieser Erkrankung mit Nitroimidazolen. Aufgrund zunehmender Resistenzentwicklung gewinnen alternative Behandlungstherapien an Bedeutung.

Die Untersuchung des Inositolphosphat-Stoffwechsels in *Trichomonas vaginalis* und die enzymatische Charakterisierung der hier beteiligten Enzyme können neue Targets für die Behandlung der Trichomoniasis liefern und so zur Entwicklung alternativer Behandlungsmethoden beitragen. Die Proteinsequenzen von sechs Inositolphosphatkinasen wurden durch Prof. Dr. med. Georg Mayr vorhergesagt, indem aus bekannten Shotgun-Konsensus-Sequenzen der Trichomonaden-DNA, DNA Contigs erstellt wurden. Eine exakte Vorhersage, um welche Art von Inositolphosphatkinase es sich handelt und durch welche Substratspezifität diese charakterisiert ist, war damit jedoch nicht möglich. Die Sequenzhomologien außerhalb der unten farblich markierten Konsensusmotive, das sind die kleinen phylogenetisch konservierten Erkennungsmotive aller Inositolphosphatkinasen aus der homologen Gruppe der sogenannten PDKG Kinasen, zu besser untersuchten derartigen Inositolphosphatkinasen waren hierfür zu gering.

Abbildung 8 zeigt die prädizierten Aminosäuresequenzen. Die identifizierten PDKG Motive, SSSL Motive und ATP Bindungsmotive sind aligniert und farblich markiert.

Im Rahmen von vorangegangenen Forschungen in dieser Arbeitsgruppe konnten bereits die Enzyme TvIP6K1 und die TvIPK2 aufgereinigt und charakterisiert werden.

Diese Doktorarbeit hat die Reinigung und Charakterisierung der Enzyme TvIP6K4 und TvIPK1 zum Gegenstand, welche beide Mitglieder der sogenannten PDKG-Familie sind. Eingebettet in diesen wissenschaftlichen Kontext, ist das Ziel dieser Arbeit herauszufinden, für welche Art von Inositolphosphatkinase die entsprechende genomische DNA codiert und durch welche enzymatischen und enzymkinetischen Eigenschaften sich die Proteine auszeichnen. Hierzu erfolgt nach Herstellung geeigneter in bakterielle Expressionsvektoren inklonierter cDNA die rekombinante Proteinexpression und -aufreinigung. Im Anschluss wird die Substratspezifität beider Enzyme untersucht und enzymkinetisch vermessen. Die gewonnen Erkenntnisse können die Basis für zukünftige Hemmstoffscreens bilden und so bei zunehmender Therapieresistenz zur Identifikation neuer Therapieansätze dienen.

```

TvIP6K-1 1 -----ME
TvIP6K-2 1 -----MQ
TvIP6K-3 1 -----MM
TvIP6K-4 1 -----MSLEGMTNQ-----PGPIN
TvIPK-1 1 -----
TvIPK-2 1 -----MT
HsIP6K-2 1 MSPAFRAMDVEPRAKGVLLLEPFVHVQVGGHSCVLRFNETTLCKPLVPREHQFYETLPAEMR

TvIP6K-1 3 SNS-----DSFSS--DLDPLNTQG GGGHGLCKIKNLD-----
TvIP6K-2 3 CDKPSV-----RNEKRD---EVMTLNTQG GGGHGLLVTKNSH-----
TvIP6K-3 3 SDKPQV-----STNSD---EIMTLNTQG GGGHGLLAAKNSR-----
TvIP6K-4 15 D-----KTVLHMDSRNGSEIKRKRFGHETON-FSFNEG-----
TvIPK-1 1 -----MCEIE---FTGALPGQAGGHRIMQCYDKK-----
TvIPK-2 3 S-----RMTLHIDHSQQQLLRSKIFGHDGVI-IPFREG-----
HsIP6K-2 61 KFTPOYKGVSVRFEEDDRNLCLIAAYPLKGDHGIIVDIVDNSDCEPKSKLLRWTTNKKHH

TvIP6K-1 34 -----HGIDCVAKPLFE-HENNFYTIM-----TKTPLAD
TvIP6K-2 37 -----LGIDCVAKPLFK-HENHFYRVM-----SKTPLVE
TvIP6K-3 37 -----LGIDCVAKPLFK-HENHFYRVM-----SKTPLVD
TvIP6K-4 47 -----YFAKIADK-QEVIMYDLFYNKCKGIVKPYLLPK
TvIPK-1 28 -----SSTHCIAKFVDQ-READAYNIL-----QKTPLFP
TvIPK-2 35 -----YIAKCKLIRELKFYKTYVGLSHNILEPELIPS
HsIP6K-2 121 VLETEKTPKDWVRQHRKEEKMKSHKLEEFEWLKK-SEVLYYTVF-----KKNWISS

TvIP6K-1 62 CLPR--F-----FGNTQIDGHEVLLIEDLTAGMTSPCTADLKLK
TvIP6K-2 65 CLPR--Y-----CGKTEYNGNEYLLIEDLTSGMTSPCTADLKLK
TvIP6K-3 65 CLPQ--Y-----CGKTVYNGSEYLLIEDLTAGMTSPCTADLKLK
TvIP6K-4 79 CLGTGYFNEGNTALKSGDPIEVMFTSKMTSEPRDGH PAMIFQADLTHGYEKPCLVDFFKIG
TvIPK-1 56 YVPR--Y-----FGIHNVDCKDWIVIEDLTYGFTSPCVADLKLK
TvIPK-2 68 VEGI--VDDNNVHLSSDD-EVDLEVKRDI EINH KSEP YLMMHDIADGYSRPAVLDVVKLG
HsIP6K-2 172 QLKH--YNPWSM--KCH--QQQLQRMKENAKHRNQYKFI LLENLTSRYEVPCLVLDLKM

TvIP6K-1 99 TRSFEIGVSES KVRKQMNMSKSTTPKYAVRIIDVSMRKGNL-----VNH-WDRNFGK
TvIP6K-2 102 TRSFEIGVPESKQKQLQNMSSKSTTPKYAVRIIDVSLRKGDNV-----VKR-WDRNYGK
TvIP6K-3 102 TRSFEIGVPESKRLKQLQNMSSRSTSPKYAVRVIDVSLRKNNGSI-----VKR-WDRNYGK
TvIP6K-4 139 LRSWRVGSQKKSSTRRNKLYTEPTRTLKYHIRAAMWYSSDEKFYQHDEL CYVERNFQGF
TvIPK-1 93 TRHYDFYSSQAKIDYLVGKQVGSSTNSHGVRVIGINLRKDKQD-----IYV-QDKKQGL
TvIPK-2 125 TRTWALGASKIKRERMKKCSPTSSSEL CVRVRAMWYSRTPDKWPVEENINCVKREWGN
HsIP6K-2 225 TRQHGD DASEEKAANQIRK CQOSTSAVIGVRVCGMQVYQAGSG-----QLMFMNKYHGR

TvIP6K-1 152 KAPIQS FIDTMNKFIPVNR--KQEF LDKVEDVITKLTQTKEIYPGSRRLYSASLLVYDGD
TvIP6K-2 155 KASLNSFIKSMHKFIPANK--KEEFVAKVENVINKLSIAKEMYPGSRRLYSASLLVYDSD
TvIP6K-3 155 KASLNSLIDTLNKFIPVNR--REEFIKVENVINKLTIKEMYPGSRRLYSASLLVYDSD
TvIP6K-4 199 FCTKEELDVMHEFKYYPQI-PTYRKKLEELATAF-QKFHDTIGLRIYSGSVVYVDAA
TvIPK-1 146 KNTAEQFVQSLHTLLEGNL--KDI FHKRLTQIRDAFVEMQKQYPPGFRIYSSILVYDGD
TvIPK-2 185 TCSKSEFLDFLKDFFHYPNQI-PIFVEKLNKLRKTSM-AKMREQFGARMYSSSLVYDGD
HsIP6K-2 279 KLSVQGFKEALFQFFHNGRYLRRELLGPV LKKLTELKAVLERQESYRFYSASLLVYDGD

TvIP6K-1 210 Q-D-----LPIRVAL DFAHAYS DITQCSGK M
TvIP6K-2 213 NNN-----TPMKVAL DFAHAYCDITKSGGKL
TvIP6K-3 213 SPN-----SPMRVVL DFAHAYCDITKSGGKL
TvIP6K-4 257 HP-----EKFDLRF DFAKGFYHLEEI AKKF
TvIPK-1 204 AKEY-----TENVKIML DLAHAYDITKEGADY
TvIPK-2 243 DP-----SKFDCRL DFAKTYLDITKAAKES
HsIP6K-2 339 ERPEVVLDSDAEDLEDLSEESADESAGAYAKPIGASSVDVRM DFAHTTCRLYGEDTV-

TvIP6K-1 236 D--SEEFEDNTILGLRNIHLLTDPTELEKRQI-
TvIP6K-2 240 D--NREFDDNTLLGLRNI VHI FTNPNEIEERSN-
TvIP6K-3 240 D--AREFDDNTLLGLRNI VHI FNSPNEIEERTNL
TvIP6K-4 283 GEPLDACE DYVVEGLRNL SNELGKLLLEQ-----
TvIPK-1 234 N--NHEFDDGVLLGLNHMVEFTK-----
TvIPK-2 269 NESVDECEDSVLPALNSITSMIESLV-----
HsIP6K-2 398 V--HEGQDAGYIFGLQSLIDIVTEISEESGE--

```

Abbildung 8: Sequenzalignment der hsIP6K2 mit 6 prädizierten IPKs aus *Trichomonas vaginalis*

aus Wundenberg T. et al. 2019. A novel 6-pyrophosphorylating IP6 kinase (IP6-6K) discovered in the protozoon *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 227, 54, Fig. 1: Fig. 1. *T. vaginalis* IPKs containing the PDKG signature motif. Amino acid sequences of four *T. vaginalis* IP6Ks, two additional *T. vaginalis* IPKs

and human inositol hexakisphosphate kinase isoform 2 were aligned using the Clustal Omega program [24] (TvIP6K1: XM_001323215/TVAG_410270; TvIP6K2: XM_001312735/TVAG_175750; TvIP6K3: XM_001302263/TVAG_574700; TvIP6K4: XM_001305422/TVAG_344490; TvIPK1: XM_001583627/TVAG_476200; TvIPK2: XM_001294230/TVAG_586240; HsIP6K2: AAH65533).

Blaue Markierung: PDKG Motiv

Grüne Markierung: SSSL Motiv

Okarfarbene Markierung: ATP Bindungsmotiv

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Apparative Ausrüstung

Biophotometer	Eppendorf
Brutschrank	Memmert
Duomax 1030	Heidolph
Electrophoresis Power Supply E835	Consort
Flockeneisbereiter AF 206	Scotsman
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf
HPLC Pumpe S1125	SYKAM
IKA: Vortex Schüttler VF 2	Janke&Kunkel IKA Labortechnik
Incubator Shaker Series 25	New Brunswick Scientific
Kühlschrank	Liebherr Premium
Kühlschrank	Bosch
Kühlschrank Comfort	Liebherr
Laborautoklav ELV 5075	Tuttnauer systec
LaminAir	Heraeus instruments
Megafuge 16R	Thermo Scientific
Mikrowelle	Bosch
MiniQ PC 3.2/3	GE Healthcare Life Sciences
Multiskan FC	Thermo Fisher Scientific
NanoDrop 2000c Spectrophotometer	Thermo Scientific
SPD-10 AV UV/Vis Detector	Shimadzu
pH Meter pH 526 Multi Cal®	WTW
Pipette, Model Reference, 1-10µl	Eppendorf
Pipette, Model Research 0,1-2,5µl	Eppendorf
Pipette, Model Research 20-200µl	Eppendorf
Pipette, Model Research plus 100-1000µl	Eppendorf
Pipette, Model Research plus, 10-100µl	Eppendorf
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte
Reagenzglas Rotator 3025	GFL
Reinstwasseranlage Seralpur PRO 90CN	Seralpur
Sample Injector S5200	SYKAM

SONOPLUS GM 70	Bandelin electronic
SORVALL RC 6 PLUS (SS-34 Rotor)	Thermo
Stoppuhr	ROTH
Thermomixer 5436	Eppendorf
Thermomixer comfort	Eppendorf
Ultraschall Homogenisator UW 70	Bandelin electronic
UV/VIS Spectrometer Lambda 20	Perkin Elmer
UV-Tisch	Bachhofer, Reutlingen
VideoGraphicPrinter UP 860-CE	SONY
Videokamera VarioCam	Phase, Lübeck
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waage BP 2100 S	Sartorius
Waage BP 2215 S	Sartorius
Waage Mettler PM480 Delta Range®	Mettler Toledo
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

BD Plastikpak™ Spritze 1ml	BD
Biosphere® Fil.tip 2,5µl	Sarstedt
Combitips Advanced® 25ml	Eppendorf
Entsorgungsbeutel	ROTH
Eppendorf -Tubes 1,5ml	Sarstedt
Eppendorf-Tubes 2ml	Sarstedt
Falcon Tubes 15ml und 50ml	Sarstedt
Küvetten Polystrole/Polystyrene	Sarstedt
10x4x45mm	
Minisart RC4 Membran	Sartorius
Parafilm® M Laboratory Film	Heathrow Scientific
Pasteur Pipetten Glas 230mm	VWR International
pH-Indikatorpapier	MERCK
Pipettenspitze, 10µl, 1-20µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Sarstedt

2.1.3 Chemikalien

1-Propanol	MERCK
Aktivkohle	MERCK
Albumin bovine fraction V	SERVA
Ammoniumpersulfat	SERVA
Ampicillin	Roche Diagnostics
ATP, Adenosine-5'-triphosphate	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Benzamidin	SIGMA
Bio-Rad Protein Assay Farbstoffkonzentrat	Bio-Rad
Bromphenolblau	MERCK
Chloramphenicol	Calbiochem
Coomassie Brilliant Blue G 250	SERVA
D-Desthiobiotin	iba
D(+)-Glucose	MERCK
Diethyl Ether	Sigma-Aldrich
Difco™ Agar, granulated	BD
DTT	Biomol
Essigsäure	J.T. Baker
Ethanol 99% vergällt	Chemsolute
GeneRuler 1kb DNA ladder	Thermo Scientific
Glycerin	MERCK
Glycin	ROTH
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	Roche Diagnostics
HABA	Sigma-Aldrich
HCl	MERCK
Hepes, ultra pure	biomol
Hexokinase	Roche Diagnostics
IPTG, doxane-free 5g	Thermo Scientific
Kaliumchlorid	MERCK
Kanamycin sulfate 25g	SERVA
LB Medium (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH
Methanol	J.T. Baker
Natriumacetat	J.T. Baker
NaOH	J.T. Baker

P11 Cellulose Phosphate	Whatman
Phosphoenol-Pyruvat	Roche Diagnostics GmbH
PMSF	Sigma-Aldrich
Rotiphorese® Gel 30	ROTH
SDS/Natriumlaurylsulfat	ROTH
Strep Tactin® Macro Prep 50% Suspension	Iba
Suprapur® Natriumfluorid	MERCK
TEMED	Sigma-Aldrich
Tetrazyklin	Boehringer
Titriplex III	MERCK
Titripur® Salzsäure	MERCK
Trichloressigsäure	MERCK
Triethanolamin	Sigma-Aldrich
Triton X-100	SIGMA
Trizma® base	SIGMA
β-Mercaptoethanol	MERCK
Yttrium(III) chloride hexahydrate	Sigma Aldrich

2.1.4 Kit

Amersham™ LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis	GE Healthcare
Nucleo spin®Gel and PCR clean-up	Macherey-Nagel
Nucleo spin®Plasmid (noLid)	Macherey-Nagel

2.1.5 Plasmide

Bezeichnung	Resistenz
TvIPK-1	AmpR
TvIP6K4	AmpR

2.1.6 Primer

Die Primer wurden von der Firma Eurofins Genomics bezogen.

Primer für die Sequenzierung der Inserts im psK-Vektor:

T7_pro_for: 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAGG 3'

T7_term_rev: 5'GCT AGT TAT TGC TCA GCG 3'

2.1.7 Bakterienstämme

Stamm für die Klonierung: E. coli K12 XL1 Blue Stämme

Stamm für die Proteinexpression: E. coli BL 12 (D3) pLysS pREP4

2.1.8 Enzyme

2.1.8.1 Restriktionsenzyme

T4-DNA-Ligase	Macherey-Nagel
NCO1: 10 U/ μ l, 500U	ThermoScientific
XHO1: 10 U/ μ l, 2000U	Fermentas

2.1.8.2 Enzyme für den optischen Test

Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	in	Roche Diagnostics GmbH
3,2 M Ammoniumsulfatlösung		
Hexokinase	in	3,2 M Roche Diagnostics GmbH
Ammoniumsulfatlösung		
Laktatdehydrogenase	in	3,2 M Roche Diagnostics GmbH
Ammoniumsulfatlösung		
NADH, disodium salt		Roche Diagnostics GmbH

2.1.9 Puffer und Lösungen

Coomassie Entfärbelösung	8% Essigsäure
	25% Ethanol
	67% dH ₂ O
Coomassie Färbelösung	0,5% Coomassie brilliant blue
	9% Essigsäure
	45% Ethanol
	45,5% dH ₂ O
Eluent A	0,2mM HCl
	15 μ M YCl ₃
Eluent B	500mM HCl
	15 μ M YCl ₃
HPLC Puffer	2mM NaCl
	2mM Na-Acetat
	pH 6,0

Lämmli-Puffer	25mM Tris/HCl 192mM Glycin 0,1% SDS
LB Medium	10g Trypton, 10g NaCl, 5g Hefeextrakt werden mit dH ₂ O auf 1000ml aufgefüllt; Ziel-pH 7,0-7,2; sie werden 20min. bei 121°C autoklaviert
Nachsäulenreagenz	1,6M Triethanolamin 300µM PAR pH 9,0 mit NaOH eingestellt
Probenpuffer 4x	0,2 M Tris-Cl, pH 6,8 5,4% β-Mercaptoethanol 0,04% Bromphenolblau 8,8% SDS 15% Glycerin
Puffer A	25mM Hepes 1mM EDTA 2mM DTT 0,1% Triton X-100 pH 7,5
Puffer E	50mM Hepes 1mM EDTA pH 7,5
RF I	100mM RbCl 50mM MnCl ₂ 30mM Kaliumacetat 10mM CaCl ₂ 15% Glycerin pH mit Essigsäure auf 5,8 eingestellt bei 4°C gelagert
RF II	10mM MOPS 10mM RbCl 75mM CaCl ₂ 15% Glycerin

	pH mit NaOH auf 6,8 eingestellt bei 4°C lagern
Sammelgelpuffer 4x	0,5M Tris/HCl pH 6,8 0,4% SDS
Trenngelpuffer 4x	1,5M Tris/HCl pH 8,8 0,4% SDS
Strep-Waschpuffer WH 500	100mM HEPES pH 8,0, pH mit NaOH eingestellt 500mM NaCl 1mM DTT 1mM EDTA 0,1% Triton X-100
Strep-Elutionspuffer Est	10ml WH 500 5,35mg Desthiobiotin
Strep-Regenerationspuffer	50 mM HEPES pH 8,0, pH mit NaOH eingestellt 1 mM EDTA 500 mM NaCl 1 mM HABA

2.1.9.1 Puffer für Restriktionsenzyme

10x y ⁺ Puffer („Tango“)	Fermentas
10x Ligationspuffer	50mM Tris/HCl pH7,8; 10mM MgCl ₂ ; 10mM DTT; 1mM ATP, 25µ/ml BSA (w/v)

2.1.9.2 Puffer für Agarose-Gelelektrophorese

Produkt		Hersteller
TAE Puffer	40mM Tris/Acetat 2mM EDTA, pH 8,3	SERVA Elektrophoresis GmbH Heidelberg
6x DNA Loading Dye 1ml	30 % Glycerol in H ₂ O 0,1 % Bromphenolblau	Fermentas
6x DNA Loading Dye 1ml	30 % Glycerol in H ₂ O 0,1 % Bromphenolblau	ThermoScientific

2.1.10 Inositolphosphate

Die notierten Inositolphosphate sind in der relaxed IUPAC Nomenklatur niedergeschrieben.

Inositolphosphat	Hersteller
1,4 InsP ₂	Sigma
4,5 InsP ₂	Dr. Hongying Lin
1,2,5 InsP ₃	Prof. G.W. Mayr
1,2,6 InsP ₃	Biozol
1,3,4 InsP ₃	Alexis
1,4,5 InsP ₃	Buchem
1,4,6 InsP ₃	Novartis
2,4,5 InsP ₃	Prof. G.W. Mayr
3,4,6 InsP ₃	Sichem
1,2,3,4 InsP ₄	Alexis
1,2,3,5 InsP ₄	Novartis
1,2,3,6 InsP ₄	Alexis
D/L 1,2,4,5 InsP ₄	Prof. G.W. Mayr
D/L 1,2,4,6 InsP ₄	Prof. G.W. Mayr
D/L 1,2,5,6 InsP ₄	Prof. G.W. Mayr
m-1,3,4,5 InsP ₄	Novartis
1,3,4,6 InsP ₄	Buchem
1,3,5,6 InsP ₄	Alexis
1,4,5,6 InsP ₄	Sichem
m-2,4,5,6 InsP ₄	Prof. G.W. Mayr
3,4,5,6 InsP ₄	Alexis
1,2,3,5,6 InsP ₅	Sichem
1,2,3,4,5 InsP ₅	Sichem
m-1,2,3,4,6 InsP ₅	Sichem
1,2,4,5,6 InsP ₅	Sichem
m-1,3,4,5,6 InsP ₅	Prof. G.W. Mayr
2,3,4,5,6 InsP ₅	Sichem
InsP ₆	Calbiochemie
Hs5PP-InsP ₅	Werner Fanick

Tvx5PP-InsP ₅	Werner Fanick
Phytinsäurehydrolysat	Dr. Hongying Lin
InsP ₇ Standard	Dr. Hongying Lin

2.2 Software

Programm	Hersteller
BioEdit	Tom Hall
Lambda 20 Software	Perkin Elmer
Microsoft Office Word	Microsoft
Microsoft Office Excel	Microsoft
GraphPad Prism	GraphPad Software

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Resolubilisierung von Vektoren

Den gefriergetrockneten/lyophilisierten Vektoren wird 10µl destilliertem H₂O zugesetzt. Anschließend werden sie 10 Minuten lang bei 37° erhitzt und maximal 1 Minute bei 13000rpm zentrifugiert.

2.3.2 Präparativer Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen besitzen die Fähigkeit DNA an spezifischen Erkennungssequenzen zu spalten. Hierbei handelt es sich um kurze vier bis acht Nukleotid große DNA-Sequenzen, welche häufig palindromisch angeordnet sind. In der Folge entstehen glatte oder kohäsive überlappende Enden (Mülhardt, 2013).

Unter Ausnutzung dieser kohäsiven Enden werden das DNA-Insert der TvIPK-1 bzw. der TvIP6K4 aus dem Klonierungsvektor pEX-A2 in den Expressionsvektor, einen psK-Vektor, ligiert. Der psk-Vektor liegt als DNA-Strang mit dem Insert AtIMPkcc2 vor, sodass er zur Extraktion des psk-Vektors ebenfalls dem präparativem Restriktionsverdau zugeführt wird.

Der Restriktionsverdau wird mit den beiden Enzymen NCO1 und XHO1 durchgeführt. Dabei werden für 1µg DNA 10 Units der jeweiligen Restriktionsendonukleasen eingesetzt. Die Ansätze werden nach dem nachfolgenden Schema angesetzt und eine Stunde lang bei 37°C inkubiert.

Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
4µl dH ₂ O	4µl dH ₂ O	4µl dH ₂ O
10µl psk-AtIMPKCC2	10µl pEX-A2-TvIPK-1	10µl pEX-A2-TvIP6K-4
4µl 10x y ⁺ Puffer („Tango“)	4µl 10x y ⁺ Puffer („Tango“)	4µl 10x y ⁺ Puffer („Tango“)
1µl NCO1	1µl NCO1	1µl NCO1
1µl XHO1	1µl XHO1	1µl XHO1

Tabelle 2: Ansätze für den präparativen Restriktionsverdau

2.3.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarose ermöglicht es DNA-Fragmente anhand ihrer Größe aufzutrennen. Das Agarosegel bildet ein poröses 3D Netzwerk. Die Auftrennung der DNA-Fragmente beruht darauf, dass große DNA-Fragmente im elektrischen Feld langsamer wandern als kleine, da die Poren der Agarose ihnen einen höheren Widerstand bieten. Ein weiterer Faktor für das Verhalten der DNA-Fragmente ist die Agarosekonzentration des Gels. Je höher diese ist, desto kleiner die gebildeten Poren und desto besser die Trennschärfe für kleine DNA-Fragmente und umgekehrt (Mülhardt, 2013). Ein DNA Marker mit Fragmenten bekannter Größe ermöglicht es die Größe der DNA-Fragmente der eigenen Proben abzuschätzen.

Es werden sowohl eine präparative als auch eine analytische Gelelektrophorese durchgeführt. Für die präparative Gelelektrophorese wird ein 1,2%iges und für die analytische Gelelektrophorese ein 1,6%iges Gel verwendet. 55ml 1xTAE-Puffer werden zusammen mit der 0,6g bzw. mit 0,8g Agarose aufgekocht bis die Agarose gelöst ist. Nach einer kurzen Abkühlungsphase werden 1,5µg (10mg/ml) Ethidiumbromid hinzugefügt. Das Gel wird in eine Gelkammer mit Gelschlitten gegossen, in der es eine Stunde lang aushärtet. Im Anschluss wird das Gel in die Elektrophoresekammer eingebracht und mit 1xTAE Puffer bedeckt. Nachdem die DNA Proben mit 6x Loading Dye versetzt wurden, werden diese nun in die dafür vorgesehenen Taschen gegeben. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt eine Stunde lang bei einer Spannung von 80V. Die DNA-Banden werden unter UV-Licht sichtbar gemacht und abfotografiert.

2.3.3.1 Präparative Gelelektrophorese

Beim präparativen Ansatz werden die relevanten Banden mittels Skalpell ausgeschnitten, abgewogen und für die nachfolgende DNA-Extraktion verwendet.

2.3.4 DNA-Extraktion aus dem präparativen Agarosegel

Die DNA-Extraktion aus dem Agarosegel erfolgt mit dem NucleoSpin®Gel and PCR Clean up Kit von Marcherey und Nagel nach Anweisungen des Herstellers. Hierbei macht

man sich zu Nutze, dass DNA in Anwesenheit chaotroper Substanzen, wie zum Beispiel Guanidiniumthiocyanat, an Silikatmembranen bindet. Von diesen kann es nach einem Waschschrift mit einem Hoch-Salz-Ethanol-Gemisch mithilfe von Lösungen mit geringer Salzkonzentration wieder eluiert werden (Mülhardt, 2013).

Zunächst werden die DNA-Banden mittels UV Licht sichtbar gemacht und mit einem Skalpell aus dem Agarose Gel ausgeschnitten. Dieser Arbeitsschritt wird schnellstmöglich durchgeführt, um das Risiko eines DNA-Schadens, wie zum Beispiel die Entstehung von Strangbrüchen durch das UV-Licht, zu minimieren. Die Gelprobe, welche die gewünschte DNA enthält, wird mit 200µl NTI Puffer (Guanidiniumthiocyanat) gemischt, für 5-10 Minuten bei 50°C erhitzt und alle 2 Minuten gevortext, bis die Agarose vollständig aufgelöst ist. Anschließend wird eine Nucleo Spin Gel Column in ein Tube eingebracht, welche eine Silikatmembran enthält. Nun werden 700µl der Probe hinzupipettiert und für 1 Minute bei 13000rpm zentrifugiert. Die DNA bleibt an der Silikatmembran gebunden. Der Durchfluss wird verworfen. Anschließend wird die Silikatmembran mit NT3 Waschpuffer gewaschen, um die DNA von Kontaminationen zu befreien. Vorab wird dabei das Waschpufferkonzentrat vorbereitet, indem zu einem Teil Waschpuffer 4 Teile Ethanol zugesetzt werden. 700µl dieses Waschpuffers werden verwendet. Danach erfolgt die Zentrifugation erneut für 1 Minute bei 13000rpm. Der Durchfluss wird verworfen. Dieser Schritt wird insgesamt zweimal durchgeführt.

Um den zugefügten Waschpuffer komplett zu entfernen, wird das Tube mit der Silikatmembran erneut für 1 Minute bei 13000rpm zentrifugiert. Um sicherzustellen, dass eventuell verbliebenes Ethanol entfernt wird, wird das Tube für 2 bis 5 Minuten bei 70° inkubiert. Um die DNA zu eluieren wird NE Puffer verwendet (Tris/HCl pH 8,5), welcher auf 70°C erhitzt wird. Anschließend werden 30µl NE Puffer auf die Silikatmembran gegeben und für 5 Minuten inkubiert. Danach erfolgt die Zentrifugation zunächst bei 30-50g für 1 Minute und dann für die Dauer von 1 Minute bei 13000rpm. Dieser Schritt wird insgesamt dreimal durchgeführt.

2.3.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Mithilfe der von DNA Ligasen können DNA-Fragmente miteinander verknüpft werden. Das entscheidende Enzym hierbei ist die T4 Ligase, welche unter ATP Verbrauch die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem freien 5'-Phosphatende und dem 3'-Hydroxyende zweier DNA-Stränge katalysiert (Lehman, 1974).

Nach dem präparativen Restriktionsverdau (2.1.2) und der DNA Extraktion aus dem Agarosegel (2.1.3) liegen die zu ligierenden DNA Fragmente, namentlich der psk-

Expressionvektor und die gewünschten DNA-Inserts der TvIPK-1 bzw. der TvIP6K4 vor. Die Ligation des TvIPK-1 Inserts und des TvIP6K4 Inserts in den psk-Expressionsvektor erfolgt nun mittels T4 Ligase. Als Kontrolle wird eine Religation ohne DNA-Insert angesetzt. Der Ansatz erfolgt entsprechend der nachfolgenden Schemas, wobei die DNA-Inserts bzw. im Fall der Religationskontrolle das H₂O im Verhältnis 3:1 mit dem psK-Vektor angesetzt werden. Die Ansätze werden über Nacht bei 15°C inkubiert.

psK-TvIPK-1	psK-TvIP6K4	Religationskontrolle
5µl Insert	5µl Insert	5µl dH ₂ O
3µl psk-Vektor	3µl psk-Vektor	3µl psk-Vektor
1µl 10x Ligationspuffer	1µl 10x Ligationspuffer	1µl 10x Ligationspuffer
1µl T4 Ligase	1µl T4 Ligase	1µl T4 Ligase

Tabelle 3: Ansätze zur Ligation der DNA Fragmente

2.3.6 Extraktion der Plasmid-DNA aus den transformierten E.colis (Mini-Präparation)

Die Extraktion der Plasmid DNA aus den transformierten E.coli K11 Stämmen erfolgt mithilfe des Nucleo spin®Plasmid Kit (noLid) von Marcherey und Nagel.

Das Grundprinzip welches dabei genutzt wird ist die alkalische Lyse. Hierbei macht man sich zur Nutze, dass die zirkuläre Plasmid DNA bis zu einem pH Wert von circa 12,3 intakt bleibt, während die chromosomale DNA denaturiert (Bimboim and Doly, 1979, Jansz et al., 1966).

Zunächst wird mithilfe eines mit der Plasmid DNA transformierten Klons eine Über-Nacht Kultur angefertigt (s. 2.4.3). 1,5 ml dieser Über-Nacht Kultur werden entnommen und für 1 Minute bei 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird anschließend verworfen. Das verbleibende Pellet wird mit 250µl A1 Puffer resuspendiert. Zur alkalischen Zelllyse werden 250µl A2 Puffer hinzugegeben und das Tube vorsichtig mehrfach invertiert. Nun erfolgt die Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur, bis das Lysat klar erscheint. Danach werden 600µl A3 Puffer, welcher Guanidinhydrochlorid enthält, hinzugegeben und das Tube erneut vorsichtig invertiert.

Abweichend vom Protokoll wurde die DNA nicht mit 50µl TE Puffer von der Säule eluiert, sondern mit 30µl H₂O.

2.3.7 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration und Reinheit der aus den E. coli Stämmen isolierten Nukleinsäuren wird photometrisch durch die Messung der optischen Dichte bestimmt. Die Messungen erfolgten mittels NanoDrop bei einer Wellenlänge von 260nm und 280nm.

Mithilfe der OD_{260} kann die DNA-Konzentration bestimmt werden. Anhand des Verhältnisses $OD_{260/280}$ wird die Probe auf die Kontamination mit Proteinen überprüft. Eine proteinfreie Probe weist eine $OD_{260/280}$ von 1,8-2,0 auf.

2.3.8 Analytischer Restriktionsverdau der ligierten Plasmide

Zur Überprüfung der korrekten Ligation wird jeweils 1µg DNA durch die Enzyme NCO1 und XHO1 verdaut. Die Ansätze werden dann eine Stunde lang bei 37°C inkubiert und anschließend mittels analytischer Gelelektrophorese auf einem 1,6%igem Agarosegel überprüft (s.2.3.3.).

Ansatz TvIPK-1	Ansatz TvIP6K4
1µg psk-TvIPK-1 DNA	1µg psk-TvIP6K4 DNA
4µl y ⁺ Puffer (10x) ("Tango")	4µl y ⁺ Puffer (10x) ("Tango")
1µl NCO1	1µl NCO1
1µl XHO1	1µl XHO1
mit dH ₂ O auf 20µl V _{ges} auffüllen	mit dH ₂ O auf 20µl V _{ges} auffüllen

Tabelle 4: Ansatz für den analytischen Restriktionsverdau

2.3.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen werden von SEQLAB Sequence Laboratories in Göttingen durchgeführt.

Hierbei wird ein T7 forward Primer verwendet. 1,2µg DNA, 3µl Primer in 1:10 Verdünnung werden zusammen mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 15µl aufgefüllt. Die Ergebnisse der Sequenzierung werden mit der Software BioEdit ausgewertet.

2.4 Mikrobiologische Methoden

2.4.1 Sterilisation von Gebrauchsmaterial

Alle hitzestabilen Materialien werden bei 121°C und 1,2 bar autoklaviert. Die Arbeitsflächen, sowie die benutzten Geräte werden mittels Sprühdesinfektion mit 70%igem Ethanol desinfiziert.

2.4.2 Herstellung von Agarplatten

0,5l LB Medium und 7,5g Agar werden für 20 min. bei 121°C autoklaviert. Nachdem Autoklavieren wird ein handwarmer Ansatz in der Sterilwerkbank in Petrischalen ausgegossen

Dem oben beschriebenen Ansatz aus LB Medium und Agar werden nach dem Autoklavieren Ampicillin (100mg/ml), Kanamycin (50mg/ml) und Chloramphenicol (34mg/ml) im Verhältnis 1:1000 hinzugefügt. Dann werden die Platten unter der Hood ausgegossen und nachdem sie ausgehärtet sind, im Kühlraum gelagert.

2.4.3 Herstellung von transformationskompetenten Escherichia coli

Die Herstellung transformationskompetenter E. coli erfolgt nach der RbCl₂ Methode (Hanahan, 1983, Green and Rogers, 2013).

Zunächst wird eine Übernachtskultur vorbereitet. Hierzu werden 5ml LB Medium mit einem Antibiotikum in der Endkonzentration 20µg/ml vorbereitet. Das Antibiotikum wird entsprechend der natürlichen Antibiotikaresistenz des E.coli Stammes gewählt. Für die E.coli XL1 Blue Zellen wird Tetrazyklin verwendet. Im Falle der E.coli BL21 (DE3) plysS pREP 4 Zellen wird Chloramphenicol verwendet. Aus einer bei -80°C gelagerten Zellsuspension mit chemokompetenten E.coli werden 10µl entnommen. Mit diesen wird die Übernachtskultur angeimpft.

Am Folgetag werden 500µl dieser Vorkultur die Hauptkultur angeimpft, welche das entsprechende Antibiotikum in der Endkonzentration von 20µg/µl enthält. Die Inkubation der Hauptkultur erfolgt bei 37°C und 250 rpm im Schüttelinkubator. Wenn eine OD_{600nm} von 0,6 erreicht ist, wird die Hauptkultur für 15 Minuten auf Eis gestellt.

Im Anschluss wird die Hauptkultur für 15 Minuten bei 4°C und 2000rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das verbleibende Zellpellet in 16,7ml RFI vorsichtig resuspendiert. Die Suspension wird anschließend 15 Minuten auf Eis gestellt. Danach werden die Zellen erneut bei 4°C und 2000rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird erneut verworfen und die Zellen werden mit 4ml kalter RF2 Lösung resuspendiert. Erneut wird die Suspension für 15 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend werden die Zellen in Aliquots à 100µl aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen werden bei -80°C gelagert.

2.4.4 Transformation der E.coli

Bei der Hitzeschocktransformation wird vektorielle Fremd-DNA in E.coli Stämme eingeschleust (Froger and Hall, 2007).

Die bei -80°C in Stickstoff gelagerten chemokompetenten E.coli Stämme werden auf Eis aufgetaut. Die über Nacht inkubierten Ligate (s. 2.3.5) bzw. 60ng der zu transformierenden Plasmid-DNA werden hinzupipettiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgt die Hitzeschocktransformation bei 42°C für 1 Minute und die sofortige zweiminütige Kühlung auf Eis. Nach Zugabe von 900 μl LB-Medium wird der Ansatz im Schüttelinkubator bei 350rpm und 37°C eine Stunde lang inkubiert. Unter der Hood werden zwei Agarplatten mit entsprechenden Selektionsmedien für die Plasmide vorbereitet. Nach erfolgter Inkubation werden auf die erste Agarplatte 900 μl und auf die zweite Agarplatte 100 μl des Inkubationsansatz unter der Hood ausplattiert. Über einen Zeitraum von 35 Minuten werden die Agarplatte alle 5 Minuten geschwenkt, damit sich der Ansatz gleichmäßig verteilt. Anschließend werden die Agarplatten 17 Stunden lang bei 37°C im Inkubator gelagert. Die Lagerung erfolgte nach Verschluss der Agarplatten mit Parafilm bei -4°C über einen Zeitraum von maximal vier Wochen.

2.4.5 Verdünnungsausstrich der transformierten E.coli Stämme

Aufgrund des dichten Wachstums der Klone, erfolgt ein Verdünnungsausstrich unter der sterilen Hood. Hierfür wird die Impföse in der Flamme des Bunsenbrenners ausgeglüht. Sobald die Impföse abgekühlt ist, wird von der Ausgangsplatte ein Klon entnommen und mittels des 13 Strichverfahrens verteilt. Nach Ausstrich Nummer 3,6 und 9, sowie nach Beendigung des Verdünnungsausstrichs wird die Impföse ausgeglüht.

2.4.6 Herstellung einer Über-Nacht-Kultur

Für die Herstellung einer Vorkultur werden zwei verschiedene Protokolle verwendet.

Für Klone des E.coli x11 blue Stammes wird für die Herstellung der Vorkultur zu 5ml LB Medium, 5 μl Ampicillin 100mg/ml pipettiert. Für Klone des in E.coli BL21 (DE3) pLysS pREP4 Stammes wird für die Herstellung der Vorkultur zu 5ml LB Medium 5 μl Ampicillin 100mg/ml, 5 μl Chloramphenicol 34mg/ml und 5 μl Kanamycin 50mg/ml pipettiert. Im Anschluss wird ein einzelner Klon gepickt und die entsprechende Pipettenspitze in den oben beschriebenen Ansatz eingebracht. Die anschließende Inkubation erfolgt über Nacht bei 37°C und 250rpm.

2.4.7 Bakterielle Expression der TvIPK-1

Die bakterielle Expression der beiden Enzyme erfolgt in E.coli BL21 (DE3) pLysS pREP4 Stämmen. Das Genom des BL21 (DE3) pLysS pREP4 Stammes ist gentechnisch verändert und kodiert daher für eine T7 Polymerase, deren Expression der Kontrolle des lac Operons unterliegt (Gopal and Kumar, 2013). Der Expressionsvektor psk wird ebenfalls von einem

lac Operon kontrolliert. Über das pREP4 Plasmid wird ein Lac Repressor kodiert, welcher den lac Promotor besetzt und die Bindung der E.coli Polymerase verhindert, sodass die T7 Polymerase nicht transkribiert wird und somit die Expression des Zielproteins verhindert (Dubendorf and Studier, 1991, Giordano et al., 1989, Jacob and Monod, 1961, Johnsrud, 1978). Kommt es zu einer geringen basalen Expression der T7 Polymerase, wird die Expression des Zielproteins durch den lac Repressor verhindert. Zusätzlich kodiert der genutzte E.coli Stamm für Lysozym. Das Lysozym formt einen Komplex mit der T7 Polymerase und inhibiert so die Transkription (Moffatt and Studier, 1987, Zhang and Studier, 1997). Außerdem verringert es die basale Aktivität der T7 Polymerase, ohne dabei die Expression des Zielproteins zu reduzieren (Studier, 1991).

Unter Zugabe des Lactosederivats IPTG kann die Proteinexpression induziert werden (Sanders, 1974). Dieser bindet an den lac Repressor und bewirkt eine Konformationsänderung desselben, sodass dieser die DNA freigibt. Diese E.coli Bakterien werden wie in Punkt 2.4.4 beschrieben mit dem gewünschten Plasmid transformiert. Nach erfolgreicher Transformation werden 2 Klone gepickt und zwei Über-Nacht-Kulturen mit den Selektionsmedien Kanamycin, Chloramphenicol und Ampicillin angesetzt. Ebenso werden zwei Erlenmeyer Kolben mit 250ml LB-Medium, 2,5ml Glucose (20%) und 250µl Ampicillin (100mg/ml) vorbereitet und bei 37°C gelagert. Am Folgetag wird zunächst die OD₆₀₀ des Ansatzes im Kolben bestimmt. Als Nullwert wird dabei einfaches LB-Medium verwendet. Anschließend wird in jeden Kolben 2,5ml der Über-Nacht-Kultur gegeben und bei 37°C mit 250rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Sobald eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht ist, wird mit IPTG in einer Endkonzentration von 1mM induziert und für weitere drei Stunden bei 37°C und 250rpm inkubiert. Vor Induktion mit IPTG, sowie 1, 2 und 3 h nach Induktion mit IPTG wird je 1ml aus dem Kolben als Expressionskontrolle zur Auswertung mittels SDS-PAGE Gel entnommen (IPTG0-3). Diese werden bei 13000rpm 30s lang abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet bis zum Auftrag auf das SDS-PAGE Gel bei -20°C gelagert.

2.4.8 Bakterielle Expression der TvIP6K4

Für die bakterielle Expression der TvIP6K4 ist die Nutzung des oben beschriebenen Protokolls nicht möglich, da das Protein bei Nutzung des Protokolls vollständig in inclusion bodies eingelagert wird. Daher wurden die Expressionsbedingungen optimiert.

Es wurden folgende Bedingungen getestet:

Die IPTG-Konzentration wurde variiert (0,1mM IPTG, 0,5mM IPTG, 1,0mM IPTG und 1,5mM IPTG) und die Expression wurde mit den jeweiligen IPTG-Konzentrationen bei

10°C und bei 37°C ausgetestet. Induktionskontrollen erfolgten nach 1,2 und 3 Stunden, das Lysat und das verbliebene Pellet wurden auf ein SDS PAGE Gel analysiert.

In der Zusammenschau der Ergebnisse zeigte sich, dass bei Induktion mit IPTG in der Endkonzentration 1,5mM die Menge an gebildetem löslichem Protein am größten ist. Außerdem lag bei der 10°C Kultur verhältnismäßig weniger unlösliches Protein in inclusion bodies im Pellet vor. Die Proteinexpression wurde dementsprechend angepasst.

Die bakterielle Expression der TvI6K4 erfolgt in E. coli BL21 (DE3) pLysS pREP4 Stämmen. Diese werden wie in Punkt 2.4.4 beschrieben mit dem gewünschten Plasmid transformiert. Nach erfolgreicher Transformation werden 2 Klone gepickt und zwei Vorkulturen angesetzt. Ebenso werden zwei Erlenmeyer Kolben mit 250ml LB-Medium, 2,5ml Glucose (20%) und 250µl Ampicillin (100mg/ml) vorbereitet und bei 37°C gelagert. Am Folgetag wird zunächst die OD₆₀₀ des Ansatzes im Kolben bestimmt. Anschließend werden in jeden Kolben 2,5ml der Vorkultur gegeben und bei 37°C mit 250rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Sobald eine OD₆₀₀ (Leerwert= LB-Medium) von 0,5 erreicht ist, wird der Kolben auf Eis gestellt. Anschließend wird mit IPTG in einer Endkonzentration von 1,5mM induziert und über Nacht bei 10°C und 250rpm inkubiert. Vor Induktion mit IPTG, sowie 1, 2 und 3 h nach Induktion mit IPTG werden je 1ml aus dem Kolben als Expressionskontrollen entnommen (IPTG0-3). Diese werden bei 13000rpm 30s lang abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet bis zum Auftrag auf das SDS-PAGE Gel bei -20°C gelagert.

2.4.9 Lyse der Bakterien und Gewinnung des löslichen Proteins

Vor Durchführung der P11-Säulenchromatographie muss das gewünschte Protein in Lösung gebracht werden und von größeren Partikeln abgetrennt werden.

Hierzu wird nach erfolgter Inkubation die restliche Kultur 10min. lang bei 5000rpm und einer Temperatur von 4°C im GSA-Rotor abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Die Pellets beider 250ml Kulturen werden in je 8,35 ml Puffer E resuspendiert und bei -20°C eingefroren.

Am Folgetag werden die resuspendierten Pellets aufgetaut und auf Eis gestellt. Pro Pellet werden hinzugegeben:

- 167µl PMSF 0,1 M
- 83,5µl Benzamidin 0,1 M
- 835µl Triton X-100 10%
- 16,7 µl DTT 1M

Die Zellyse erfolgt mittels Ultrasonifikation für 4x45s bei Cycle30 bei maximaler Energie mit je einer Minute Pause auf Eis.

PMSF und Benzamidin dienen als Serinproteaseinhibitoren zum Schutz des Zielproteins vor proteolytischem Abbau. DTT dient als Redoxmittel der Reduktion von oxidativem Schaden.

Das Präzipitat, welches Zellmembranen und ungelöste Makromoleküle enthält, wird abzentrifugiert (SS-34 Rotor, 10 000rpm, 4°C). Der Überstand, der das extrahierte Protein enthält, wird bis zum Auftrag auf die Phosphocellulose Säule auf Eis gestellt. 12µl des Überstands werden entnommen mit 4µl 4xProbenpuffer versetzt und bis zum Auftrag auf das SDS PAGE Gel auf Eis gelagert. Das Pellet wird in 3,4ml Puffer A resuspendiert und auf Eis gestellt.

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Vorbereitung der P11 Phosphocellulose Säule

3g Phosphocellulose werden in einem 1l Messzylinder zusammen mit 75ml 0,5 M NaOH Lauge verrührt und 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird der Ansatz mit destilliertem Wasser auf 1l aufgefüllt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit bildet sich ein Sediment, sodass nach Ende der Inkubation der Überstand verworfen werden kann. Im Anschluss wird der genannte Vorgang wiederholt. Dann werden 15ml 1M HCl hinzugegeben, vermischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wird der Ansatz erneut mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1l aufgefüllt und für 20min. bei Raumtemperatur inkubiert und der Überstand im Anschluss verworfen.

Das Säulenmaterial wird nun in eine vorbereitete Säule mit einem Leervolumen von 100ml überführt. Nun wird die Säule mit 1M Tris/HCl pH 7,5 neutralisiert. Dazu wird sie so oft mit Tris/HCl gewaschen bis das entstehende Eluat einen pH von 7,5 aufweist.

2.5.2 Aufreinigung des Lysats der TvIPK-1 mittels P11 Phosphocellulose-Säulenchromatographie

Die Aufreinigung des Lysats der TvIPK-1 erfolgt mittels P11 Phosphocellulose-Säulenchromatographie. Dabei handelt es sich um eine Kationenaustauschchromatographie, da die P11 Matrix aufgrund ihrer freien Phosphatgruppen negativ geladen ist. Die Phosphocellulose Matrix funktioniert einerseits als Ionenaustauscher und andererseits als Affinitätsmatrix für die phosphat-affinen

Inositolphosphatkinasen. Nachdem das Zielprotein gebunden hat, kann es mithilfe eines Elutionsgradienten mit verschiedenen pH Werten von der Säule eluiert werden (Duong-Ly and Gabelli, 2014).

Alle nachfolgenden Schritte werden bei einer Raumtemperatur von 10°C durchgeführt. Zunächst wird die Säule mit 100ml Puffer E äquilibriert. Anschließend wird das Zelllysats mit einer Laufrate von 0,5ml/min aufgetragen. Der Durchlauf wird aufgefangen und bis zu Analyse mit SDS-PAGE auf Eis gelagert. Danach erfolgen zwei Waschungen mit je 20ml Puffer E, entsprechend 2 CV. Die Elution erfolgt in fünf Schritten mit folgenden Abstufungen: Puffer E 125mM NaCl, Puffer E 250mM NaCl, Puffer E 500mM NaCl, Puffer E 750mM NaCl, Puffer 1M NaCl. Der Durchlauf, die Waschungen und ebenso die Elutionen werden bis zur weiteren Auswertung mittels SDS-PAGE auf Eis gelagert.

2.5.3 Aufreinigung des Lysats der TvIP6K4 mittels P11 Phosphocellulose-Säulenchromatographie

Alle nachfolgenden Schritte werden bei einer Raumtemperatur von 10°C durchgeführt. Zunächst wird die Säule mit 2CV Puffer E und 10 CV Puffer A äquilibriert. Anschließend wird das Zelllysats und mit einer Laufrate von 0,5ml/min aufgetragen. Der Durchlauf wird aufgefangen und bis zu Analyse mit SDS-PAGE auf Eis gelagert. Danach erfolgten zwei Waschungen mit je 8CV Puffer A 2x. Die Elution erfolgt in sechs Schritten mit folgenden Abstufungen: Puffer A 125mM NaCl, Puffer A 250mM NaCl, Puffer A 500mM NaCl, Puffer A 750mM NaCl, Puffer A 1M NaCl, Puffer A 1,25mM NaCl. Der Durchlauf, die Waschungen und ebenso die Elutionen werden bis zur weiteren Auswertung mittels SDS-PAGE auf Eis gelagert.

2.5.4 Affinitätschromatographie der TvIP6K4 als Strep-Tag Fusionsprotein

Die TvIPK-1 und die TvIP6K4 werden als Fusionsproteine mit dem Strep-Tag exprimiert. Strep Tag ist Peptid, welches aus neun Aminosäuren besteht (Asn-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) und eine hohe Affinität zum immobilisierten Streptavidin einer Säulenmatrix aufweist, sodass eine Aufreinigung möglich ist (Schmidt and Skerra, 1993). Die Elution von der Säule mittels Desthiobiotin, einem Biotinderivat beruht darauf, dass das Desbiothin mit dem StrepTag um die Bindungsstelle am Streptavidin konkurriert und es aus dieser Bindung verdrängen kann, sodass das Protein eluiert (Laitinen et al., 2006, Pähler et al., 1987, Schmidt and Skerra, 1994).

Nachdem die TvIP6K4 mittels P11 Phosphocellulose-Säulenchromatographie vorgereinigt wurde, erfolgt die weitere Aufreinigung mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie.

Vorab werden die Elutionsfraktionen hinsichtlich ihrer Reinheit mit SDS-PAGE ausgewertet und bezüglich ihrer Aktivität im optischen Test gescreent. In Zusammenschau der Ergebnisse werden zwei bis drei Elutionsfraktionen ausgewählt. Die Salzkonzentration der ausgewählten Elutionsfraktionen wird mit Puffer A auf 500mM NaCl eingestellt.

Alle Arbeitsschritte erfolgen bei 10°C. Als Säulenmatrix werden 2ml der 50%igen Strep-Tactin Suspension in die Leersäule gegeben. Das sedimentierte Streptavidin wird mit 10 CV, entsprechend 10ml Strep-Waschpuffer unter maximaler Flussrate äquilibriert. Anschließend werden die Elutionsfraktionen mit einer Flussrate von 0,5ml/min. auf die Säule gegeben. Danach wird die Säule mit 4CV Strep-Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgt mit Strep-Elutionspuffer in 10 Elutionsschritten à 1 CV. Die Elutionsfraktionen werden auf Eis gestellt und mit 30% Glycerin eingefroren und bei -20°C gelagert.

Anschließend wird die Streptavidin Säule mit Strep-Regenerationspuffer regeneriert. Das Prinzip beruht darauf, dass das enthaltene HABA das gebundene Desbiothin aus seiner Bindung mit Streptavidin verdrängt (Schmidt and Skerra, 2007). Dies wird durch einen Farbwechsel nach rot indiziert. Ist dieser erreicht, erfolgt erneut die Waschung mit Waschpuffer bis die Säule ihre Ausgangsfarbe aufweist. Dann ist sie für die erneute Nutzung gebrauchsfertig.

2.5.5 SDS-PAGE Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE Gelelektrophorese ist eine Methode, welche es erlaubt, Proteine gemäß ihrer Größe aufzuteilen. SDS ist ein anionisches Detergens, das die Sekundärstruktur von Proteinen und jene Tertiärstruktur von Proteine denaturiert, die nicht von Disulfidbrücken gebildet werden (Brunelle and Green, 2014). Wird Mercaptoethanol zu den Proben gegeben, so werden die meisten Disulfidbrücken reduziert und so gelöst. SDS bindet an das Protein und bildet einen negativ geladenen Protein-SDS-Komplex. Wird Mercaptoethanol zu den Proben gegeben, so werden die meisten Disulfidbrücken reduziert und so gelöst. Dabei ist die Menge SDS, die an das Protein bindet und die negative Ladung des Proteins proportional der Länge des aufgefalteten Proteins und damit zur Proteingröße, sodass sie durch Anlage eines elektrischen Feldes nach Größe im Gel aufgeteilt werden können (Smith, 1994). Größere Protein-SDS-Komplexe wandern langsamer durch die Poren des Gels.

Zur Auftrennung wird ein diskontinuierliches Gel verwendet, namentlich ein 4,8%iges Sammelgel und ein 12%iges Trenngel mit 21 Taschen. Dieses wird entsprechend folgendem Schema unter einem Abzug gegossen:

	Trenngel (12%)	Sammelgel (4,8%)
Acrylamid 30%	7,2 ml	1,6ml
dH ₂ O	7,47ml	5,75ml
Trenngelpuffer 4x	5ml	0ml
Sammelgelpuffer 4x	0ml	2,5ml
APS (10%)	100µl	50µl
TEMED (10%)	100µl	100µl

Tabelle 5: Schema zur Herstellung des SDS-Polyacrylamid-Gels

Zuerst wird das Trenngel gegossen und als Schutz vor Austrocknung vorsichtig mit 1-Propanol überschichtet. Nachdem dieses auspolymerisiert ist, wird das Sammelgel gegossen.

Die Proben für den Auftrag auf das SDS-Gel werden vor dem Auftrag folgendermaßen vorbereitet: Die Pellets aus den Induktionskontrollen werden gemäß folgender Formel mit Wasser resuspendiert: $\frac{I_{t=x}}{I_{t=0}} * 50\mu\text{l } H_2O$. Zu je 12µl der Suspension werden 4µl 4xProbenpuffer gegeben. Zu je 12µl des Durchlaufs, der Waschungen und der Eluate werden je 4µl 4xProbenpuffer gegeben. Zu 5µl LMW Marker werden 4µl 4xProbenpuffer und 7µl H₂O gegeben. Sämtliche Proben werden gevortext, für 10 Minuten bei 98°C gekocht und anschließend für 30s bei 13000 rpm zentrifugiert, um Kondensationswasser zu sammeln.

Das auspolymerisierte Gel wird in eine Laufkammer eingespannt. Die Elektrophoresekammer wird mit Lämmli-Puffer befüllt, welcher als Laufpuffer dient. Anschließend wird eine Spannung von 85 Volt angelegt. Sobald die Proben das Trenngel erreichen, wird die Spannung auf 125 Volt erhöht. Danach wird das Gel mit Coomassie Färbelösung auf einem Heidolph Schwenker 60 Minuten lang eingefärbt und anschließend wird es über Nacht in Entfärbelösung entfärbt.

2.5.6 Lagerung der Säulenuate

Die Eluate werden zum Schutz vor Eiskristallbildung mit 30% Glycerin versetzt und bei -20°C eingefroren.

2.5.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

2.5.7.1 Proteinbestimmung nach Bradford mit Biorad Assay

Die Eluate der TvIPK-1 weisen einen hohen Reinigungsgrad auf, sodass ihre Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay bestimmt werden kann. Hierbei macht man

sich zu Nutze, dass sich unter Bindung von Coomassie brilliant blue G-250 an Proteine das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465nm ohne Protein zu 595nm mit Protein verschiebt (Bradford, 1976).

Zur Quantifizierung des unbekanntes Proteins wird eine Eichgerade mit BSA erstellt. Diese enthielt BSA in der Endkonzentrationen 0µg/µl, 5µg/µl, 10µg/µl, 20µg/µl, 30µg/µl, 40µg/µl, 50µg/µl bei einem Gesamtvolumen von 50µl. Da dem Zielprotein Glycerin zugesetzt wurde, wird der Eichgerade dieses in äquivalenten Mengen zugesetzt, um systematische Messfehler zu vermeiden. 50µl des Zielproteins werden als Dreifachbestimmung in ausreichender Verdünnung in den 96 Well gegeben. Zu den Proben wird schließlich je 200µl Biorad-Reagenz, welches zuvor mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:4 verdünnt worden ist, gegeben. Nach fünfminütiger Inkubation werden die Proben im Multiskan Reader bei 595nm vermessen. Die Auswertung erfolgt mittels Microsoft Excel. Die Erstellung einer Regressionsgerade anhand der Eichreihe ermöglicht die Ermittlung der Konzentration des zu analysierenden Proteins.

2.5.7.2 Densitometrische Proteinbestimmung

Die densitometrische Proteinbestimmung wird insbesondere für die TvIP6K4 verwendet, da die Reinheit der Aufreinigung des Proteins für eine Proteinbestimmung nach Bradford unzureichend war. Dabei wird ein Proteinstandard, in diesem Fall BSA in aufsteigenden Konzentrationen auf das SDS-PAGE Gel aufgetragen und die Proteinkonzentration des Zielproteins abgeschätzt.

2.5.8 Testung der aufgereinigten Kinasen

Bevor die aufgereinigten Kinasen im gekoppelt enzymatisch-optischen Test vermessen werden, erfolgt ein Screening auf putative Substrate durch Testung mit einem praktisch alle Inositolphosphate enthaltenden Phytinsäurehydrolysat.

Folgender Ansatz wird für das initiale Screening genutzt:

Substanz	Endkonzentration
Hepes pH 7,0	20mM
KCl	30mM
MgCl ₂	2mM
DTT	1mM
ATP	0,5mM
PK	10 µg/µl

Tabelle 6: Screeningansatz für die TvIPK-1 und die TvIP6K4

Der oben beschriebenen Reaktionsgemische werden vorbereitet und zusammen mit dem entsprechenden Enzym für 10 Minuten bei einer Temperatur von 30°C im Thermomixer inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe des Phytinsäurehydrolysats gestartet. Nach definierten Zeitpunkten werden zur Analyse mittels HPLC Aliquots mit mindestens 2nmol Substrat entnommen und die Reaktion wird in flüssigem Stickstoff gestoppt.

Die identifizierten Substrate werden einzeln im gekoppelt enzymatisch-optischen Test vermessen und die Reaktionsbedingungen für beide Enzyme optimiert.

Daraus ergaben sich folgende optimierten Reaktionsansätze für die nachfolgende Vermessung einzelner Inositolphosphate:

Substanz	Endkonzentration
Hepes pH 7,0	20mM
KCl	30mM
MgCl ₂	2mM
DTT	1mM
ATP	1mM
PK	10 µg/µl

Tabelle 7: Standardansatz für die TvIPK-1

Substanz	Endkonzentration
Hepes pH 6,8	20mM
KCl	50mM
MgCl ₂	2mM
DTT	1mM
ATP	1mM
PK	10 µg/µl

Tabelle 8: Standardansatz für die TvIP6K4

2.5.9 Vorbereitung der Proben für die HPLC-Analyse mittels Metal-Dye Detection (MDD-HPLC)

2.5.9.1 Vorbereitung von Proben mit niedrig phosphorylierten Inositolphosphaten (IP₂/IP₃)

Die Proben, welche entweder aus dem optischen Test (s. 2.5.9) oder aus einem Ansatz für die HPLC entnommen werden, enthalten stets mindestens 2nmol Inositolphosphat, sodass dieses mittels MDD-HPLC nachweisbar ist.

Um die Proben mittels HPLC zu analysieren, muss das enthaltene Protein durch Fällung mit Trichloressigsäure entfernt werden (Bennett, 1967, Lin et al., 2010, Scholz et al., 1990).

Die entnommenen Proben werden auf Eis gestellt und mit dH₂O auf ein Gesamtvolumen von 400µl aufgefüllt. Anschließend werden 100µl eiskaltes TCA 50%, 1µl eiskaltes 0,5M NaF und 20µl Aktivkohle hinzugegeben. Weiterhin wird der Probe der Chelatbildner EDTA zugegeben und zwar in einer äquivalenten Menge, welche das vorhandene MgCl₂ in der Probe bei einem pH von 7 vollständig komplexiert. Die Proben werden anschließend 10 Minuten lang bei 10°C im Reagenzglasrotator mit Überkopf-Drehbewegung rotiert. Dann werden sie bei 13000 rpm und 4°C 2 Minuten lang abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein 2ml Eppendorf-Tube pipettiert. Zu dem Überstand werden je 1ml wassergesättigter Ether hinzu pipettiert und im Thermomixer bei 550rpm und 30°C ausgeethert und der Ether bis zum Meniskus mit der Vakuumpumpe abgezogen. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt. Die wässrige Phase wird schließlich mithilfe von Tris 2M und pH Indikatorpapier auf einen pH 6,5-7,0 eingestellt. Der Restether wird durch 10minütige Inkubation bei 50°C entfernt. Die Proben werden danach mit dH₂O auf ein Gesamtvolumen von 1000µl aufgefüllt. Um die Restkohle zu entfernen werden sie über eine Minisart RC 4 Membran gefiltert.

2.5.9.2 Vorbereitung von Proben mit höher phosphorylierten Inositolphosphaten (IP₄/IP_{4+x})

Die entnommenen Proben werden auf Eis gestellt und mit dH₂O auf ein Gesamtvolumen von 400µl aufgefüllt. Anschließend werden 100µl eiskaltes TCA 50% und 1µl eiskaltes 0,5M NaF hinzugegeben. Weiterhin wird der Probe der Chelatbildner EDTA zugegeben und zwar in einer äquimolaren Menge, welche das vorhandene MgCl₂ in der Probe vollständig komplexiert. Die Proben inkubieren anschließend 10 Minuten lang auf Eis. Dann werden sie bei 13000 rpm und 4°C 2 Minuten lang abzentrifugiert. Der Überstand

wird in ein 2ml Eppendorf-Tube pipettiert. Zu dem Überstand wurden je 1ml wassergesättigter Ether hinzu pipettiert und im Thermomixer bei 550rpm und 30°C ausgeethert und der Ether bis zum Meniskus mit der Vakuumpumpe abgezogen. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt. Die wässrige Phase wird schließlich mithilfe von Tris 2M und pH Indikatorpapier auf einen pH 6,5-7,0 eingestellt. Der Restether wird durch 10minütige Inkubation bei 50°C entfernt. Die Proben werden danach mit dH₂O auf ein Gesamtvolumen von 1000µl aufgefüllt.

2.5.10 HPLC-Analyse mittels Metal-Dye Detection (MDD-HPLC)

Zur Analyse von Inositolphosphaten wurde die MDD-HPLC) verwendet. Eine Methode, welche es ermöglicht, Inositolphosphate ohne den Einsatz von Radioaktivität zu analysieren (Mayr, 1988). Die Auftrennung des Inositolphosphatgemischs erfolgt mithilfe einer Mini-Q-HPLC-Anionenaustauschsäule. Entscheidend für den Nachweis der Inositolphosphate sind die beiden Hauptkomponenten, die bei der MDD-HPLC zum Einsatz kommen, das trivalente Metallkation Yttrium und der Kationen-spezifische Farbstoff 4-(2-Pyridylazo)resorcinol die Kopplung an ein optisches System ermöglicht dabei den Nachweis der Inositolphosphate (Mayr, 1988). PAR komplexiert Yttrium bei pH > 7,5 in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1. Dieser Komplex weist im Gegensatz zu PAR eine starke Absorption bei einer Wellenlänge von 520nm auf (Elchuk and Cassidy, 1979). PAR und die Phosphatgruppen der Inositolphosphate, welche als Polyanionen agieren, konkurrieren um die Bindung an Yttrium (Mayr, 1988). Die Affinität der Inositolphosphate zu Yttrium ist höher als die Affinität von PAR zu Yttrium. Daher sinkt in Anwesenheit von Inositolphosphaten die gemessene Absorption. Das gemessene negative Signal wird invertiert, sodass ein positiver Peak entsteht (Mayr, 1988). Die Tatsache, dass man die Retentionszeit des Peaks in Relation zu einem Phytinsäurehydrolysat-Standard (IPx-Standard) bzw. IP7- oder IP8 Standard setzen kann, ermöglicht eine Zuordnung der gemessenen Peaks und teilweise auch eine Quantifizierung. Aus den vorbereiteten Proben (s.2.5.7) werden 950µl entnommen. Diesen werden 300µl HPLC-Probenpuffer zugefügt. 1,2ml der so vorbereiteten Proben werden über einen Autosampler (Sample Injector S5200) auf die Mini-Q Säule injiziert. Nicht bindende Bestandteile (Kationen, solitäre Anionen) werden mit Eluent A von der MiniQ PC 3.2/3 Säule gewaschen. Die Inositolphosphate werden mit einem angepassten Gradienten von Eluent A und Eluent B von der Säule eluiert und kontinuierlich mit dem Nachsäulenreagenz C versetzt, wobei das Verhältnis der Volumina von Reagenz C zu Eluent A/B 1:2 beträgt. Die eluierenden Inositolphosphate führen aufgrund des oben

beschriebenen Komplexierungsreaktion nach Elution von der Säule zu einer Absorptionsabnahme bei 520nm, welche über einen UV Detektor (SPD-10 AV UV/Vis Detector, Shimadzu) erfasst wird (Scholz, 1990).

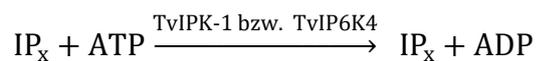
2.5.11 Gekoppelter enzymatisch-optischer Test

2.5.11.1 Testung der Kinaseaktivität beider Enzyme

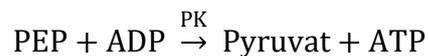
In einem gekoppelten enzymatisch-optischen Test werden mehrere Reaktionen in einer Weise gekoppelt, die es erlaubt, die Bildung oder den Verbrauch eines optisch nachweisbaren Produktes nachzuweisen. Hier wird die Messung der Reaktion an einem Photometer bei 360nm möglich. Dies erlaubt es die Abnahme bzw. Zunahme von NADH nachzuweisen, da NADH UV-Licht bei einer Wellenlänge von 345-360nm stark absorbiert, NAD⁺ jedoch nicht.

Zum Nachweis der Kinaseaktivität der Enzyme wurden folgende Reaktionen gekoppelt:

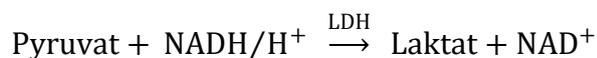
- 1- Phosphorylierung eines Inositolphosphats durch die TvIPK-1 respektive TvIP6K4 unter ATP Verbrauch



- 2- Regeneration des ATPs durch die Pyruvatkinase durch Umsatz von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat



- 3- Reduktion von Pyruvat durch die Laktatdehydrogenase zu Laktat unter Verbrauch von NADH



Aus den Reaktionsgleichungen ergibt sich, dass bei geeigneten Bedingungen (Enzymüberschuss an PK und LDH, sättigendes PEP) die Abnahme von NADH äquimolar zum Umsatz des jeweils getesteten Inositolphosphats (IP_x) erfolgt.

Somit konnte der enzymatisch-optisch gekoppelte Test genutzt werden, um die Aktivität der Kinase festzustellen und Messungen zur v_{max} und K_{m} -Wert Bestimmung durchzuführen.

Die Messungen erfolgten an einem Lamda 20 UV-Spektralphotometer der Firma Perkin-Elmer. Es wurden für beide Enzyme jeweils optimale Reaktionsbedingungen ermittelt. Entsprechend erfolgte die Testung für die TvIPK-1 unter folgenden Bedingungen:

Substanz	Endkonzentration
Hepes pH 7,0	20mM
KCl	30mM
MgCl ₂	2mM
DTT	1mM
NADH	0,2mM
PEP	1mM
ATP	1mM
LDH	7,8µg/µl
PK	10 µg/ µl

Tabelle 9: Standardansatz für die TvIPK-1

Die Testung der TvIP6K4 erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Substanz	Endkonzentration
Hepes pH 7,0	20mM
KCl	50mM
MgCl ₂	4mM
DTT	1mM
NADH	0,2mM
PEP	1mM
ATP	2mM
LDH	7,8µg/µl
PK	10 µg/ µl

Tabelle 10: Standardansatz für die TvIP6K4

Die oben beschriebenen Reaktionsmixe werden als 10fach Mix vorbereitet und 10 Minuten bei 4°C und 10000rpm abzentrifugiert, um zu verhindern, dass es durch Staub zu Artefaktbildung bei der Aufzeichnung mit dem empfindlichen Photometer kommt. Der fertige Mix wird auf Eis gestellt. Die Reaktionsansätze werden zusammen mit dem entsprechenden Enzym für 10 Minuten bei einer Temperatur von 30°C im Photometer in

einer Polystyrol Küvette vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe des putativen Substrats gestartet. Gegebenenfalls werden zur Analyse mittels HPLC Aliquots mit mindestens 2nmol Substrat entnommen und die Reaktion in flüssigem Stickstoff gestoppt. Da sich zeigte, dass einige Reaktionen der TvIPK-1 sehr schnell ablaufen, wurde das Enzym für die genaue Analyse der entsprechenden Reaktionen mit folgendem Verdünnungsmix verdünnt:

Substanz	Endkonzentration
Hepes pH 7,0	20mM
KCl	30mM
MgCl ₂	4mM
DTT	1mM

Tabelle 11: Verdünnungsmix für die TvIPK-1

Für die Testung von TvIP6K4 wurde kein Verdünnungsmix genutzt.

2.5.11.2 Auswertung der Ergebnisse des optisch-gekoppelten Test

Der Auswertung des optischen gekoppelten Testes erfolgt mithilfe des Programmes UV WinLab Software. Für das Hauptsubstrate erfolgt die Ermittlung des v_{max} und K_m -Wertes mittels Michaelis-Menten Konstante und Lineweaver-Burk Diagramm.

Die Michaelis-Menten Gleichung beschreibt die Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Substratumsetzung v von der Substratkonzentration S .

$$v = v_{max} \times \frac{[C_{Substrat}]}{K_M + [C_{Substrat}]}$$

Die Michaelis-Menten Konstante K_m entspricht der Substratkonzentration, bei welcher ein bestimmtes Enzym ein bestimmtes Substrat mit halbmaximaler Geschwindigkeit, nämlich $v_{max}/2$ umsetzt (Michaelis, 1913). Die ablaufende Reaktion lässt sich dabei zusätzlich in Reaktion 1.Ordnung und in Reaktion 0. Ordnung unterteilen. Im Bereich der Substratkonzentrationen, die zu einer submaximalen Umsatzgeschwindigkeit führen, spricht man von einer Reaktion 1. Ordnung. Ab Erreichen einer Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit maximal ist und sich durch eine Zunahme der Substratkonzentration nicht mehr ändert, spricht man von einer Reaktion 0.Ordnung.

3 Ergebnisse

3.1 Umklonierung der cDNA aus dem Klonierungsvektor in den Expressionsvektor

Zur Umklonierung der cDNA der TvIPK-1 bzw. der TvIP6K4 der Zielenzyme aus dem Expressionsvektor pEX-A2 in den Klonierungsvektor psk, erfolgt der präparative Restriktionsverdau mit Restriktionsendonukleasen NCO1 und XHO1 (s. 2.3.2).

Nach Durchführung des präparativen Restriktionsverdaus erfolgt die Kontrolle mittels Agarosegelelektrophorese und die anschließende Extraktion der relevanten Banden mit dem Skalpell.

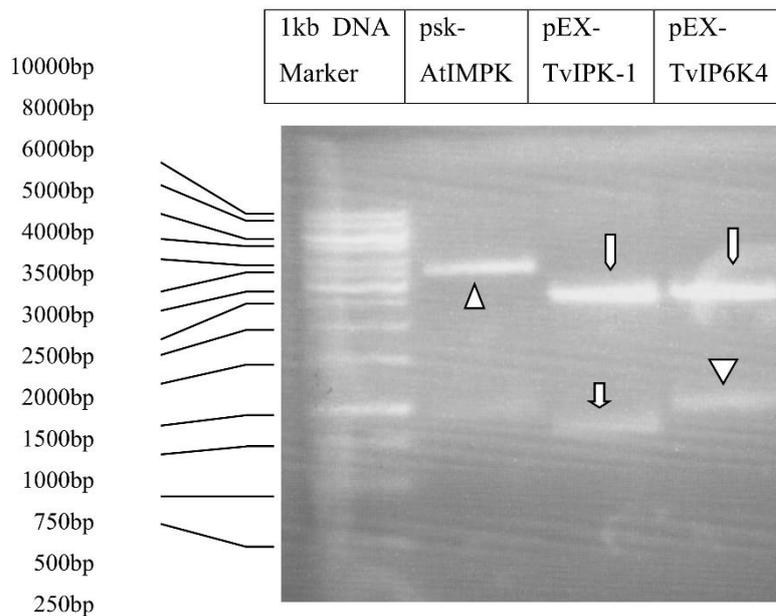


Abbildung 9: 1,2%iges präparatives Agarosegel vor Extraktion der DNA Banden für die Ligation der DNA in den psk-Vektor

Die Abbildung zeigt den psk-Vektor (Δ), entwickelt für die IPMK aus *Arabidopsis thaliana* (Nalaskowski et al. unveröffentlicht) mit 4941bp und den Expressionsvektor pEX mit 2450bp (\square). Weiterhin ist die cDNA der TvIPK-1 (\sqcap) mit einer Basenpaarlänge von 782bp und die cDNA der TvIP6K4 (∇) mit 950bp zu sehen.

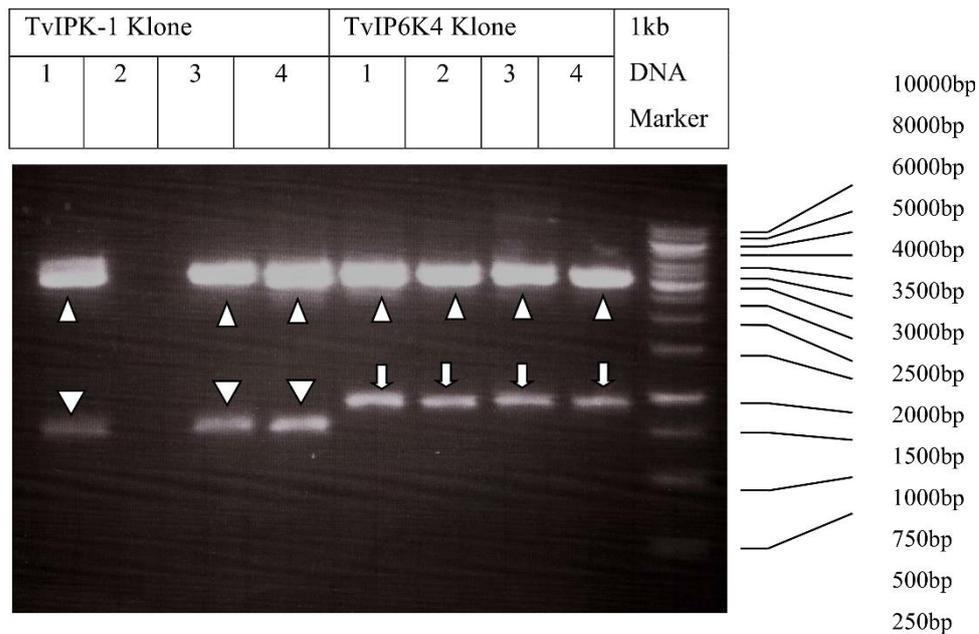


Abbildung 10: 1,2%iges präparatives Agarosegel nach Extraktion der DNA Banden für die Ligation der DNA in den Zielvektor

Nach Extraktion der DNA Inserts und des psk Vektors aus dem Agarosegel (s.2.3.4) erfolgt die Ligation der DNA in den Expressionsvektor (s.2.3.5). Anschließend wird die vektorielle DNA mittels Hitzeschocktransformation in *E. coli* x11 blue Stämme eingeschleust (s. 2.4.4). Pro Enzym werden 4 Klone gepickt und die DNA mittels Mini-Präparation extrahiert (s.2.3.6). Diese werden danach nach einem analytischen Restriktionsverdau (s.2.3.8) mittels Agarose-Gelelektrophorese (s.2.3.3) analysiert.

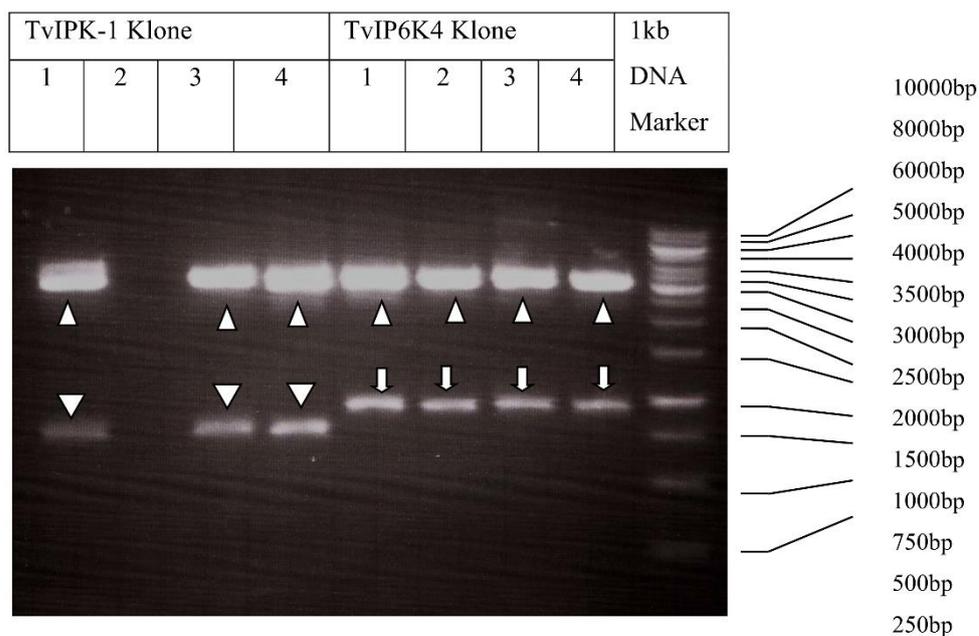


Abbildung 11: *psk-TvIPK-1* und *psk-TvIP6K4* nach analytischem Restriktionsverdau, 1,6%iges analytisches Agarosegel

Die Abbildung zeigt den erfolgreichen Restriktionsverdau der vektoriellen DNA der TvIPK-1 und der TvIP6K4 mit NCO1 und XHO1. Der Klon 2 der TvIPK-1 wurde verloren. Der psk-Vektor (Δ) stellt sich auf der erwarteten Höhe mit 4941bp dar. Die cDNA der TvIPK-1 (∇) mit einer Basenpaarlänge von 782bp und die cDNA der TvIP6K4 (\Downarrow) mit 950bp finden sich ebenfalls auf der erwarteten Höhe. Aufgrund dieser positiven Ergebnisse wurde jeweils Klon 1 der beiden Enzyme zur Sequenzierung ausgewählt. Die Sequenzierung der DNA ergab, dass sowohl die DNA der TvIPK-1 und der TvIP6K4 mit regelrechter Sequenz ohne Nachweis einer Mutation vorliegen.

3.2 Rekombinante bakterielle Expression und Reinigung der TvIPK-1

Die Expression der TvIPK-1 erfolgt in dem Bakterienstamm BL21 (DE3) plyspREP4 mithilfe eines psK-Vektors (s. 2.4.7). Die Proteinaufreinigung erfolgt über eine Phosphocellulose-Säulenchromatographie (s. 2.5.2). Das Ergebnis der Expressionskontrollen und der Aufreinigung ist in nachfolgenden Abbildungen zu sehen:

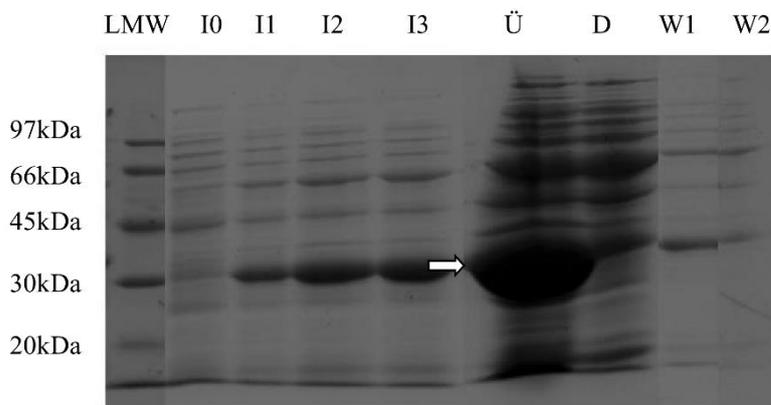


Abbildung 12: Expressionskontrollen der Proteinexpression der TvIPK-1 bei 37°C, Coomassie gefärbtes 10%iges SDS-PAGE Gel

Die Abbildung zeigt die erfolgreiche Induktion der Proteinexpression mit positiven Expressionskontrollen zum Zeitpunkt 0 Minuten (I0), sowie eine (I1), zwei (I2) und drei Stunden (I3) nach Induktion mit IPTG. Im Überstand (Ü) finden sich große Mengen des Zielproteins (\Leftrightarrow) mit einem erwarteten Gewicht von 29,8kDa. Der Überstand zeigt große Mengen an Verunreinigungen, die zu großen Teilen mit dem Durchlauf und den Waschungen ausgewaschen werden, ohne dass dabei signifikante Mengen des Zielproteins ausgewaschen werden.

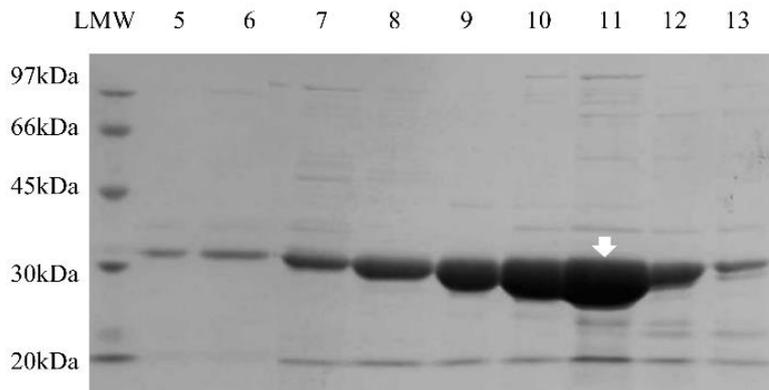


Abbildung 13: Elutionsfraktionen der TvIPK-1 nach Aufreinigung mittels P11-Phosphocellulosechromatographie, Coomassie gefärbtes 10%iges SDS-PAGE Gel

Das Strep-TagII-TvIPK-1 Fusionsprotein hat eine errechnete molekulare Masse von 29,8kDa. Bei der Gelelektrophorese läuft es bei ca. 30kDa. Das SDS-PAGE Gel zeigt eine sehr zufriedenstellende Aufreinigung des Proteins. Die stärkste Elution (↯) erfolgt bei einer NaCl-Konzentration von 250mM NaCl (Eluat 7-8) und bei 500mM NaCl (Eluat 9-12). Das Reinigungsergebnis konnte durch wiederholte Expression unter identischen Bedingungen reproduziert werden. Von der Elutionsfraktion E11 wurde mittels Bradford Test und densitometrischer Proteinbestimmung die Proteinkonzentration ermittelt und den weiteren enzymatischen Vermessungen zu Grunde gelegt.

3.3 Bestimmung der Substratspezifität der TvIPK-1

Zur Bestimmung der Substratspezifität der TvIPK-1 werden zunächst zur Orientierung MDD-HPLC Analysen mit Phytinsäurehydrolysat durchgeführt, einem Gemisch aus den meisten Inositolphosphaten in bekannter Zusammensetzung (s.2.5.8). Um erste Substrate und Produkte der TvIPK-1 zu identifizieren werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben entnommen und mittels MDD-HPLC analysiert. Die Ergebnisse werden zusätzlich als Differenzchromatogramm dargestellt. Dabei wird die InsP-Analyse zum Zeitpunkt A von der InsP-Analyse zum Zeitpunkt B abgezogen. Dies ermöglicht die Darstellung der Substrate als negative Peaks und die Darstellung der Produkte als positive Peaks. Auf Basis dieser Daten können erste putative Substrate ermittelt werden. Eine eindeutige Substrat-Produkt Beziehung lässt sich erst durch eine Austestung der einzelnen Substrate etablieren. Das untenstehende Chromatogramm zeigt das Ergebnis der Analyse des Umsatzes des Phytinsäurehydrolyсата durch TvIPK-1 in 1:3 Verdünnung.

3.3.1 Umsatz von Phytinsäurehydrolysat

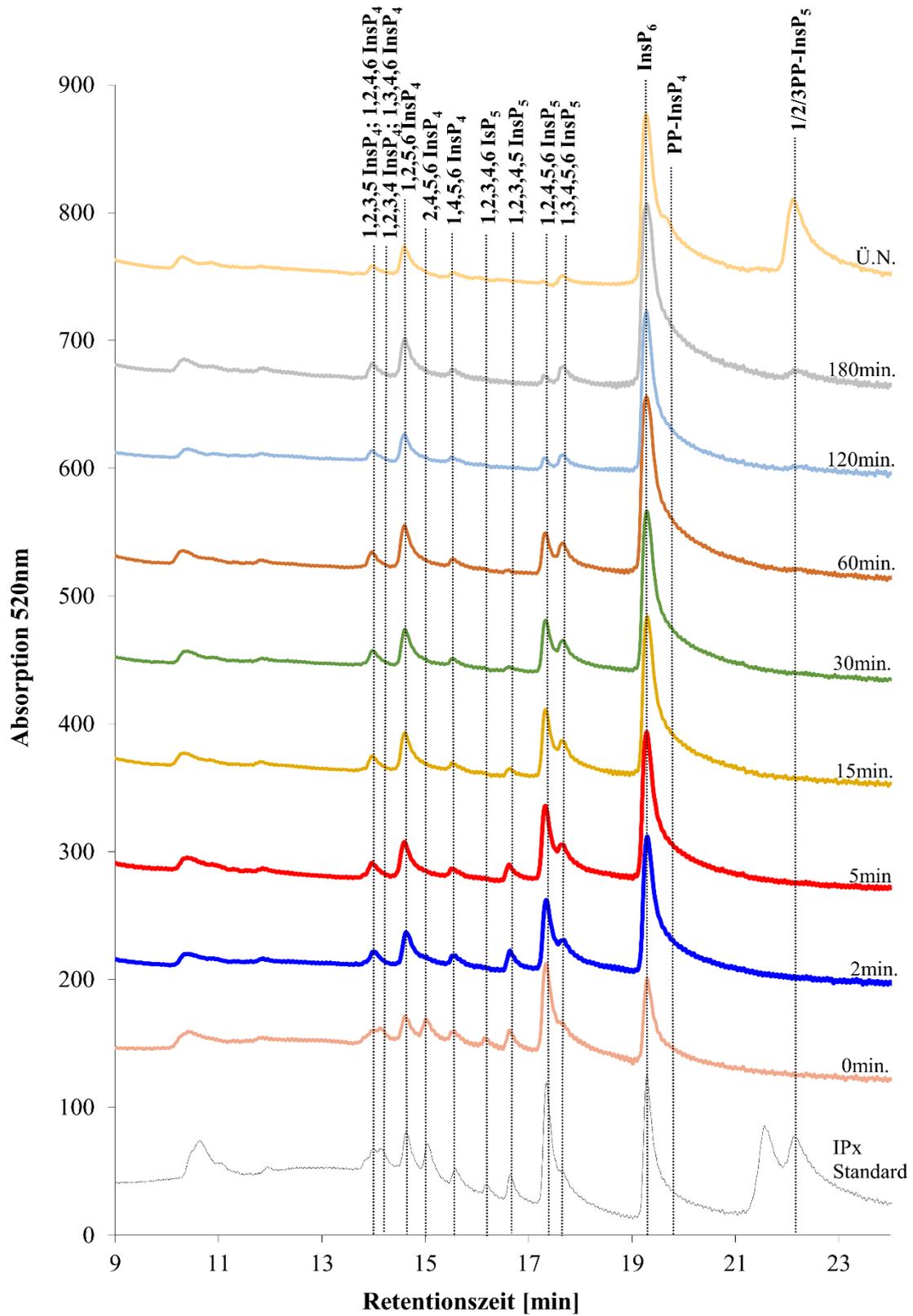


Abbildung 14: Chromatogramm - Umsatz von Phytinsäurehydrolysat durch die TvIPK-1 in 1:3 Verdünnung

Die Abbildung zeigt deutlich, dass ein breites Spektrum an Inositolphosphaten durch die TvIPK-1 phosphoryliert wird, sichtbar an den Inositolphosphaten, deren Peak abnimmt. Innerhalb der ersten beiden Minuten zeigt sich eine deutliche Abnahme von 1,2,3,4 InsP₄, 1,3,4,6 InsP₄ und 1,2,3,4,6 InsP₅. Außerdem zeigt sich eine Abnahme von 1,2,3,4,5 InsP₅ ab der fünften Minute. Ab der 15. Minute gibt es eine deutliche Abnahme von 1,2,4,5,6 InsP₅ und 1,3,4,5,6 InsP₅. Entstehende Produkte sind 1,3,4,5,6 InsP₅ innerhalb der ersten beiden Minuten. Außerdem entsteht in einer langsamen Reaktion InsP₆, 5PP-InsP₄ und 1/2/3PP-InsP₅. Insgesamt ist somit eine breite Substratspezifität zu verzeichnen.

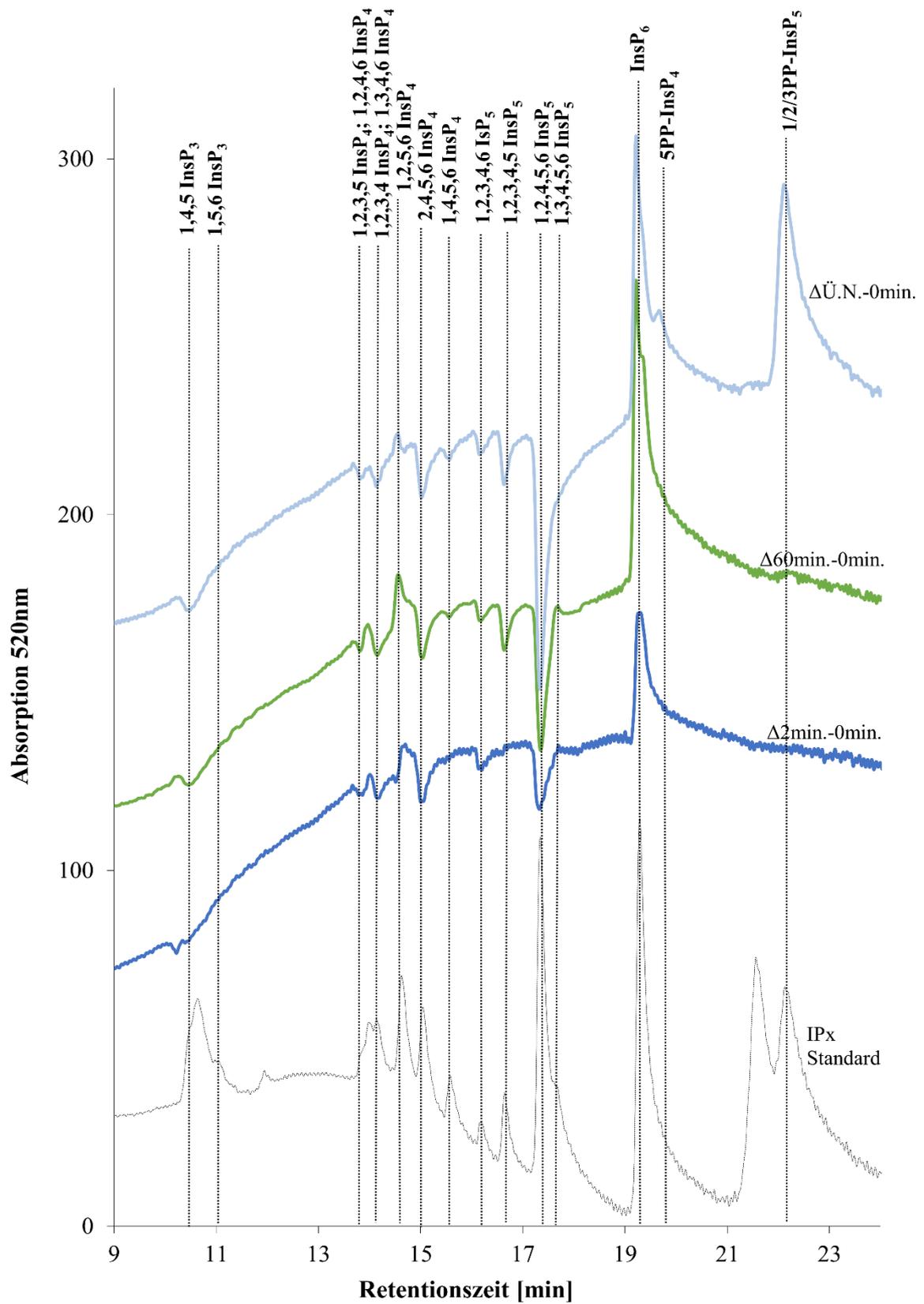


Abbildung 15: Differenzchromatogramm - Umsatz von Phytinsäurehydrolysat durch die TvIPK-1 in 1:3 Verdünnung

Das Differenzchromatogramm verdeutlicht nochmal welche Inositolphosphate Substrate bzw. Produkte sind. Dargestellt werden drei verschiedene Zeitpunkte in Relation zum Zeitpunkt 0 Minuten, nämlich 2 Minuten, 60 Minuten und Über Nacht. Hierdurch lassen sich noch weitere Substrate identifizieren. Anhand der Abnahme der Peaks lässt sich zusätzlich 1,4,5 InsP₃ als Substrat identifizieren. Außerdem sind alle InsP₄-Isomere mit der Ausnahme von 1,2,5,6 InsP₄ Substrate. Auch sämtliche InsP₅-Isomere einschließlich 1,3,4,5,6 InsP₅ werden über Nacht verstoffwechselt. Als Produkt lässt sich 1,2,5,6 InsP₄ identifizieren. Nach 60 Minuten zeichnet sich InsP₆ deutlich als Produkt ab und über Nacht werden 5PP-InsP₄, 1/2/3PP-InsP₅ als Produkt sichtbar.

Zu genaueren Analyse der ablaufenden Reaktionen wurde der Versuch mit der TvIPK-1 in 1:10 Verdünnung wiederholt und eine quantitative Analyse durchgeführt, welche eine Deduktion der erfolgten Reaktionen erlaubt und die Auswahl der zu analysierenden Substrate spezifiziert. Das Ergebnis der quantitativen Analyse ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

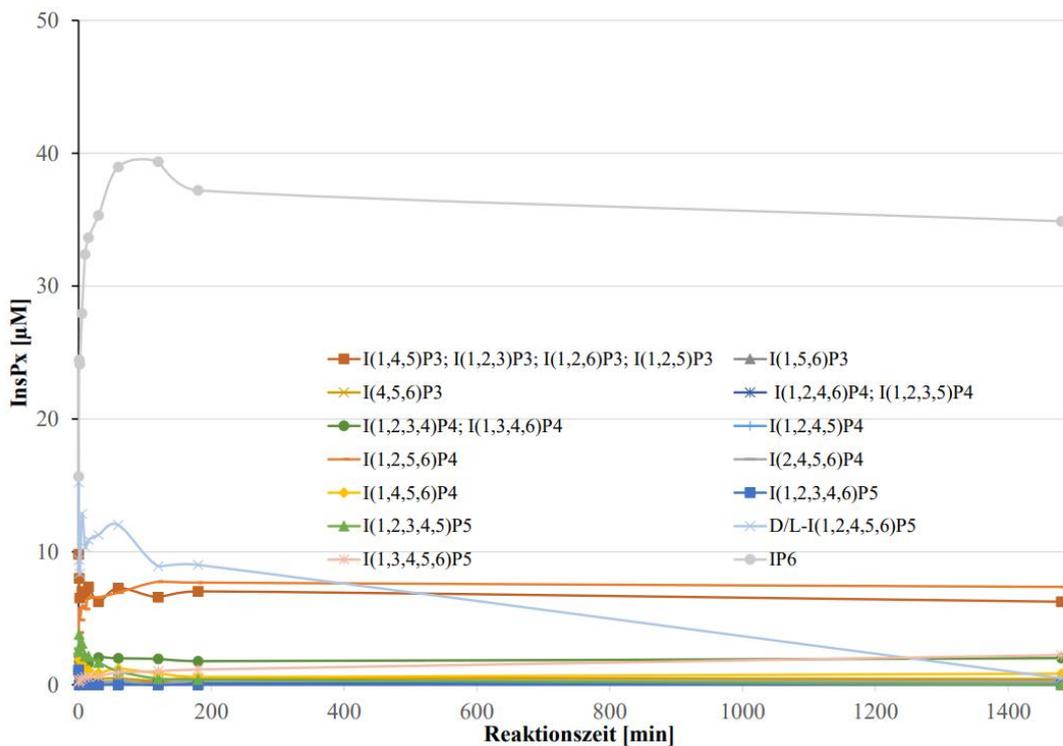


Abbildung 16: Quantitative Analyse des Umsatzes von Phytinsäurehydrolysat durch die TvIPK-1 in 1:10 Verdünnung – Gesamtüberblick

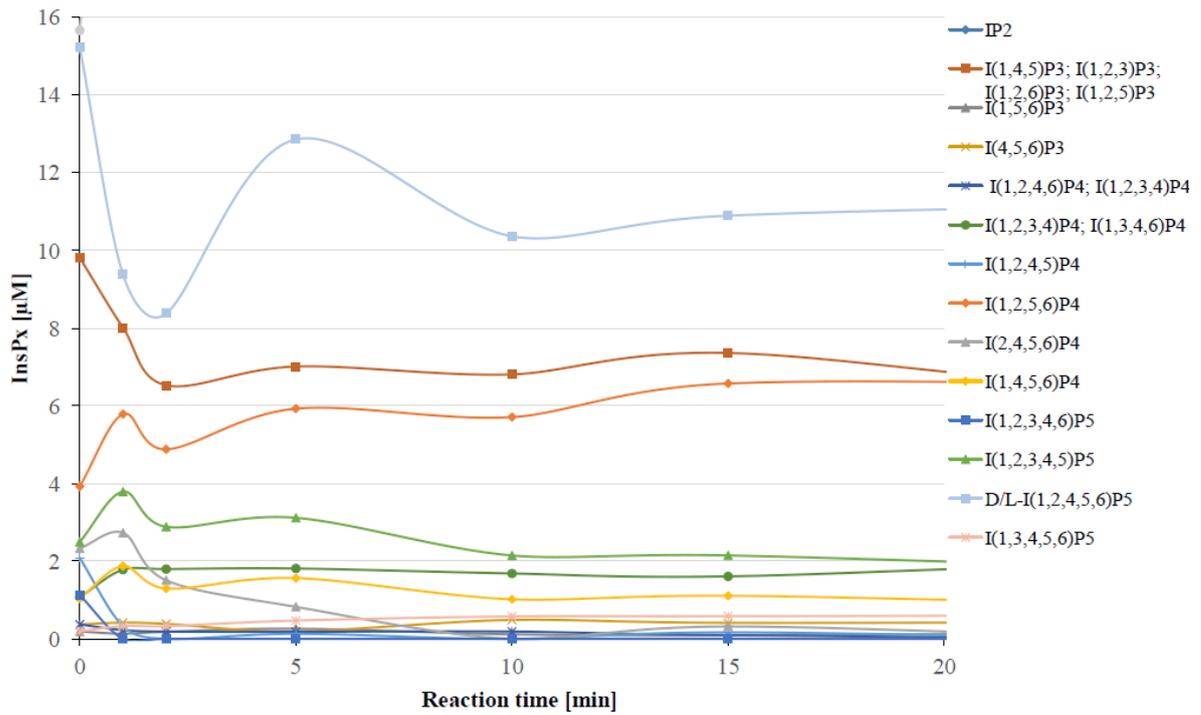


Abbildung 17: Quantitative Analyse des Umsatzes von Phytinsäurehydrolysat durch die TvIPK-1 in 1:10 Verdünnung – schnelle initiale Reaktionen im Detail

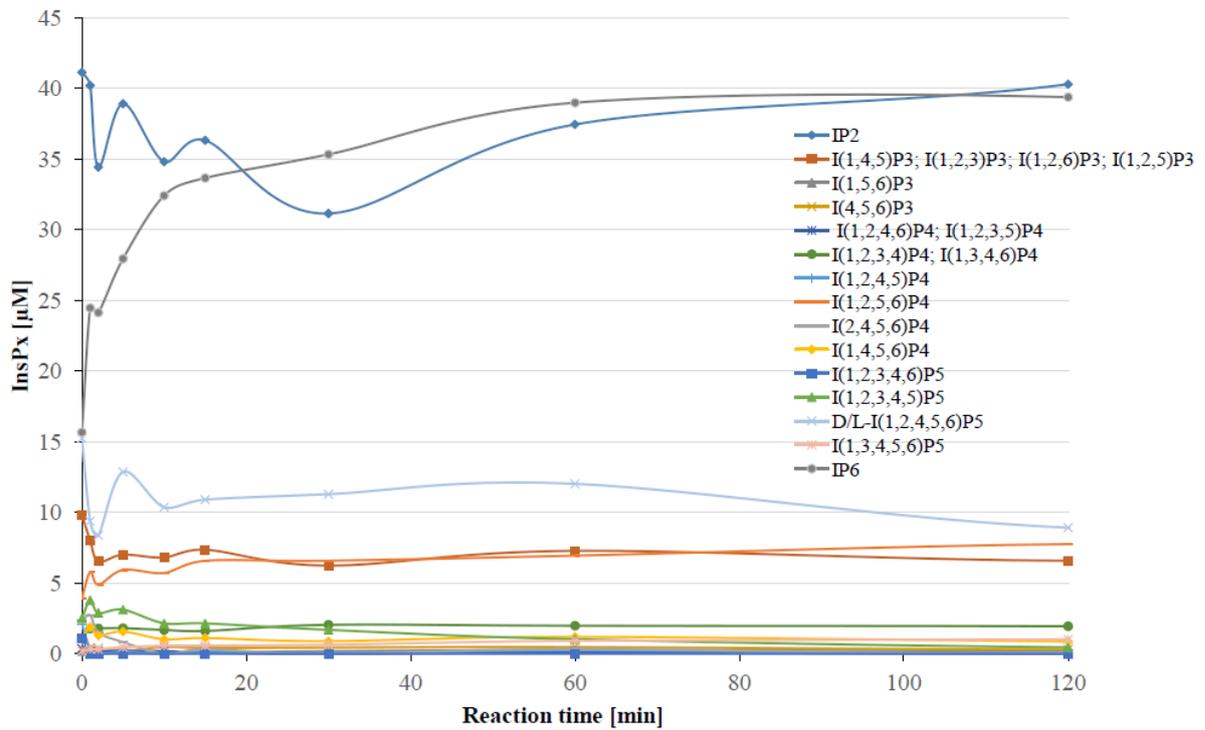
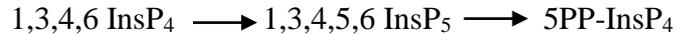
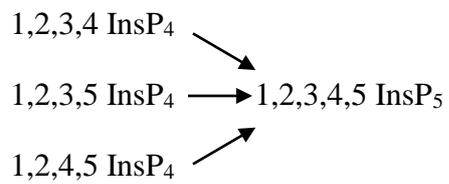
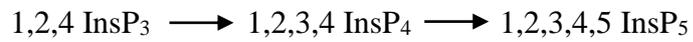


Abbildung 18: Quantitative Analyse des Umsatzes von Phytinsäurehydrolysat durch die TvIPK-1 in 1:10 Verdünnung – Minute 0 bis 120

In Zusammenschau der quantitativen Analysen konnten vorab folgende putative Reaktionswege etabliert werden:



Zur Verifizierung der Substrat-Produkt Beziehung wurden der Umsatz der Substrate durch die TvIPK-1 einzeln ausgetestet und mittels MDD-HPLC analysiert. Diese Ergebnisse sind im Folgenden aufgeführt.

3.3.2 Umsatz von 1,4 InsP₂

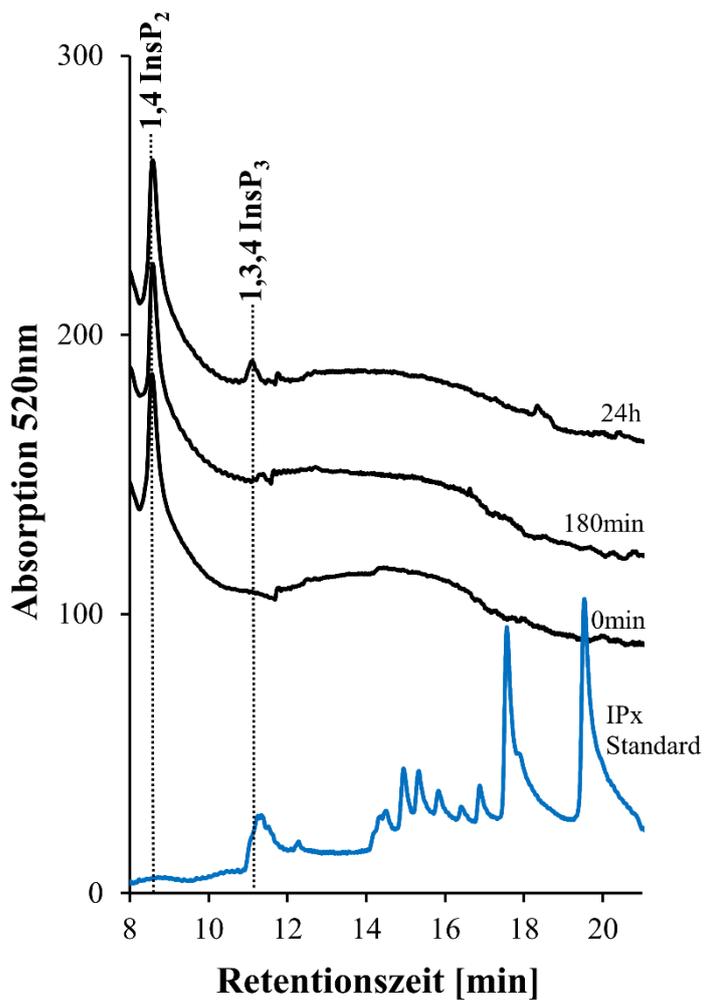


Abbildung 19: Chromatogramm – Umsatz von 1,4 InsP₂ durch die TvIPK-1

1,4 InsP₂ eluiert zusammen mit dem ATP-Peak. 8 μM des Substrates werden von der TvIPK-1 mit einer Ansatzkonzentration von 22 mg/l sehr langsam über Nacht an der 3-OH Position zu 1,3,4 InsP₃ phosphoryliert.

Zusammenfassend ergibt sich folgender Reaktionsweg:



3.3.3 Umsatz von 4,5 InsP₂

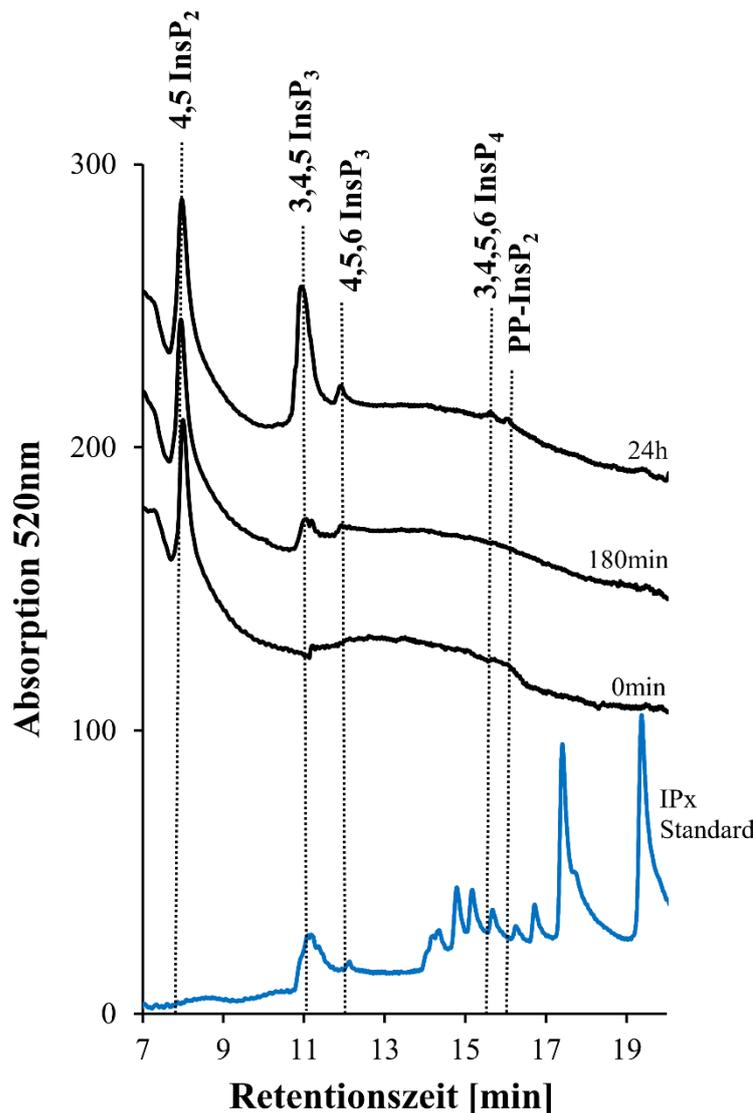
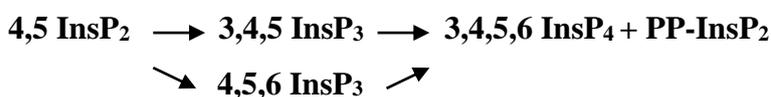


Abbildung 20: Chromatogramm – Umsatz von 4,5 InsP₂ durch die TvIPK-1

4,5 InsP₂ ist ein reines Substrat. 10 μM des Substrates werden von der TvIPK-1 in einer Ansatzkonzentration von 22 mg/l sehr langsam umgesetzt. 4,5 InsP₂ wird vorzugsweise an der 3-OH Position und zu einem kleinen Teil an der 6-OH Position phosphoryliert. Als Endprodukte der ersten Phosphorylierung entstehen 3,4,5 InsP₃ und 4,5,6 InsP₃. Als gemeinsames Endprodukt entsteht aus letzteren 3,4,5,6 InsP₄. Ein weiteres InsP₄ eluiert kurze Zeit hinter dem 3,4,5,6 InsP₄. Bei diesem handelt es sich vermutlich um ein pyrophosphoryliertes InsP₃.

Zusammenfassend ergibt sich folgender Reaktionsweg:



3.3.4 Umsatz von 1,2,5 InsP₃/ 2,3,5 InsP₃

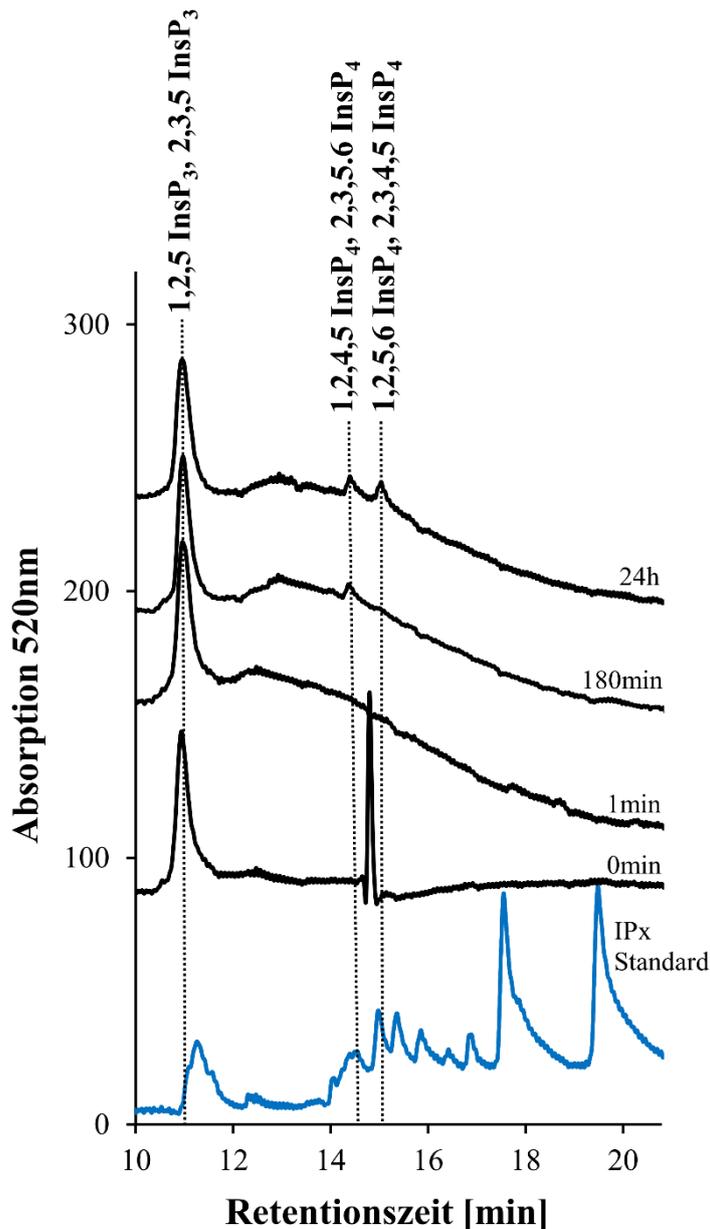
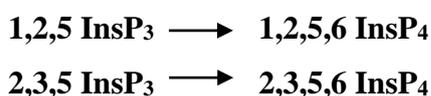


Abbildung 21: Chromatogramm – Umsatz von 1,2,5 InsP₃ durch die TvIPK-1

Bei dem Peak bei einer Retentionszeit von 14,8 Minuten handelt es sich um ein Artefakt. Das Substrat 1,2,5 InsP₃ ist ein Enantiomergemisch, welches 1,2,5 InsP₃ und 2,3,5 InsP₃ enthält. Die Substrate werden sehr langsam verstoffwechselt. 5 μM 1,2,5 InsP₃ und 2,3,5 InsP₃ werden von 27,5 mg/l Enzym an der 6-OH Position zu 1,2,5,6 InsP₄, respektive 2,3,5,6 InsP₄ phosphoryliert.

Zusammenfassend ergeben sich folgende Reaktionswege:



3.3.5 Umsatz von 1,2,6 InsP₃/ 2,3,4 InsP₃

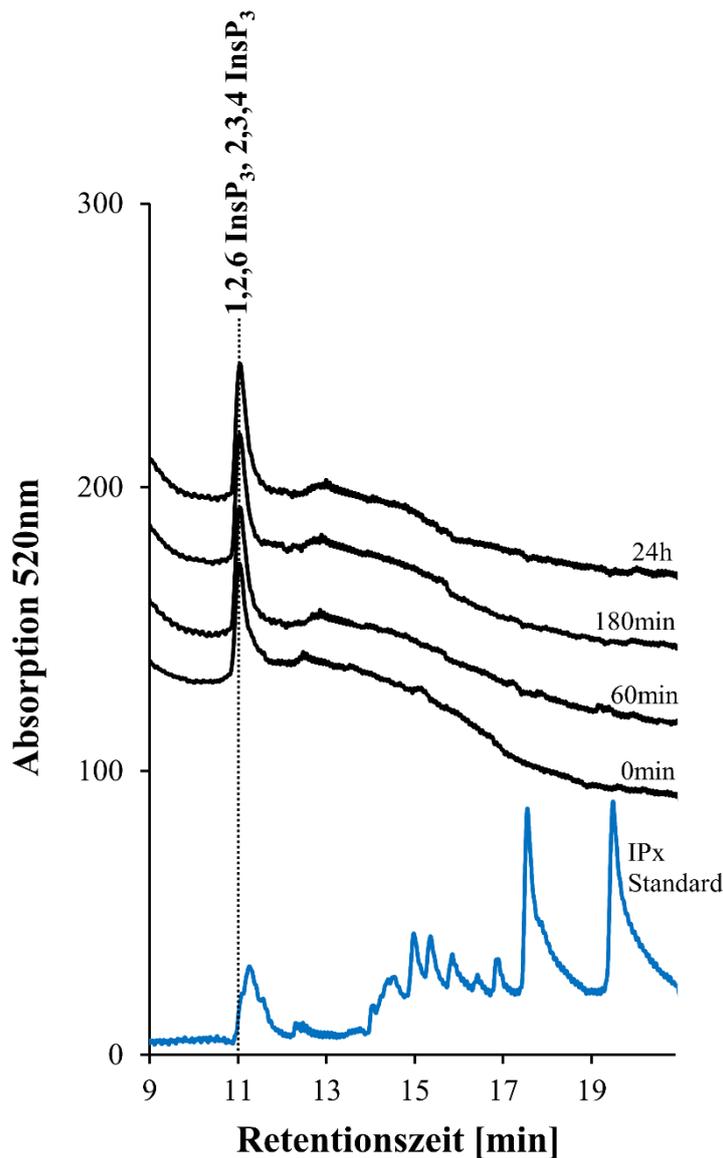


Abbildung 22: Chromatogramm – Umsatz von 1,2,6 InsP₃ durch die TvIPK-1

Das Chromatogramm zeigt, den Umsatz von 1,2,6 InsP₃. Diese liegt als Enantiomerenmisch zusammen mit 2,3,4 InsP₃ vor und ist kein Substrat. Somit ist die in der quantitativen Analyse etablierte Theorie, dass die TvIPK-1 1,2,6 InsP₃ an der 5-Position zu 1,2,5,6 InsP₄ phosphoryliert, widerlegt.

3.3.6 Umsatz von 1,3,4 InsP₃

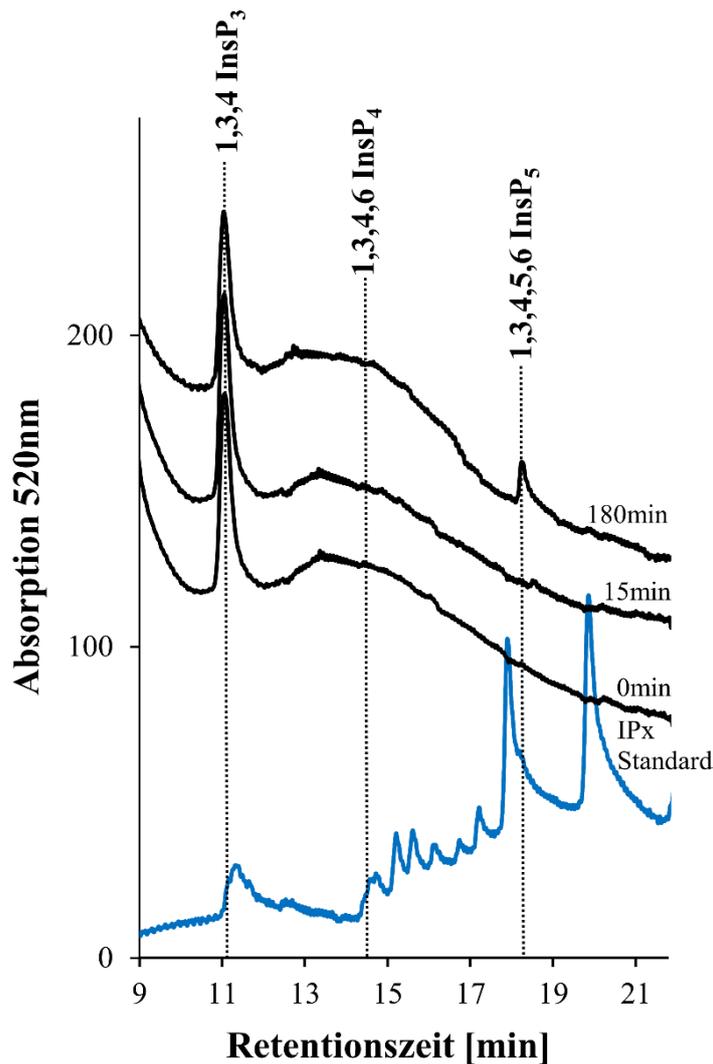


Abbildung 23: Chromatogramm – Umsatz von 1,3,4 InsP₃ durch die TvIPK-1

Das Chromatogramm zeigt den Umsatz von 10 μM 1,3,4 InsP₃ durch die TvIPK-1 in einer Ansatzkonzentration von 46 mg/l. Zunächst wird 1,3,4 InsP₃ dabei in einer langsamen Reaktion an der 6-OH Position zu 1,3,4,6 InsP₄ phosphoryliert. Aufgrund des niedrigen Km-Wertes von 1,3,4,6 InsP₄ (s. 3.4.26) und der schnellen Weiterreaktion desselben zu 1,3,4,5,6 InsP₅ ist es mittels MDD-HPLC nur als sehr kleiner Peak nachweisbar. Das 1,3,4,5,6 InsP₅ wird an der 5-Stelle pyrophosphoryliert, sodass 5PP-InsP₄ entsteht.

Zusammenfassend ergibt sich folgender Reaktionsweg:



3.3.7 Umsatz von 1,4,5 InsP₃

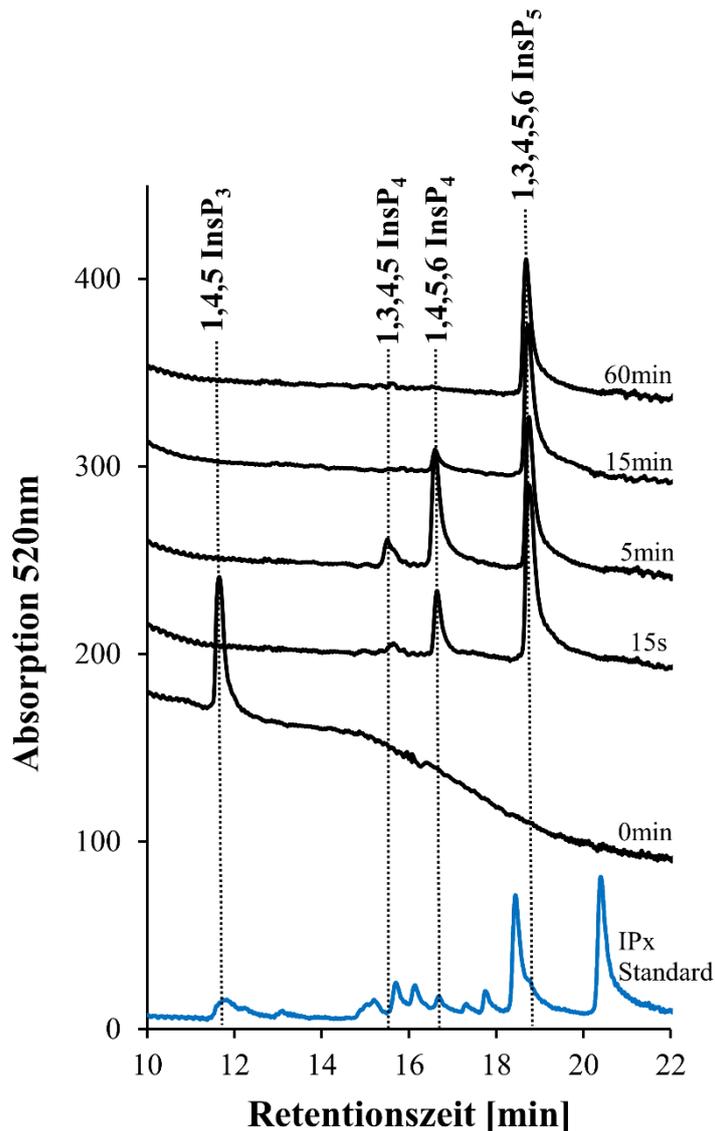
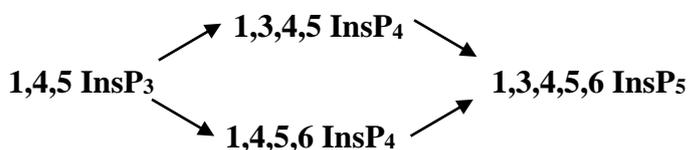


Abbildung 24: Chromatogramm – Umsatz von 1,4,5 InsP₃ durch die TvIPK-1

1,4,5 InsP₃ ist ein hochreines Substrat. In einer schnellen Reaktion wird 1,4,5 InsP₃ innerhalb von 15s vollständig einerseits an der 3-Position phosphoryliert und andererseits an der 6-Position phosphoryliert, sodass 1,4,5,6 InsP₄ und 1,3,4,5 InsP₄ entstehen. 1,3,4,5 InsP₄ wird innerhalb von 15 Minuten vollständig an der 6-Stelle phosphoryliert, sodass 1,3,4,5,6 InsP₅ entsteht. 1,4,5,6 InsP₄ wird in einer vergleichsweise langsameren Reaktion zu 1,3,4,5,6 InsP₅ verstoffwechselt.

Zusammenfassend ergibt sich folgender Reaktionsweg:



3.3.8 Umsatz von 1,4,6 InsP₃

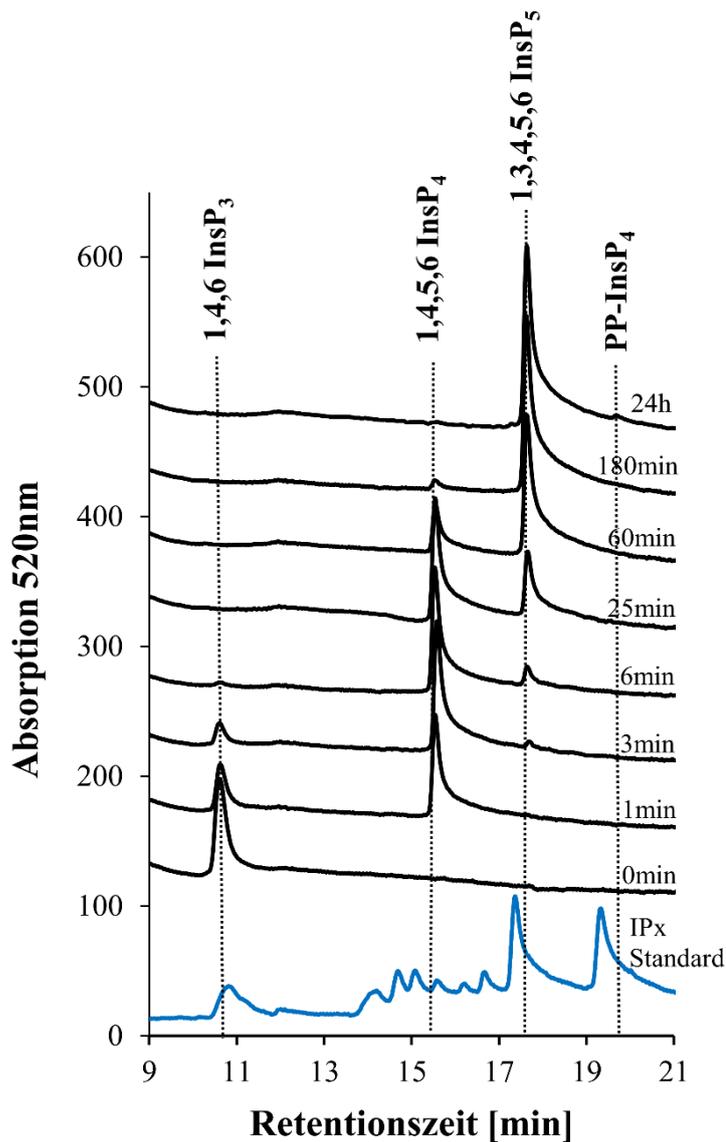
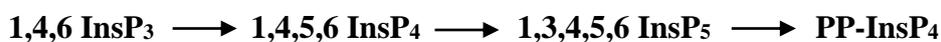


Abbildung 25: Chromatogramm – Umsatz von 1,4,6 InsP₃ durch die TvIPK-1

Das 1,4,6 InsP₃ wird einer schnellen Reaktion zu 1,4,5,6 InsP₄ umgesetzt, welches dann an seiner 3-Position phosphoryliert wird, sodass 1,3,4,5,6 InsP₅ entsteht. Letzteres wird über Nacht pyrophosphoryliert, sodass ein PP-InsP₄ entsteht. Die genaue Position kann mittels MDD-HPLC nicht detektiert werden. Bei der Pyrophosphorylierungsstelle handelt es sich um die 4-, 5- oder 6-Position.

Zusammenfassend ergibt sich folgender Reaktionsweg:



3.3.9 Umsatz von D-2,4,5 InsP₃

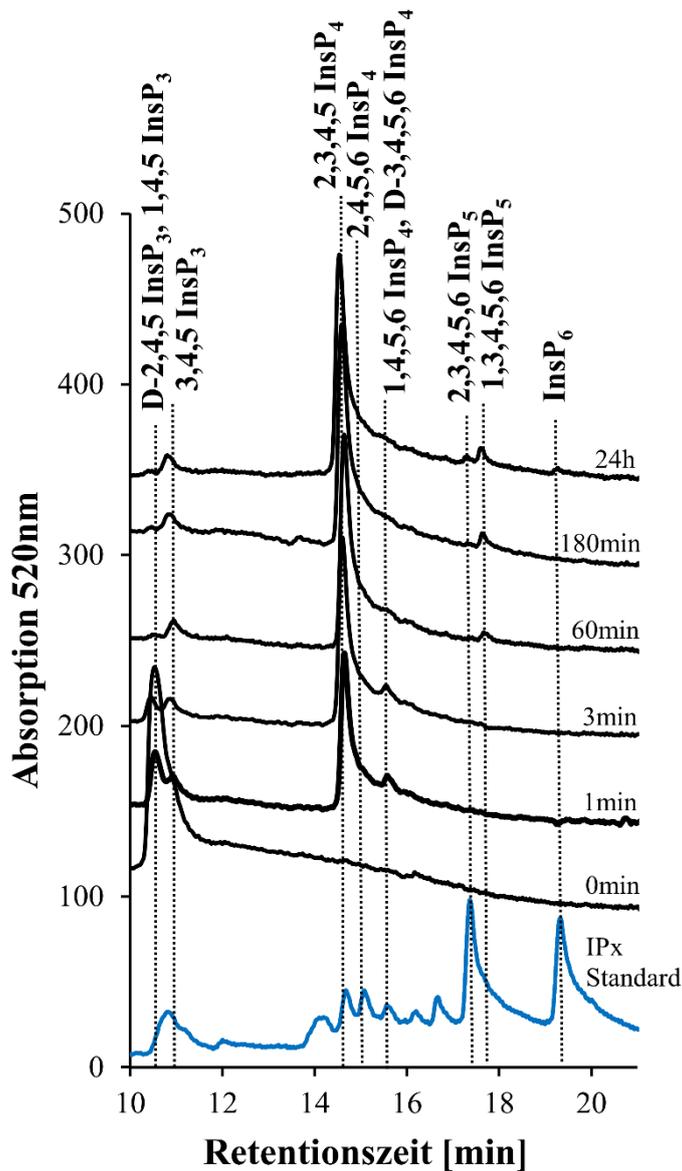
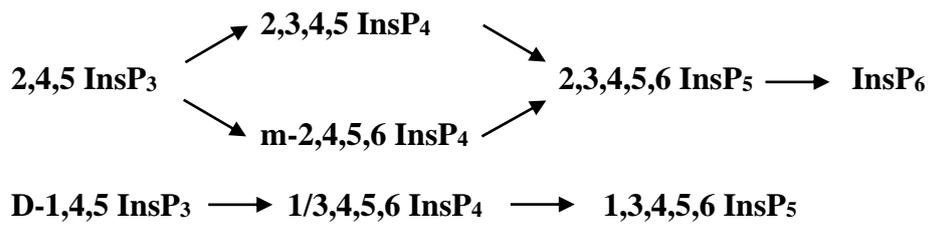


Abbildung 26: Chromatogramm – Umsatz von D-2,4,5 InsP₃ durch die TvIPK-1

Das Chromatogramm zeigt den Umsatz von D-2,4,5 InsP₃. Dieses ist kein reines Isomer. Es ist mit circa 4% 1,4,5 InsP₃ verunreinigt, sowie mit einem Isomer, welches auf Höhe von 3,4,5 InsP₃ eluiert. 20 μM D-2,4,5 InsP₃ werden in einer schnellen Reaktion von 1,83 mg/l Enzym innerhalb von 1 Minute fast vollständig an der 3-Position phosphoryliert, sodass D-2,3,4,5 InsP₄ entsteht. Weiterhin wird es in einer zeitgleich ablaufenden Reaktion an der 6-Position zu 2,4,5,6 InsP₄ phosphoryliert. Beide InsP₄ Isomere werden weiter zu 2,3,4,5,6 InsP₅ phosphoryliert, welches über Nacht zu InsP₆ phosphoryliert wird. 1,4,5 InsP₃ wird an der 3-OH und an der 6-OH Position phosphoryliert, sodass 1,4,5,6 InsP₄ und

Zusammenfassend ergeben sich folgende Reaktionswege:



3.3.10 Umsatz von D-3,4,6 InsP₃

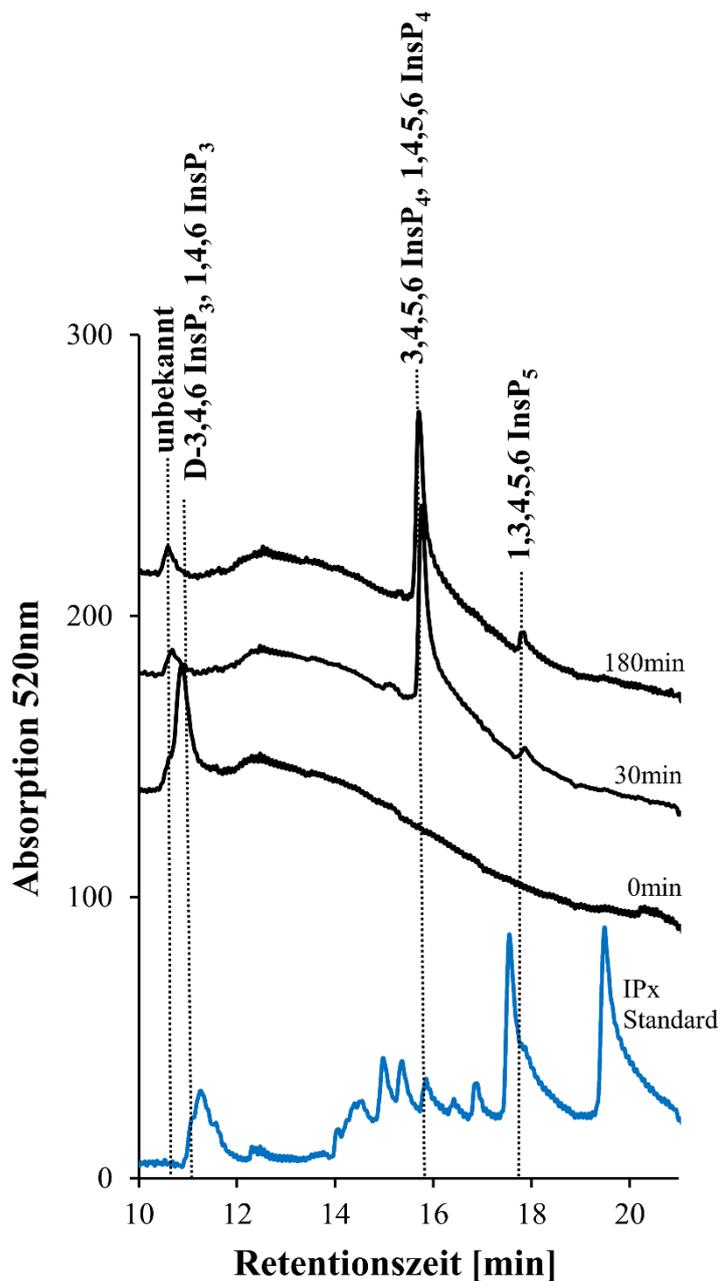
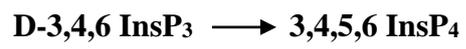


Abbildung 27: Chromatogramm – Umsatz von D-3,4,6 InsP₃ durch die TvIPK-1

Das Substrat D-3,4,6 InsP₃ ist zu 15% mit einem unbekanntem Inositolphosphat verunreinigt, welches nicht umgesetzt wird. Außerdem ist es mit geringen Mengen 1,4,6 InsP₃ verunreinigt. 5 μ M D-3,4,6 InsP₃ werden von 1,83 mg/l TvIPK-1 rasch an der 5-OH Position phosphoryliert, sodass 3,4,5,6 InsP₄ entsteht. Dieses wird in einer langsamen Reaktion zu 1,3,4,5,6 InsP₅ weiter phosphoryliert. 1,4,6 InsP₃ wird zunächst an der 5-OH Gruppe zu 1,4,5,6 InsP₄ und dann weiter zu 1,3,4,5,6 InsP₅ phosphoryliert.

Zusammenfassend ergibt sich folgender Reaktionsweg:



3.3.11 Umsatz von 1,2,3,4 InsP₄

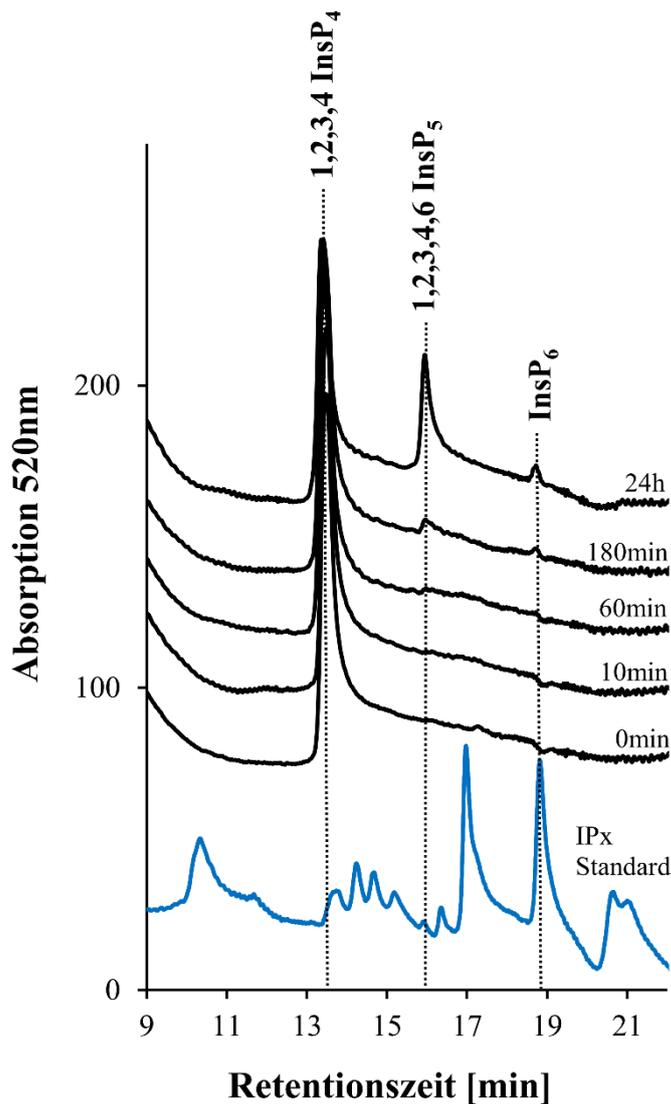
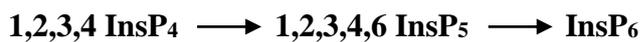


Abbildung 28: Chromatogramm – Umsatz von 1,2,3,4 InsP₄ durch die TvIPK-1

1,2,3,4 InsP₄ ist ein hochreines Substrat, welches zunächst sehr langsam an der 6-OH Position phosphoryliert wird, sodass 1,2,3,4,6 InsP₅ entsteht, welches anschließend weiter zu InsP₆ phosphoryliert wird.

Zusammenfassend ergibt sich folgender Reaktionsweg:



3.3.12 Umsatz von 1,2,3,5 InsP₄

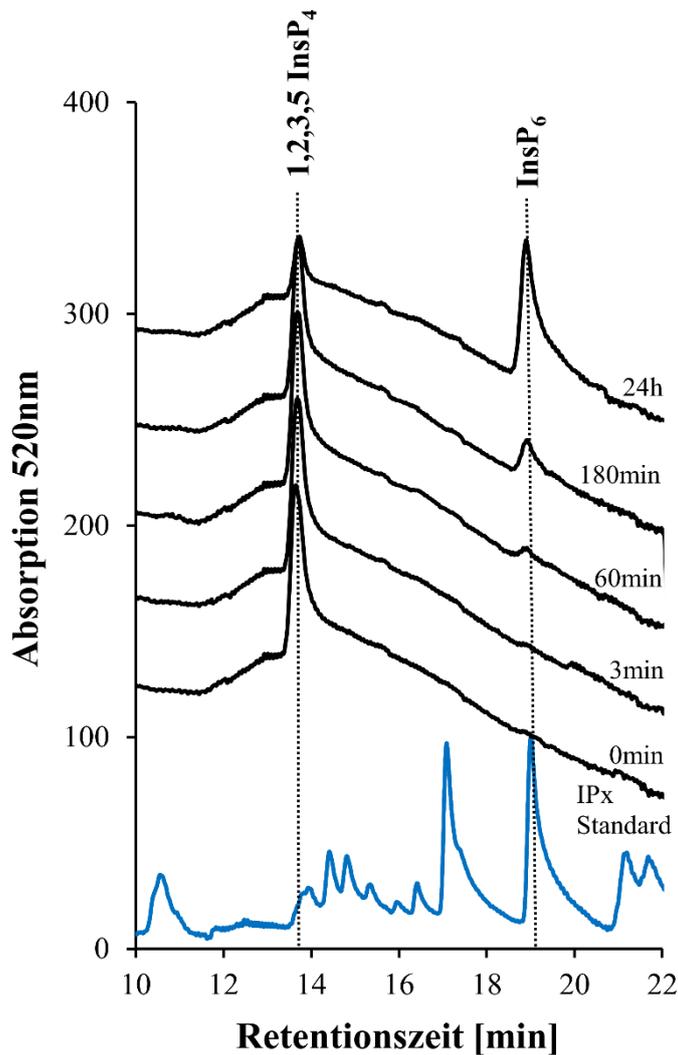
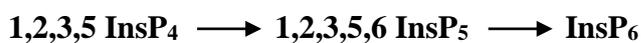
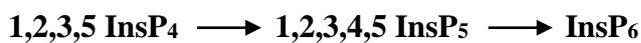


Abbildung 29: Chromatogramm – Umsatz von 1,2,3,5 InsP₄ durch die TvIPK-1

1,2,3,5 InsP₅ wird langsam über InsP₅ zu InsP₆ phosphoryliert. Das entsprechende InsP₅ ist nicht im Chromatogramm abgebildet. Dies liegt vermutlich am ehesten daran, dass das InsP₅ langsam gebildet wird und dann sehr schnell zu InsP₆ phosphoryliert wird. Bei dem InsP₅ handelt es sich entweder um 1,2,3,5,6 InsP₅ oder um 1,2,3,4,5 InsP₅.

Zusammenfassend ergeben sich folgende mögliche Reaktionswege:



3.3.13 Umsatz von D-1,2,3,6 InsP₄

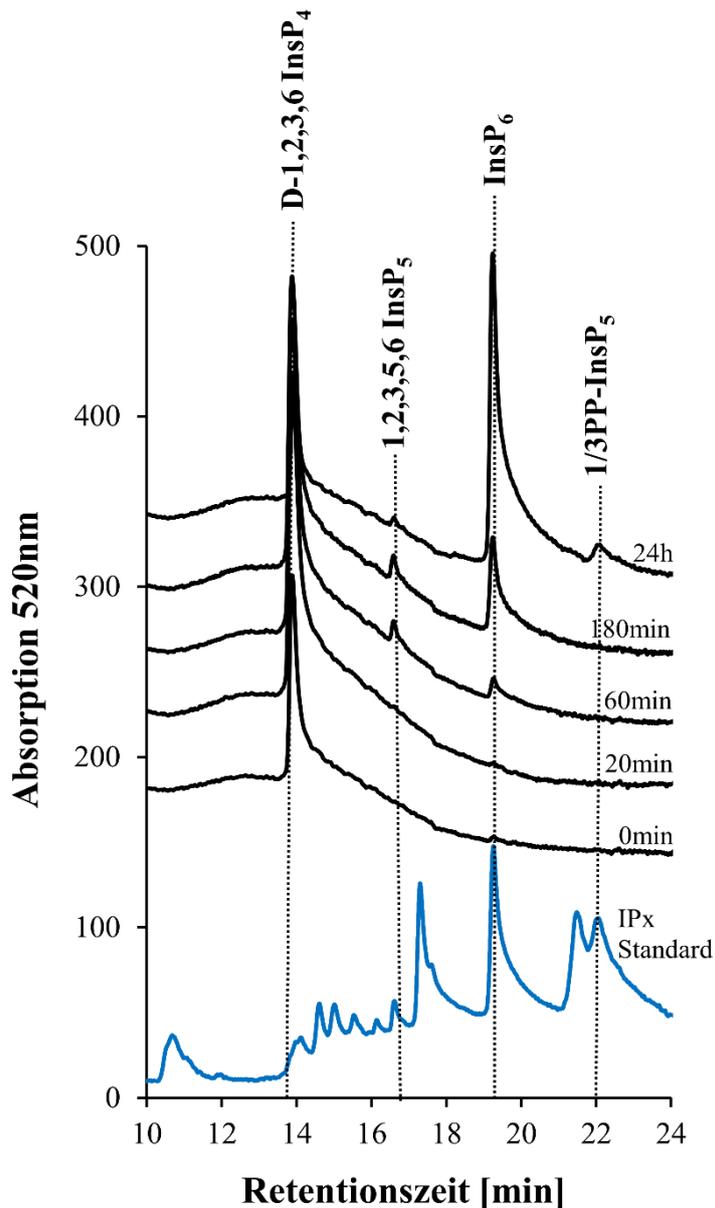


Abbildung 30: Chromatogramm – Umsatz von D-1,2,3,6 InsP₄ durch die TvIPK-1

Das Chromatogramm zeigt den Umsatz von D-1,2,3,6 InsP₄. Das Ausgangssubstrat ist mit 0,95% InsP₆ verunreinigt. 10 μM D-1,2,3,6 InsP₄ werden von 9,17 mg/l TvIPK-1 in einer langsamen Reaktion an der 5-Position zu 1,2,3,5,6 InsP₅ phosphoryliert, welches langsam zu InsP₆ phosphoryliert wird. Das entstandene InsP₆ wird über Nacht entweder an 1-, 2- oder 3-Position pyrophosphoryliert, sodass ein 1/2/3PP-InsP₅ entsteht. Die genaue Struktur des PP-InsP₅ lässt sich anhand dieser MDD-HPLC Analytik nicht bestimmen.

Zusammenfassend ergibt sich folgender Reaktionsweg:



3.3.14 Umsatz von 1,2,4,5 InsP₄

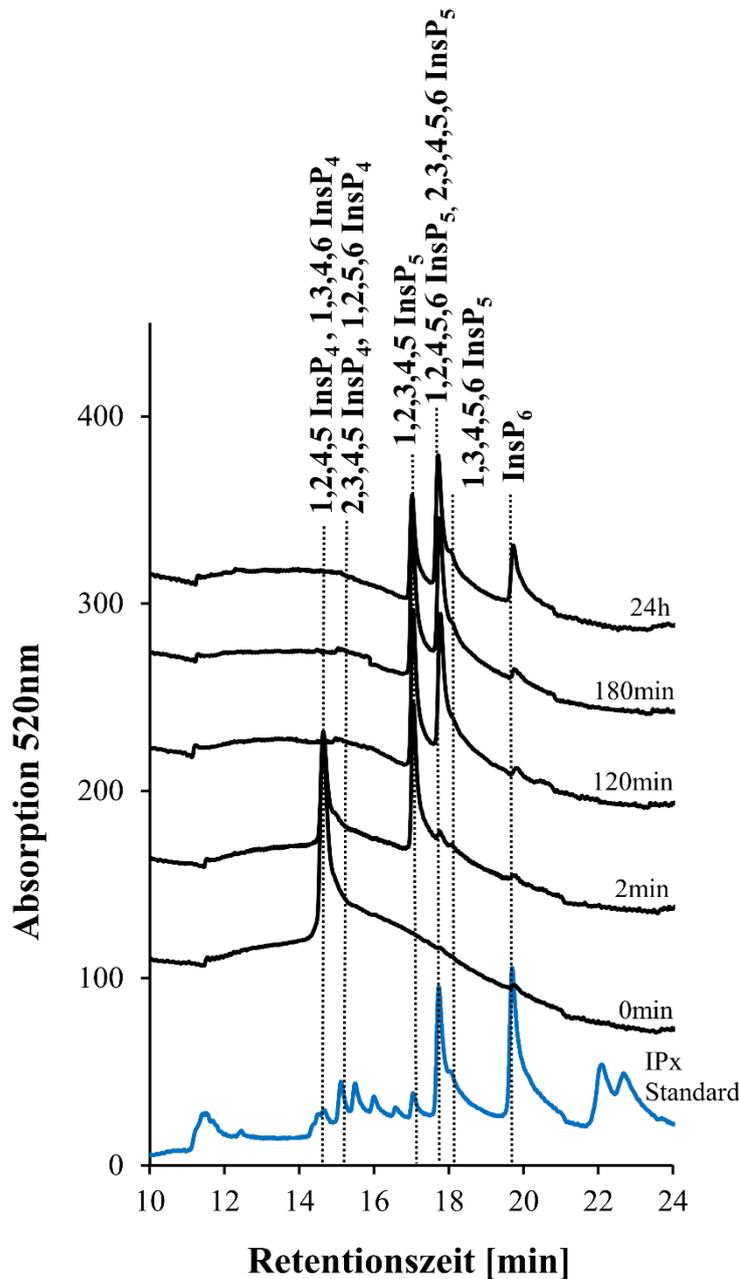


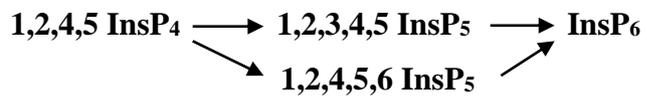
Abbildung 31: Chromatogramm – Umsatz von 1,2,4,5 InsP₄ durch die TvIPK-1

Das Substrat 1,2,4,5 InsP₄ liegt als Enantiomergemisch zusammen mit 2,3,4,5 InsP₄ vor und ist mit 4% 1,3,4,6 InsP₄ kontaminiert, welches bei derselben Retentionszeit eluiert. Außerdem ist es mit 10% 2,3,4,5 InsP₄ und 1% InsP₆ verunreinigt. 2,3,4,5 InsP₄ liegt ebenfalls als Enantiomergemisch mit 1,2,5,6 InsP₄ vor.

1,2,4,5 InsP₄ wird in einer schnellen Reaktion an der 3-OH Gruppe zu 1,2,3,4,5 InsP₅ phosphoryliert. Außerdem wird ein Teil des 1,2,4,5 InsP₅ an der 6-OH Position zu 1,2,4,5,6 InsP₅ phosphoryliert. Beide InsP₅ werden weiter zu InsP₆ phosphoryliert. 1,3,4,6

InsP₄ wird an der 5-OH Position zu 1,3,4,5,6 InsP₅ phosphoryliert (s. 3.3.11). 2,3,4,5 InsP₅ wird an seiner 6-OH Position zu 2,3,4,5,6 InsP₅ phosphoryliert. 1,2,5,6 InsP₄ wird zu 1,2,4,5,6 InsP₅ phosphoryliert.

Zusammenfassend ergeben sich folgender Reaktionswege:



3.3.15 Umsatz von D-1,3,4,5 InsP₄

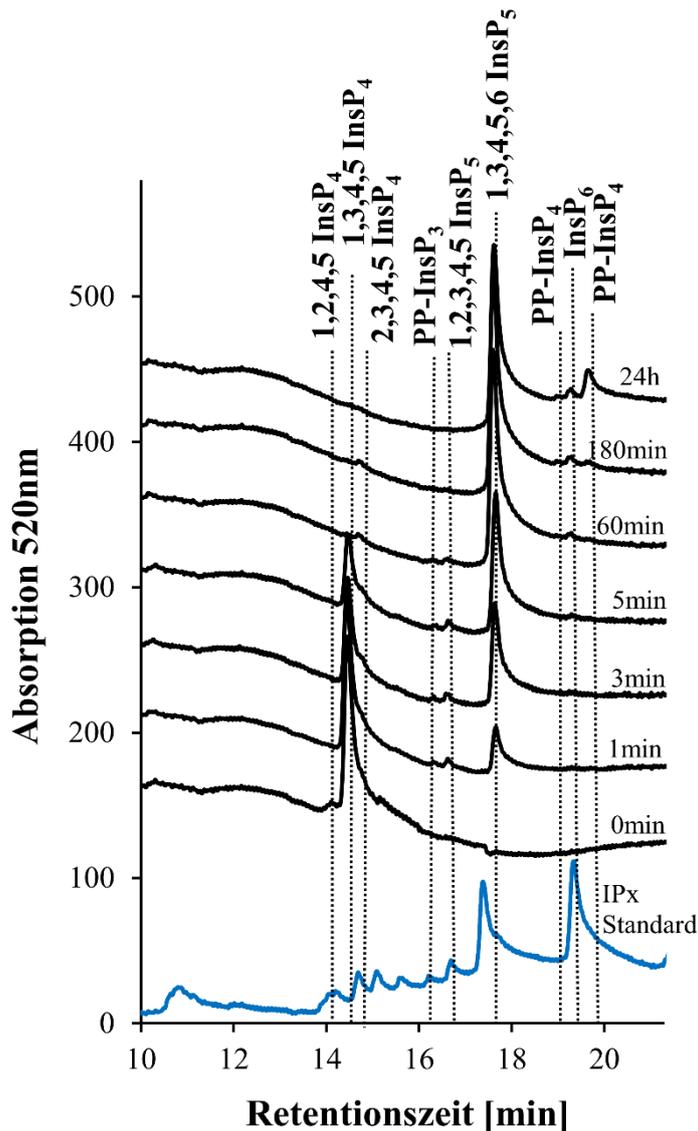
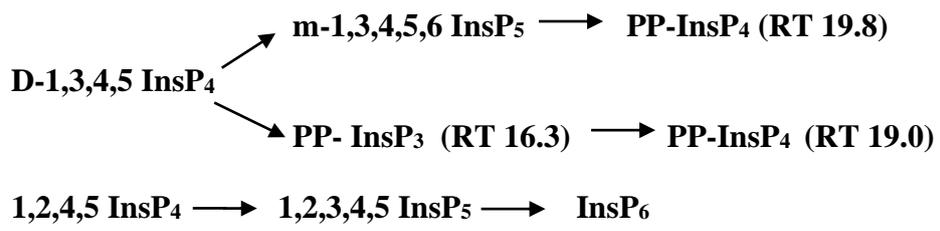


Abbildung 32: Chromatogramm – Umsatz von D-1,3,4,5 InsP₄ durch die TvIPK-1

Das Chromatogramm zeigt den Umsatz von D-1,3,4,5 InsP₄. Das Substrat enthält als Verunreinigung 2,33% 1,2,4,5 InsP₄ und 3,5% 2,3,4,5 InsP₄. 17 μM D-1,3,4,5 InsP₄ werden in einer schnellen Reaktion von der TvIPMK in einer Ansatzkonzentration von 9,17 mg/l an der 6-OH Position phosphoryliert, sodass 1,3,4,5,6 InsP₅ entsteht, welches in einer langsamen Reaktion über Nacht an einer unbekanntem Position weiter zu einem PP-InsP₄ (Retentionszeit 19,8 Min.) pyrophosphoryliert wird. Außerdem wird D-1,3,4,5 InsP₄ an unbekannter Stelle zu einem PP-InsP₃ pyrophosphoryliert. Diese ist nach 180 min. nicht mehr nachweisbar, gleichzeitig eluiert als Produkt bei einer Retentionszeit von 18,99 Minuten ein zweites PP-InsP₄. 1,2,4,5 InsP₄ wird zu 1,2,3,4,5 InsP₅ phosphoryliert, welches weiter zu InsP₆ phosphoryliert wird.

Zusammenfassend ergeben sich folgende Reaktionswege:



3.3.16 Umsatz von 1,3,4,6 InsP₄

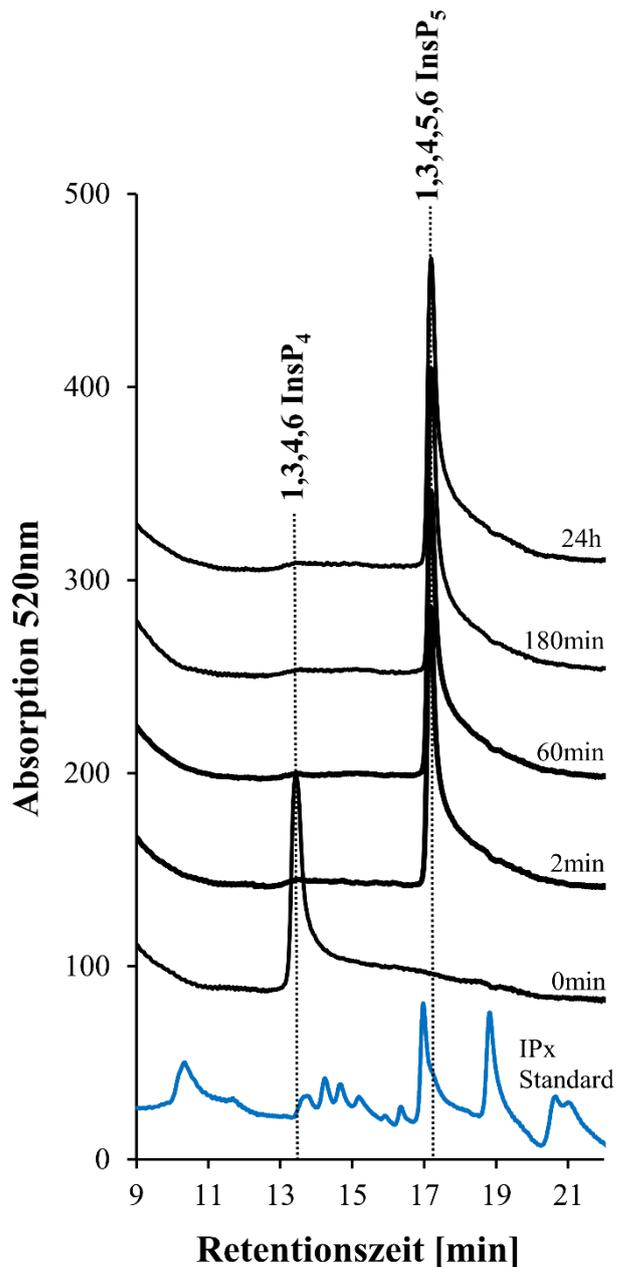
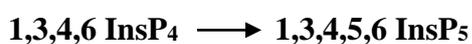


Abbildung 33: Chromatogramm – Umsatz von 1,3,4,6 InsP₄ durch die TvIPK-1

Das Chromatogramm zeigt den extrem schnellen Umsatz von 1,3,4,6 InsP₄ durch die TvIPMK. Innerhalb von einer Minute wird das Substrat vollständig umgesetzt. Dabei wird es an der 5-Position zu 1,3,4,5,6 InsP₅ phosphoryliert. Hierbei handelt es sich um eine Reaktion mit einem sehr niedrigen K_m -Wert.

Zusammenfassend ergibt sich folgender Reaktionsweg:



3.3.17 Umsatz von 1,3,5,6 InsP₄

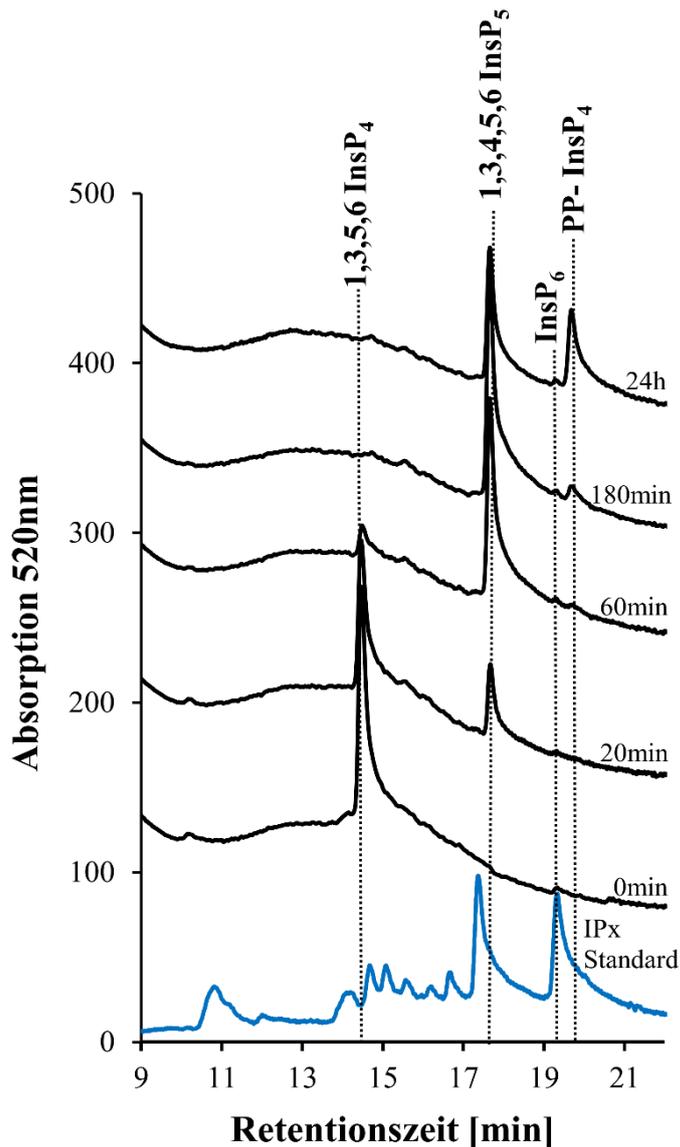


Abbildung 34: Chromatogramm – Umsatz von 1,3,5,6 InsP₄ durch die TvIPK-1

Das Chromatogramm zeigt den Umsatz von 1,3,5,6 InsP₄, welches mit 1,6% InsP₆ verunreinigt ist. 10 μM 1,3,5,6 InsP₄ werden an der 4-OH Position von 9,2 mg/l Enzym phosphoryliert, sodass 1,3,4,5,6 InsP₅ entsteht. Durch Pyrophosphorylierung an unbekannter Stelle entsteht aus diesem ein PP-InsP₄ (s.3.3.24). Das InsP₆ wird nicht verstoffwechselt.

Zusammenfassend ergeben sich folgende Reaktionswege:



3.3.18 Umsatz von 1,4,5,6 InsP₄

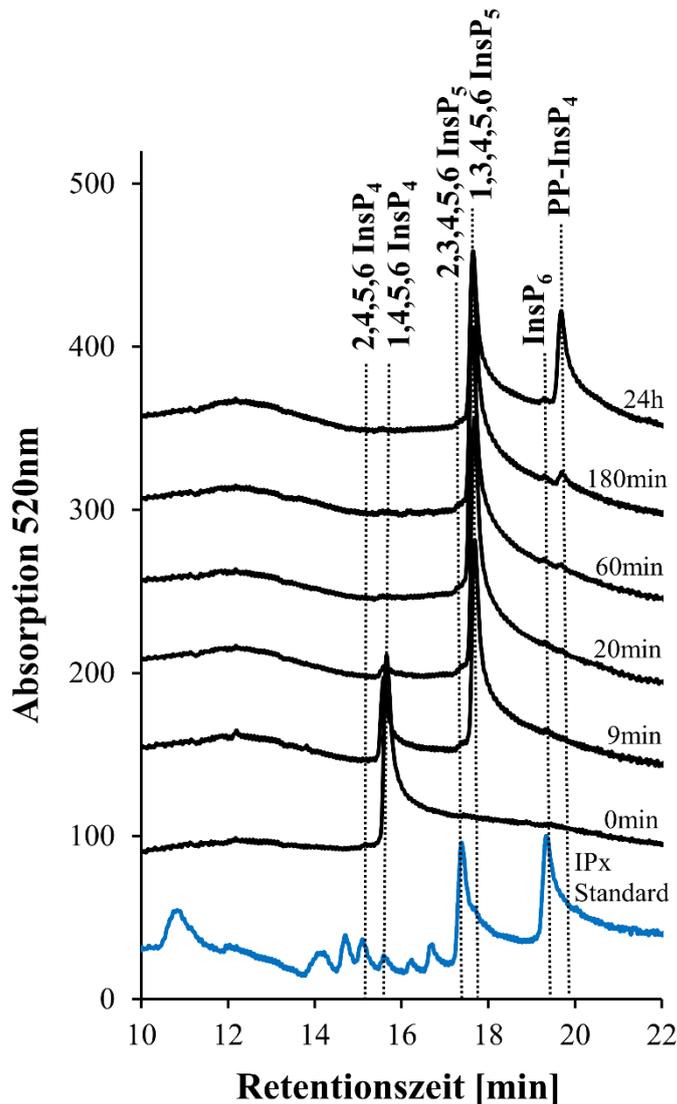


Abbildung 35: Chromatogramm – Umsatz von D-1,4,5,6 InsP₄ durch die TvIPK-1

Das Chromatogramm zeigt den Umsatz von 1,4,5,6 InsP₄. Das Ausgangssubstrat ist zu 0,4% mit 2,4,5,6 InsP₄ verunreinigt. 21 μM 1,4,5,6 InsP₄ werden schnell an der 3-Position zu 1,3,4,5,6 InsP₅ phosphoryliert. Letzteres wird über Nacht an 4- oder 6-Position zu einem PP-InsP₄ pyrophosphoryliert. Das 2,4,5,6 InsP₄ wird an der 3-OH Position phosphoryliert, sodass 2,3,4,5,6 InsP₅ entsteht, welches weiter zu InsP₆ phosphoryliert wird.

Zusammenfassend ergeben sich folgende Reaktionswege:



3.3.19 Umsatz von 2,4,5,6 InsP₄

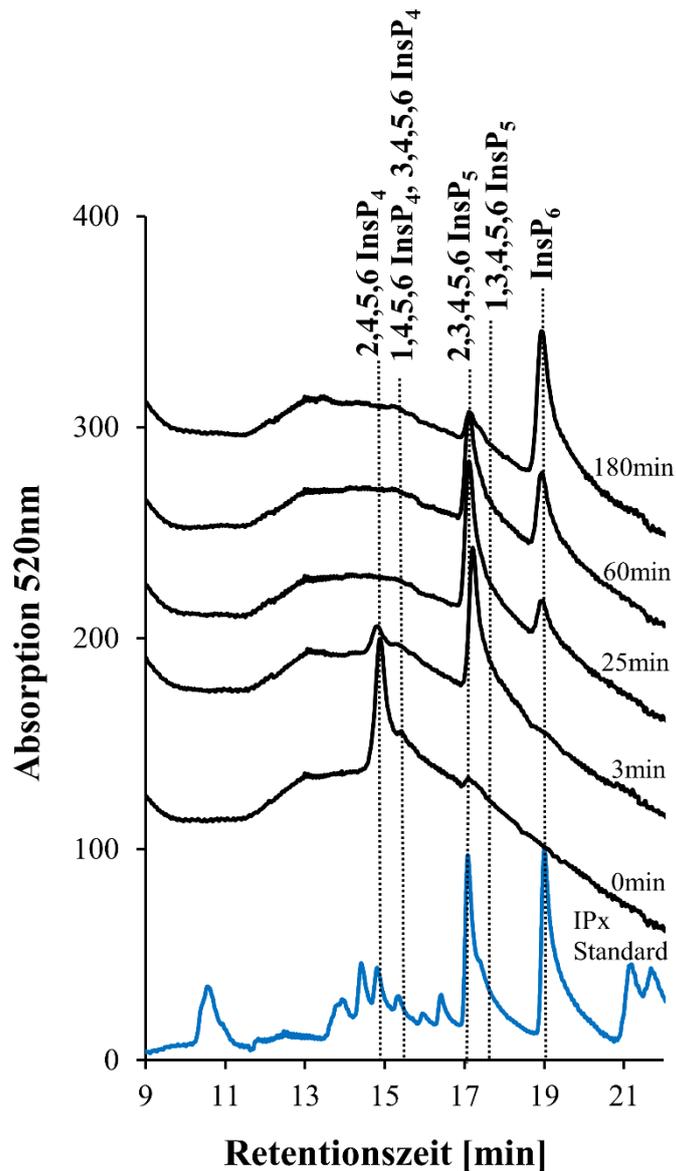
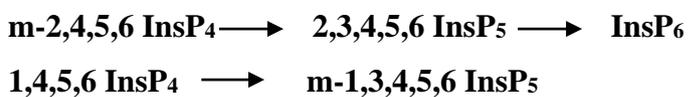


Abbildung 36: Chromatogramm – Umsatz von *m*-2,4,5,6 InsP₄ durch die TvIPK-1

Das Substrat 2,4,5,6 InsP₄ ist mit 7% 1,4,5,6 InsP₄ verunreinigt. 15 μM *m*-2,4,5,6 InsP₄ wird sehr schnell von 1,83 mg/l Enzym innerhalb der ersten Minute fast vollständig an der 3-OH Position zu 2,3,4,5,6 InsP₅ phosphoryliert. Letzteres wird in einer langsamen Reaktion an der 3-Position phosphoryliert, sodass InsP₆ entsteht. Das enthaltene 1,4,5,6 InsP₄ wird zu *m*-1,3,4,5,6 InsP₅ umgesetzt.

Zusammenfassend ergeben sich folgende Reaktionswege:



3.3.20 Umsatz von D-3,4,5,6 InsP₄

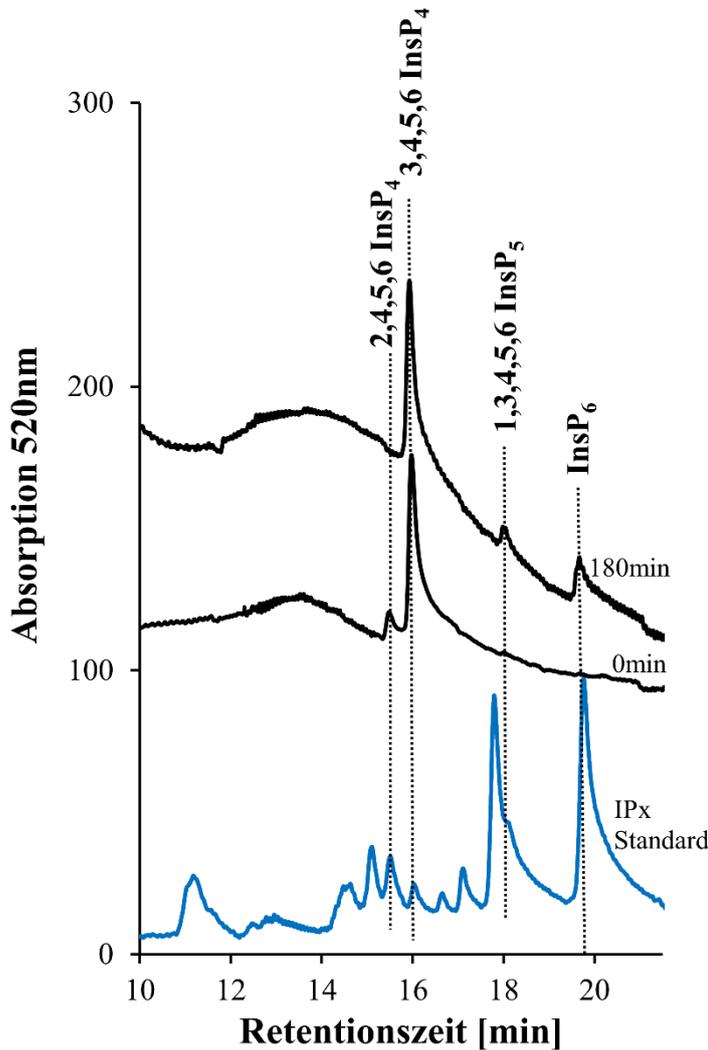


Abbildung 37: Chromatogramm – Umsatz von D-3,4,5,6 InsP₄ durch die TvIPK-1

Das Substrat D-3,4,5,6 InsP₄ ist mit geringen Mengen 7,55% m-2,4,5,6 InsP₄ verunreinigt. Zusätzlich liegt es als Enantiomergemisch zusammen mit 1,4,5,6 InsP₄ vor. Letzteres wird an der 3-OH Position zu 1,3,4,5,6 InsP₅ phosphoryliert. 2,4,5,6 InsP₄ wird zunächst zu 2,3,4,5,6 InsP₅ und dann zu InsP₆ phosphoryliert (s.3.3.19). Daraus lässt sich ableiten, dass D-3,4,5,6 InsP₄ kein Substrat ist.

Zusammenfassend ergeben sich folgende Reaktionswege:

3,4,5,6 InsP₄ - keine Reaktion

1,4,5,6 InsP₄ → m-1,3,4,5,6 InsP₅

m-2,4,5,6 InsP₄ → 2,3,4,5,6 InsP₅ → InsP₆

3.3.21 Umsatz von 1,2,3,4,5 InsP₅

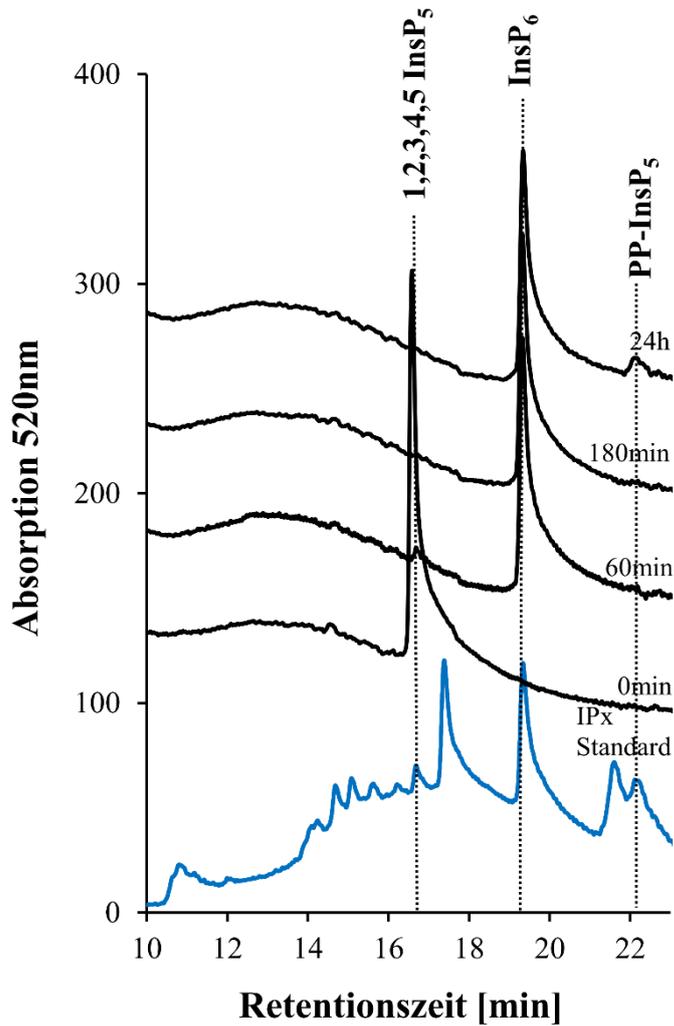
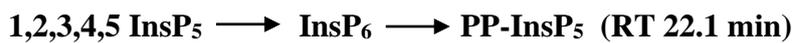


Abbildung 38: Chromatogramm – Umsatz von 1,2,3,4,5 InsP₅ durch die TvIPK-1

1,2,3,4,5 InsP₅ ist ein hochreines Substrat, welches an der 6-OH Stelle zu InsP₆ phosphoryliert wird (s.3.3.21). InsP₆ wird in einer sehr langsamen Reaktion über Nacht an der 1-, 2- oder 3-Position zu 1/2/3PP-InsP₅ pyrophosphoryliert.

Zusammenfassend ergibt sich folgender Reaktionsweg:



3.3.22 Umsatz von 1,2,3,4,6 InsP₅

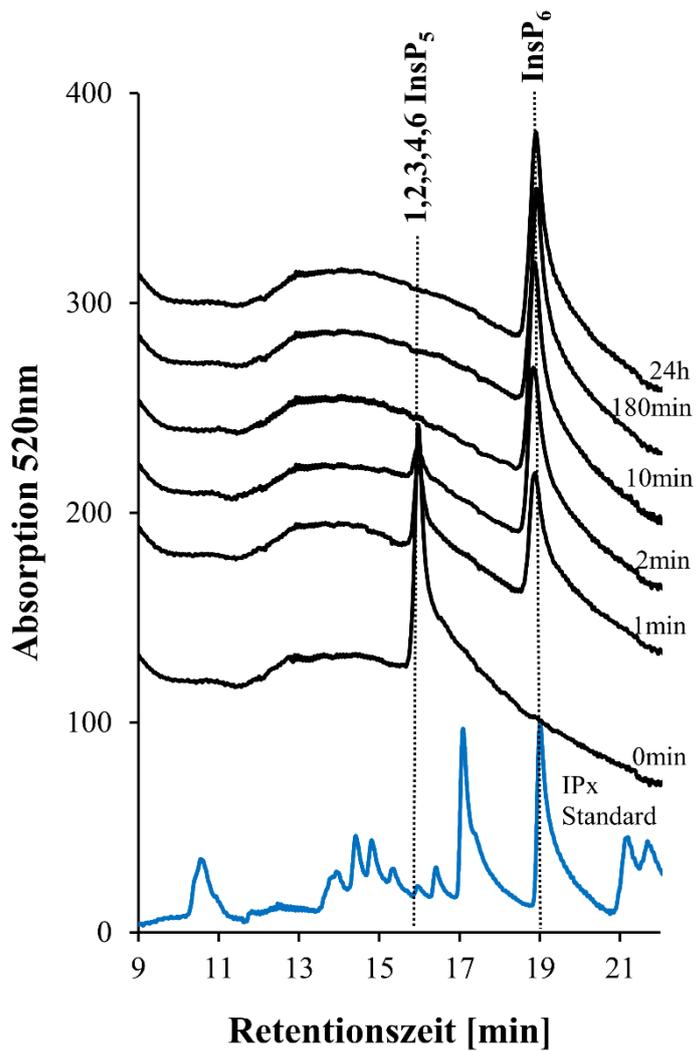


Abbildung 39: Chromatogramm – Umsatz von 1,2,3,4,6 InsP₅ durch die TvIPK-1

1,2,3,4,6 InsP₅ ist ein hochreines Substrat, das an der 5-OH Position phosphoryliert wird, sodass InsP₆ entsteht.

Zusammenfassend ergibt sich folgender Reaktionsweg:



3.3.23 Umsatz von 1,2,4,5,6 InsP₅

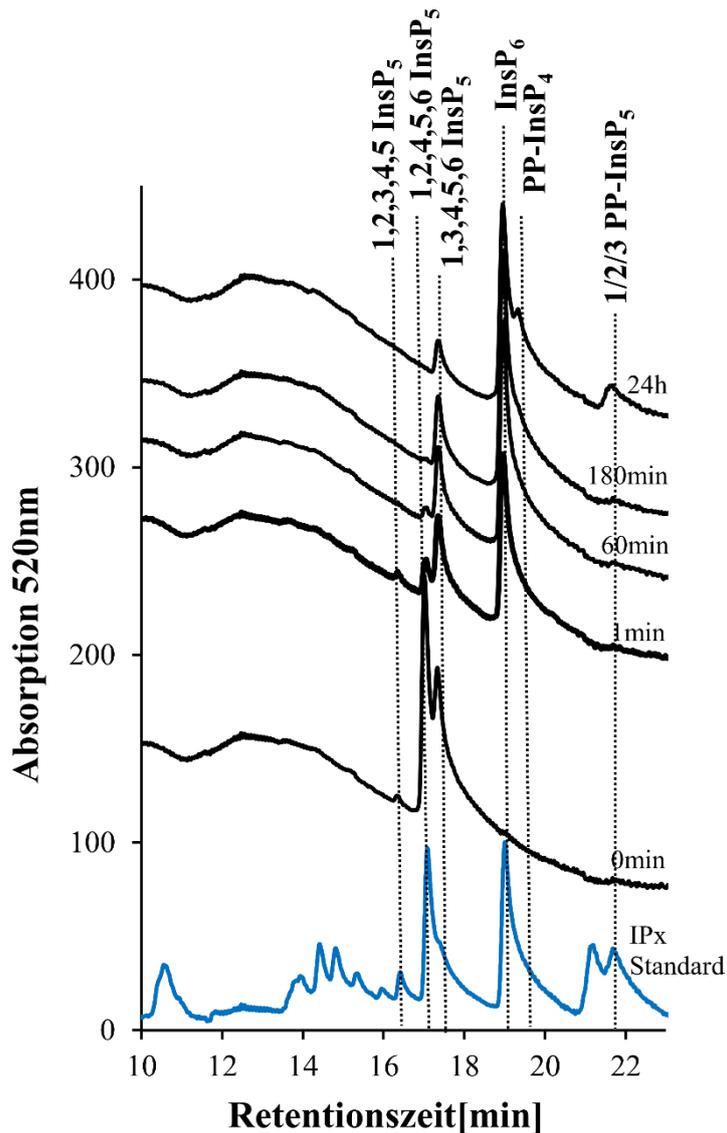
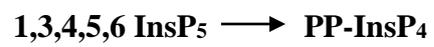


Abbildung 40: Chromatogramm – Umsatz von 1,2,4,5,6 InsP₅ durch die TvIPK-1

Das Substrat 1,2,4,5,6InsP₅ ist mit geringen Mengen 0,377% 1,2,3,4,5 InsP₅ und 31,3% 1,3,4,5,6 InsP₅ verunreinigt. 1,2,4,5,6 InsP₅ wird in einer schnellen initialen Reaktion innerhalb von 1 Minute fast vollständig umgesetzt und an der 5-OH Stelle phosphoryliert, sodass InsP₆ entsteht. 1,2,3,4,5 InsP₅ wird an der 6-Stelle phosphoryliert, sodass ebenfalls InsP₆ entsteht. InsP₆ reagiert in einer langsamen Reaktion über Nacht weiter zu PP-InsP₅ und wird dabei entweder an der 1-, 2- oder 3-Position pyrophosphoryliert. Eine genaue Identifikation der Struktur ist anhand der MDD-HPLC nicht möglich. 1,3,4,5,6 InsP₅ wird in einer sehr langsamen Reaktion an unbekannter Stelle pyrophosphoyliert, sodass ein PP-InsP₄ entsteht.

Zusammenfassend ergeben sich folgende Reaktionswege:



3.3.24 Umsatz von 1,3,4,5,6 InsP₅

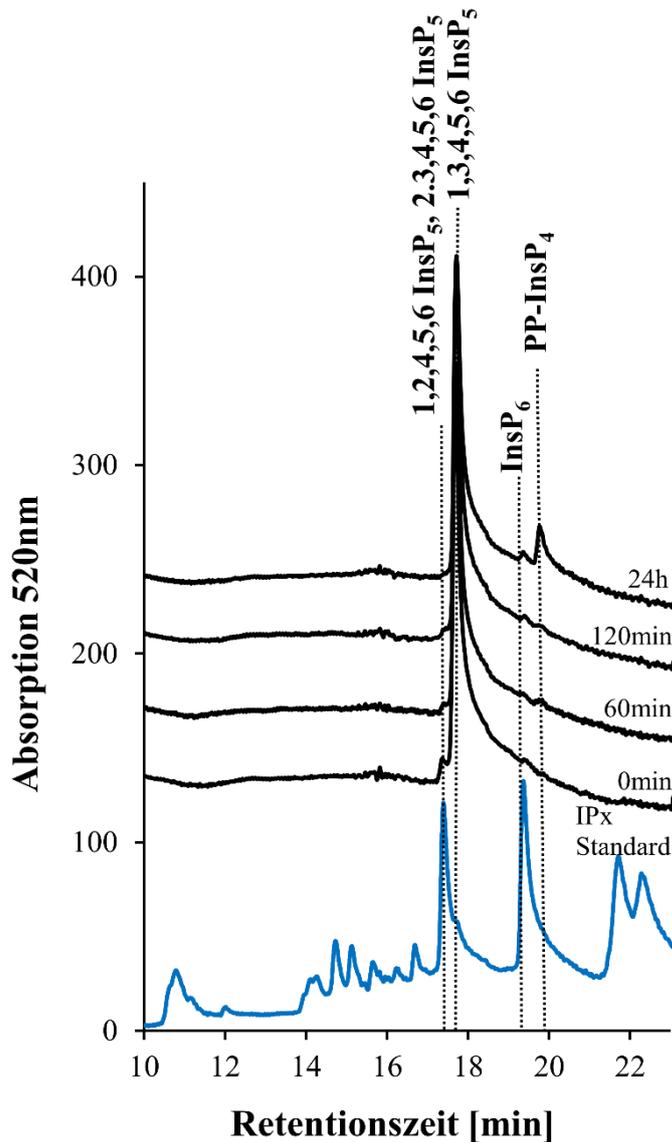


Abbildung 41: Chromatogramm – Umsatz von 1,3,4,5,6 InsP₅ durch die TvIPK-1

1,3,4,5,6 InsP₅ ist mit 3% 1,2,4,5,6 InsP₅/ 2,3,4,5,6 InsP₅ verunreinigt. 1,3,4,5,6 InsP₅ wird in einer langsamen Reaktion zu einem PP-InsP₄ pyrophosphoryliert, das bei einer Retentionszeit von 19,9 Minuten eluiert. 1,2,4,5,6 InsP₅ wird nur langsam zu InsP₆ phosphoryliert (s. 3.3.21). Dies hängt vermutlich mit einer inhibitorischen Wirkung seines Enantiomers 2,3,4,5,6 InsP₅ zusammen.

Zusammenfassend ergibt sich folgender Reaktionsweg:



3.3.25 Umsatz von InsP₆

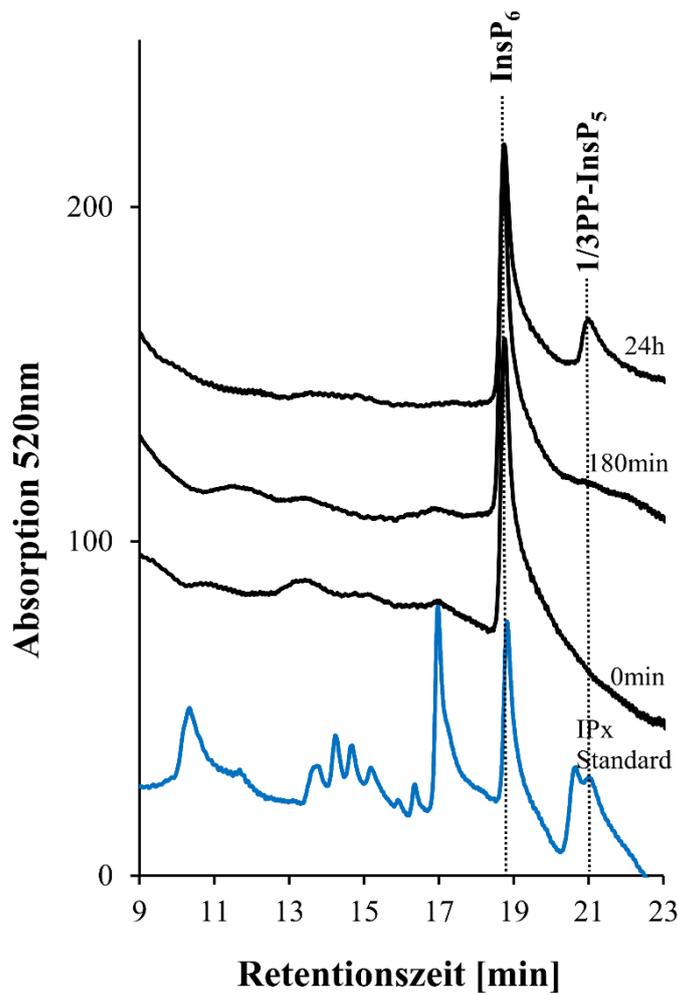


Abbildung 42: Chromatogramm – Umsatz von InsP₆ durch die TvIPK-1

InsP₆ ist ein hochreines Substrat, welches über Nacht an unbekannter Position pyrophosphoryliert wird, sodass 1- oder 3-PP-InsP₅ entsteht. Eine Determinierung der genauen Pyrophosphorylierungsstelle ist durch die MDD-HPLC nicht möglich.

Zusammenfassend ergibt sich folgender Reaktionsweg:



3.3.26 Überblick über die Substratspezifität der TvIPK-1

Die nachstehende Tabelle fasst die oben beschriebenen Reaktionswege und die daraus resultierenden Substrat-Produkt Beziehungen im Überblick zusammen.

InsP	Substrat	Produkte
InsP ₂	1,4 InsP ₂	1,3,4 InsP ₃
	4,5 InsP ₂	3,4,5 InsP ₃ → 3,4,5,6 InsP ₄ + PP-InsP ₂ 4,5,6 InsP ₃ → 3,4,5,6 InsP ₄ + PP-InsP ₂
InsP ₃	1,2,5 InsP ₃	1,2,5,6 InsP ₄
	1,2,6 InsP ₃	kein Substrat
	1,3,4 InsP ₃	1,3,4,6 InsP ₄ → m-1,3,4,5,6 InsP ₅ → PP-InsP ₄
	1,4,5 InsP ₃	1,3,4,5 InsP ₄ → 1,3,4,5,6 InsP ₅ 1,4,5,6 InsP ₄ → 1,3,4,5,6 InsP ₅
	1,4,6 InsP ₃	1,4,5,6 InsP ₄ → 1,3,4,5,6 InsP ₅ → PP-InsP ₄
	2,3,4 InsP ₃	kein Substrat
	2,3,5 InsP ₃	2,3,5,6 InsP ₄
	D-2,4,5 InsP ₃	2,3,4,5 InsP ₄ → 2,3,4,5,6 InsP ₅ → InsP ₆ 2,4,5,6 InsP ₄ → 2,3,4,5,6 InsP ₅ → InsP ₆
	3,4,5 InsP ₃	3,4,5,6 InsP ₄ + PP-InsP ₂
	D-3,4,6 InsP ₃	3,4,5,6 InsP ₄
	4,5,6 InsP ₃	3,4,5,6 InsP ₄ + PP-InsP ₂
InsP ₄	1,2,3,4 InsP ₄	1,2,3,4,6 InsP ₅ → InsP ₆
	1,2,3,5 InsP ₄	1,2,3,5,6 InsP ₅ → InsP ₆ 1,2,3,4,5 InsP ₅ → InsP ₆
	D-1,2,3,6 InsP ₄	1,2,3,5,6 InsP ₅ → InsP ₆ → 1/2/3PP-InsP ₅
	1,2,4,5 InsP ₄	1,2,3,4,5 InsP ₅ → InsP ₆ 1,2,4,5,6 InsP ₅ → InsP ₆
	1,2,5,6 InsP ₄	1,2,4,5,6 InsP ₅ → InsP ₆
	D-1,3,4,5 InsP ₄	m-1,3,4,5,6 InsP ₅ → PP-InsP ₄ PP-InsP ₃ → PP-InsP ₄
	1,3,4,6 InsP ₄	1,3,4,5,6 InsP ₅
	1,3,5,6 InsP ₄	1,3,4,5,6 InsP ₅ → PP-InsP ₄
	1,4,5,6 InsP ₄	m-1,3,4,5,6 InsP ₅ → PP-InsP ₄

	2,3,4,5 InsP ₄	2,3,4,5,6 InsP ₅
	2,4,5,6 InsP ₄	2,3,4,5,6 InsP ₅ → InsP ₆
	D-3,4,5,6 InsP ₄	kein Substrat
InsP ₅	1,2,3,4,5 InsIP ₅	InsP ₆ → 1/2/3PP-InsP ₅
	1,2,3,4,6 InsIP ₅	InsP ₆
	1,2,3,5,6 InsIP ₅	InsP ₆
	1,2,4,5,6 InsIP ₅	InsP ₆ → 1/2/3PP-InsP ₅
	1,3,4,5,6 InsP ₅	PP-InsP ₄
InsP ₆	InsP ₆	1/2/3PP-InsP ₅

Tabelle 12: Substratanalyse der TvIPK-1

Dargestellt sind alle getesteten Substrate der TvIPK-1, sowie die identifizierten Produkte.

Alle Substrate wurden im enzymatisch optisch-gekoppelten Test vermessen. Für die Substrate, welche in der initialen Analyse im optisch-gekoppelten Test und in der Analyse durch die MDD-HPLC die höchsten Umsatzraten zeigten, wurde die spezifische Aktivität, sowie die initiale Umsatzgeschwindigkeit und apparenten Km-Werte ermittelt. Enantiomergemische und sehr unreine Substratgemische mit Ausnahme des sehr gut umgesetzten Substratgemischs 1,2,4,5 InsP₄/1,3,4,6 InsP₄ wurden für diese Analyse nicht benutzt. Grund hierfür ist, dass sich die einzelnen Substrate und deren entstehenden Produkte den Umsatz durch das Enzym gegenseitig beeinflussen und die ermittelten spezifischen Umsatzraten nicht mehr spezifisch für das Substrat sind, sondern vielmehr für das Substratgemisch. Eine Auswertung aller Substrate unter Berücksichtigung der Substratgemische und unter Zusammenführung der Auswertung mittels optischem Test und MDD-HPLC findet sich im Anhang in Abbildung 75.

Substrat	c_{Substrat}	Spezifische Aktivität (U/mg)	V_{initial} (μmol/min.)	Km apparent (μM)	n
1,4,5 InsP ₃	5μM	3,54 ± 0,52	9,72 ± 1,44	1,57 ± 0,21	3
	10μM	6,61 ± 0,64	18,16 ± 1,76	2,77 ± 0,24	3
	15μM	7,86 ± 1,37	21,60 ± 3,77	4,2 ± 0,52	3
1,4,6 InsP ₃	5μM	0,85 ± 0,07	2,34 ± 0,21	0,85 ± 0,36	3
1,3,4,6 InsP ₄	5μM	36,66 ± 5,43	2,52 ± 0,37	0,42 ± 0,04	3
	10μM	59,29 ± 5,57	2,96 ± 0,29	0,59 ± 0,05	3
1,2,4,5 InsP ₄	15μM	36,051 ± 3,342	6,23 ± 0,18	0,23 ± 0,10	2
D-1,3,5,6 InsP ₄	10μM	0,142	0,592	-	1

1,2,3,5 InsP ₄	5µM	0,01 ± 0,00	0,20 ± 0,11	-	3
1,2,4,5,6 InsP ₅	5µM	15,88 ± 0,86	4,37 ± 0,24	0,32 ± 0,11	3
	10µM	30,65 ± 1,16	8,77 ± 0,51	1,49 ± 0,29	3
	20µM	46,39 ± 0,69	7,96 ± 0,51	1,40 ± 0,13	2
1,2,3,4,6 InsP ₅	5µM	2,48 ± 0,29	6,82 ± 0,79	1,11 ± 0,62	3
1,2,3,4,5 InsP ₅	5µM	0,03 ± 0,001	0,80 ± 0,20	-	2

Tabelle 13: Substratanalyse der TvIPK-1 – Enzymkinetik

Die Tabelle verdeutlicht, dass das Hauptsubstrat des Enzyms 1,3,4,6 InsP₄ ist. Vergleicht man die spezifischen Aktivität der einzelnen Substrate bei einer Substratkonzentration von 5µM, so ist die spezifische Aktivität für das zweitbeste Substrat 1,2,4,5,6 InsP₅ 56,6% niedriger als die spezifische Aktivität für 1,3,4,6 InsP₄. Für das viertbeste Substrat 1,4,5 InsP₃ hat das Enzym schon eine 90,35% niedrigere Aktivität als für 1,3,4,6 InsP₄.

Die oben stehenden apparenten K_m-Werte wurden aus dem optischen Tests mittels single Transient Bestimmung ermittelt, das heißt bei den apparenten halb maximalen Werten waren bereits signifikante Produktkonzentrationen vorhanden, welche das Enzym im Sinne einer Produktinhibition hemmen können.

Die Extrapolation der apparenten Km Werte gegenüber den Substratkonzentrationen ergab den realen Km Wert.

Substrat	Spezifische Aktivität (U/mg)	Km real (µM)	Katalytische Effizienz (l/min. mg)
1,3,4,6 InsP ₄	59,29 ± 5,57	0,14 ± 0,08	423,5
1,2,4,5,6 InsP ₅	46,39 ± 0,69	0,12 ± 0,05	386,6
1,2,4,5 InsP ₄	36,051 ± 3,342	0,23 ± 0,10	156,7
1,4,5 InsP ₃	7,86 ± 1,37	0,50 ± 0,30	15,72
1,2,3,4,6 InsP ₅	2,48 ± 0,29	0,42 ± 0,25	5,91
1,4,6 InsP ₃	0,85 ± 0,07	0,55 ± 0,32	1,54

Tabelle 14: Substratanalyse der TvIPK-1 – Katalytische Effizienz

Einschränkend muss zu der oben genannten Auswertung hinzugefügt werden, dass nicht für alle getesteten Substrate die maximale Umsatzgeschwindigkeit bestimmt wurde.

Gemäß der Michaelis Menten Kinetik ergibt sich eine hohe Effizienz des Enzymes nicht nur aus einer hohen Umsatzgeschwindigkeit, sondern auch aus der Affinität eines Enzyms

zum Substrat. Diese spiegelt sich in der Michaelis-Menten Konstante K_m wider. Je höher die maximale Umsatzgeschwindigkeit eines Substrates bei gleichzeitig niedrigem K_m Wert ist, desto höher ist die katalytische Effizienz.

Dies sieht man beispielhaft an den beiden besten Substraten: 1,3,4,6 InsP₄, welches von den getesteten Enzymen die höchste katalytische Effizienz mit 423,5 l/min. mg hat, hat auch die höchste erfasste spezifische Aktivität von 59,29 U/mg bei gleichzeitig dem niedrigstem bestimmten K_m Wert von 0,14µM.

1,4,5 InsP₃ hat in Vergleich zum Substrat 1,3,4,6 InP₄ bereits nur 3,7% der katalytischen Effizienz des genannten Substrates, einhergehend mit einer wesentlich geringeren spezifischen Aktivität von 7,86 U/mg und einem extrapolierten K_m Wert von 0,50µM.

3.3.27 Kinetische Charakterisierung des Umsatzes des Hauptsubstrates 1,3,4,6 InsP₄

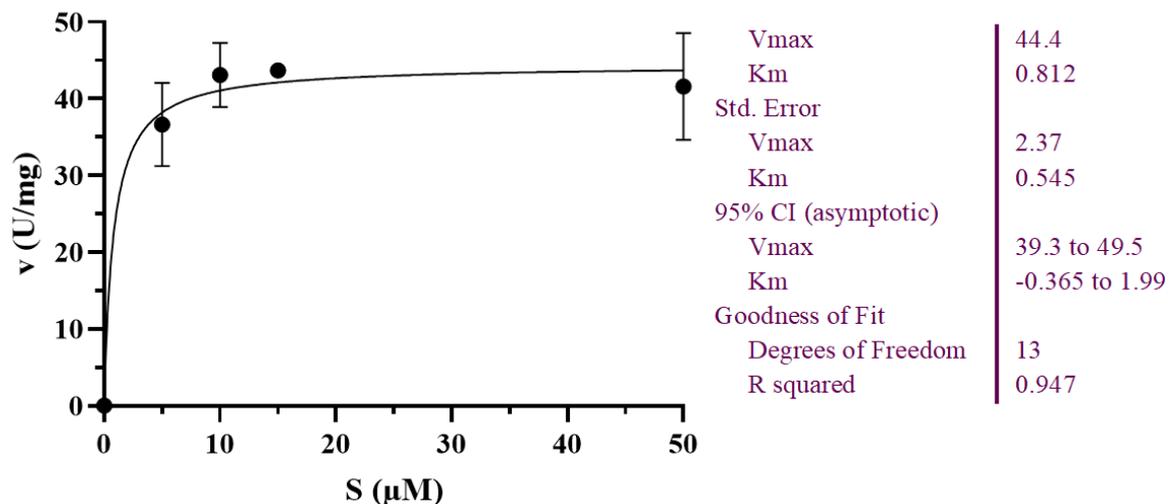


Abbildung 43: Michaelis Menten Kinetik - Umsatz von 1,3,4,6 InsP₄ durch die TvIPK-1 (n=3)

Die Grafik stellt den Umsatz des Substrates 1,3,4,6 InsP₄ durch die TvIPK-1 dar. Dargestellt ist die Michaelis-Menten-Kinetik. Die abgebildete Hyperbole wurde dabei mittels nicht linearem least-square fit erstellt.

3.3.28 K_m -Wert von ATP

Die Ergebnisse der K_m -Wert Bestimmung von ATP sind nachfolgend dargestellt. Die Bestimmung des K_m -Wert von ATP erfolgte bei einer Substratkonzentration von 5µM 1,3,4,6 InsP₄.

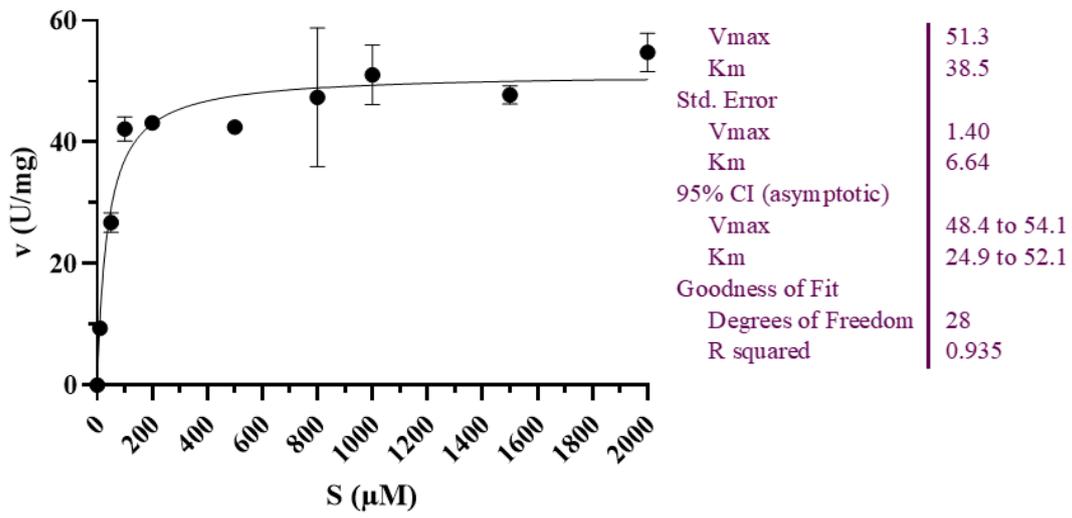


Abbildung 44: Michaelis Menten Kinetik – K_m Wert von ATP ($n=3$)

3.4 Rekombinante bakterielle Expression und Reinigung der TvIP6K4

Die Expression der TvIP6K4 erfolgte in dem Bakterienstamm BL21 (DE3) plyspREP4 mithilfe eines psK-Vektors (s. 2.4.7). Zunächst wurde für die bakterielle Expression und Reinigung der TvIP6K4 dasselbe Protokoll verwendet, welches zuvor für die TvIPMK genutzt wurde (s.2.4.7). Dargestellt sind die Ergebnisse der Expression nachfolgend:

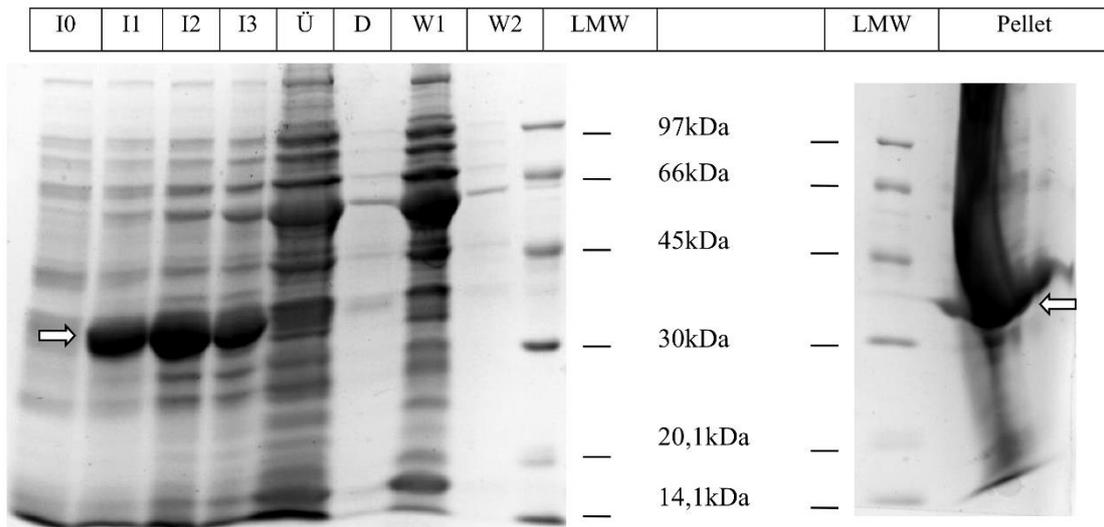


Abbildung 45: Expressionskontrollen der Proteinexpression der TvIP6K4 bei 37°C, Coomassie gefärbtes 10%iges SDS-PAGE Gel

Die Abbildung zeigt die erfolgreiche Induktion der Proteinexpression mit positiven Expressionskontrollen zum Zeitpunkt 0 Minuten (I0), sowie eine, zwei und drei Stunden nach Induktion mit IPTG (I0-I3). Hier zeichnet sich die Bande des StrepTag II-TvIP6K4 (⇔) Fusionsprotein deutlich auf der erwarteten Höhe von 37kDa ab. Im Überstand (Ü) finden sich nur noch sehr geringe Mengen des Zielproteins und starke Verunreinigungen. Deutlich erkennbar ist das Protein (⇐) jedoch im Pellet in inclusion bodies eingelagert. Konkordant mit dieser Beobachtung ist das Ergebnis der Auswertung der Aufreinigung mittels P11 Phosphocellulose per SDS-Gelelektrophorese, bei der sich geringe Mengen des Zielproteins mit signifikanten Verunreinigungen finden.

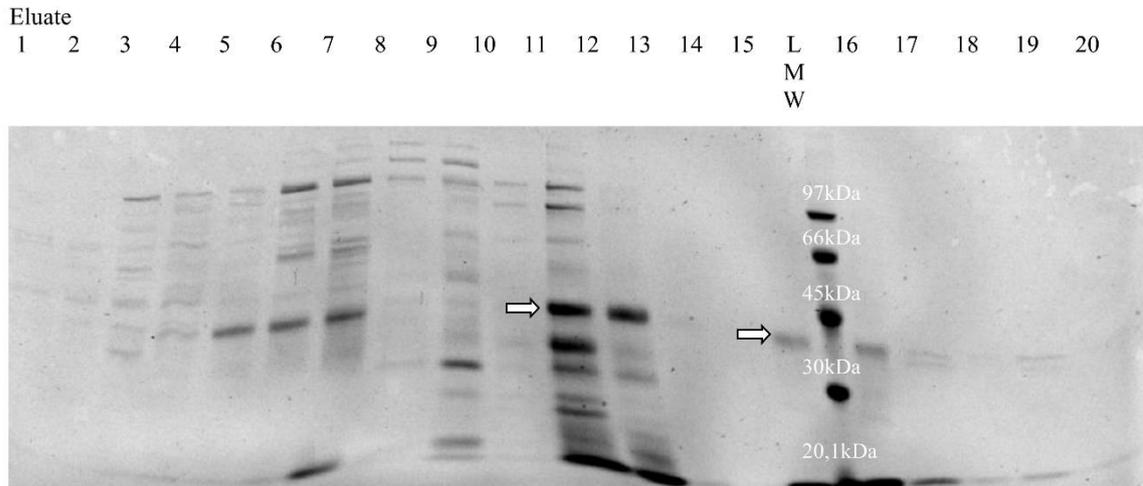


Abbildung 46: Elutionsfraktionen der TvIP6K4 nach Aufreinigung mittels P11-Phosphocellulosechromatographie, Coomassie gefärbtes 10%iges SDS-PAGE Gel

In der gezeigten Aufreinigung finden sich hauptsächlich in den Elutionsfraktionen 11,12 und 17-19 das hergestellte Protein. Auffällig ist dabei, dass bei der Elutionsfraktion 11 und 12, welche bei einer NaCl Konzentration von 500mM eluiert, zahlreiche niedermolekulare Fragmente enthalten sind. Diese könnten gekappten Proteinanteilen der TvIP6K4 entsprechen. Diese niedermolekularen Verunreinigungen sind ebenfalls im Eluat 17-19 enthalten, welches bei einer Natriumkonzentration von 1M NaCl eluiert. Auffällig ist hierbei auch, dass zwei Banden unmittelbar parallel auf Höhe der erwarteten Größe des Zielproteins (\rightleftharpoons) laufen, was die Hypothese unterstützen würde, dass von dem Zielprotein möglicherweise ein Fragment abgetrennt wurde.

3.4.1 Optimierung der Aufreinigung der TvIP6K4

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse bezüglich der Expression bei 37°C und 10°C, sowie jeweils bei unterschiedlichen IPTG Konzentrationen. Es wurden jeweils zum Vergleich der Bedingungen verglichen, indem Überstand und Pellet aufgetragen wurden, um zu ermitteln unter welchen Bedingungen sich am meisten Protein im Überstand befindet und sich die geringstmöglichen Mengen Protein im Pellet befinden.

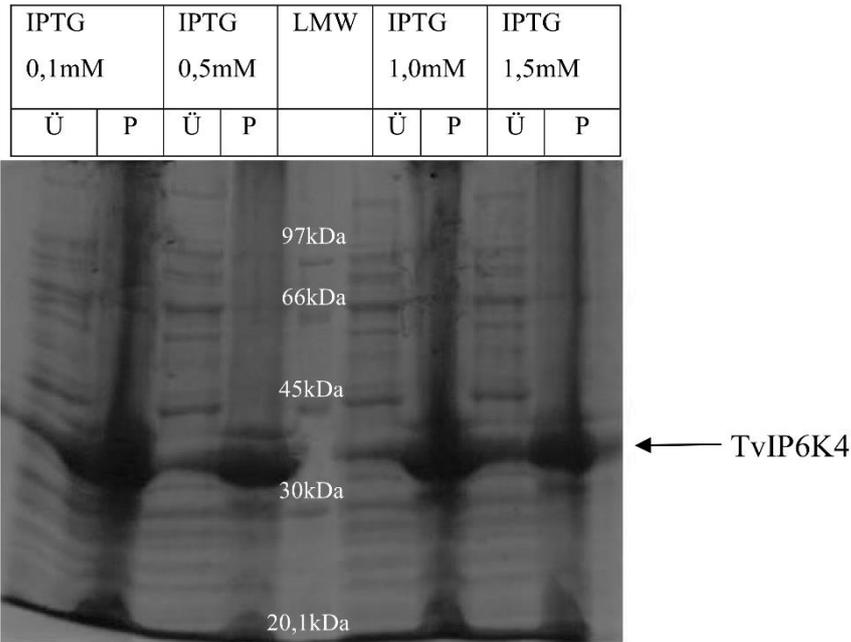


Abbildung 47: Proteinexpression der TvIP6K4 bei 37°C und unterschiedlichen IPTG Konzentrationen, Coomassie gefärbtes 10%iges SDS-PAGE Gel

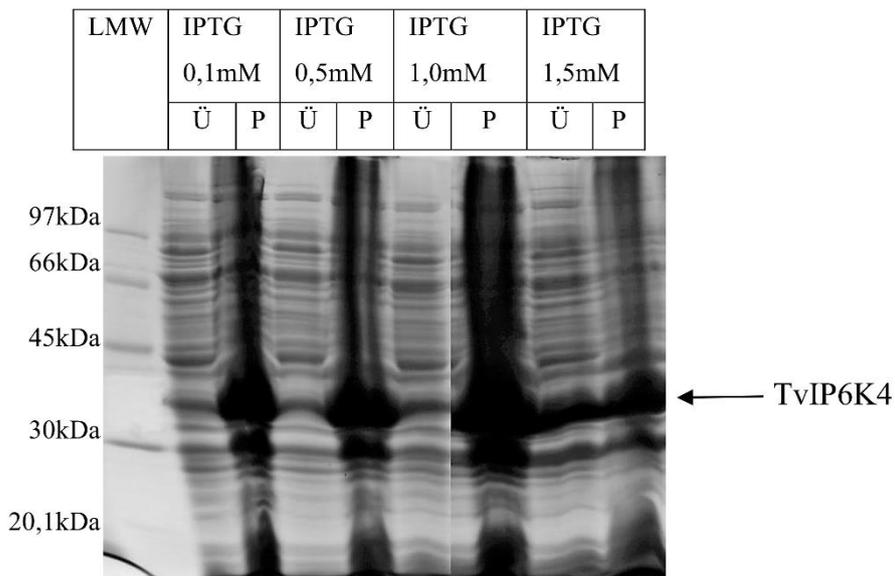


Abbildung 48: Proteinexpression der TvIP6K4 bei 10°C und unterschiedlichen IPTG Konzentrationen, Coomassie gefärbtes 10%iges SDS-PAGE Gel

Das Gel zeigt die Expressionskontrollen 2,5h nach Induktion (I1) und die Kontrolle der Expression über Nacht (I2). Vergleicht man die Expression bei 37°C und bei 10°C miteinander, so zeigen sich alle Expressionskontrollen positiv. Es zeigt sich eindeutig, dass sich bei einer Expression bei 10°C und einer Induktion mit IPTG 1,5mM das meiste Protein im Überstand zu finden ist und am wenigsten im Pellet. Dementsprechend wurde

das Expressionsprotokoll angepasst und die Induktion mit 1,5mM IPTG durchgeführt bei 10°C durchgeführt (s.2.4.8).

3.4.2 Ergebnis der optimierten Proteinexpression

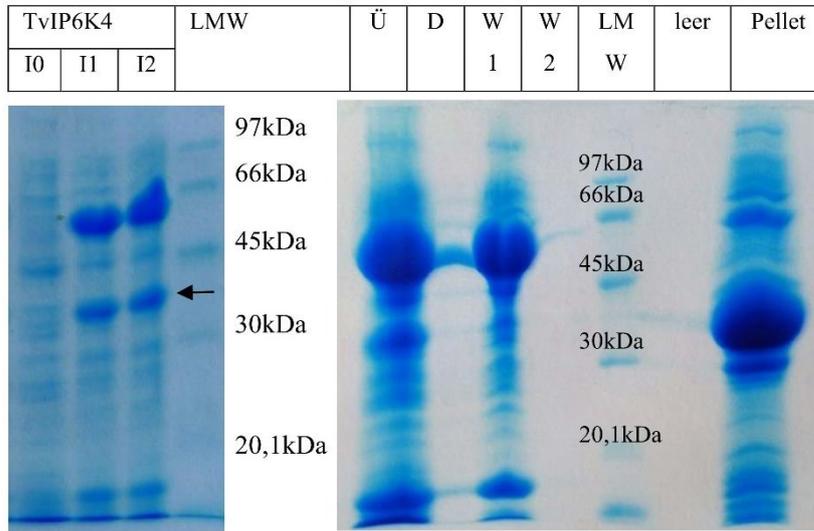


Abbildung 49: Optimierte Proteinexpression der TvIP6K4(←) Coomassie gefärbtes, 10%iges SDS-PAGE Gel

Das Gel zeigt die positiven Induktionskontrollen (I1, I2). Es findet sich unter den optimierten Bedingungen deutlich mehr Protein im Überstand, auch wenn sich im Pellet signifikante Proteinmengen finden. Große Mengen der Verunreinigung, die sich im Überstand befinden werden durch die Waschvorgänge (W1 und W2) ausgewaschen.

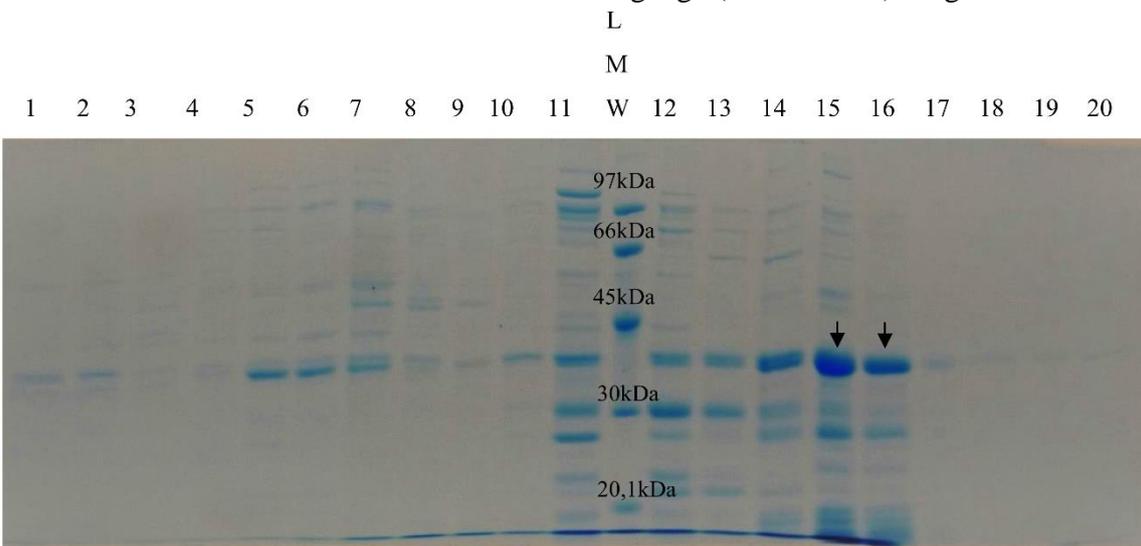


Abbildung 50: Aufreinigung der TvIP6K4 mittels P11 Phosphocellulosesäulen-chromatographie unter optimiertem Protokoll, Coomassie gefärbtes 10%iges SDS-PAGE Gel

Die Aufreinigung der TvIP6K4 mittels P11-Phosphocellulose Säulenchromatographie erfolgte nach optimiertem Protokoll (s.2.5.3). Es zeigen sich die deutlichsten Banden der TvIP6K4 in der Elutionsfraktion E15 und E16 mit einer erwarteten Größe von 37kDa.

Zur weiteren Aufreinigung wurde der P11-Phosphocellulose Säulenchromatographie die Aufreinigung mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie nachgeschaltet (s.2.5.4). In dem gezeigten Beispiel wurden die Elutionsfraktionen 15 und 16 zur weiteren Aufreinigung ausgewählt.

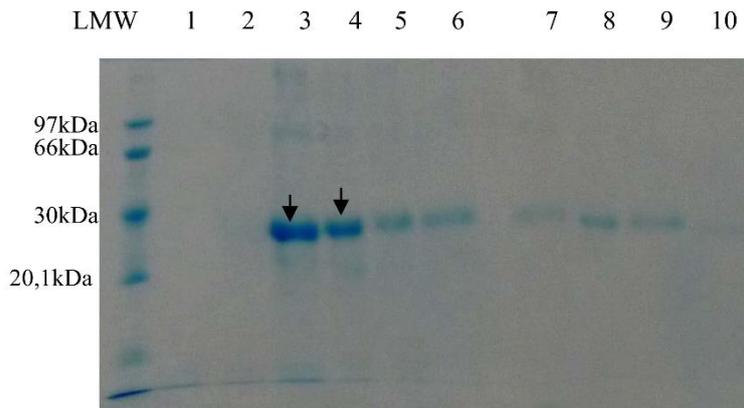


Abbildung 51: Aufreinigung der TvIP6K4 (↓) mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie, Coomassie gefärbtes 10%iges SDS-PAGE Gel

Die Abbildung zeigt die erfolgreiche Aufreinigung des StrepTagII-TvIP6K4 Fusionproteins. Es zeigt sich, dass das Protein aus der Elutionsfraktion 15 und 16 nun wesentlich reiner vorliegt als nach der Aufreinigung mittels P11-Phosphocellulose. Das Ergebnis der Aufreinigung mit P11-Phosphocellulose Säulenchromatographie und der sukzessiven Aufreinigung mit Streptavidin-Affinitätschromatographie war reproduzierbar. Dabei war die TvIP6K4 nach Aufreinigung mit P11-Phosphocellulose Säulenchromatographie aktiv, jedoch nach der Streptavidin-Affinitätschromatographie nicht mehr. Auch dieses Ergebnis war reproduzierbar. Als mögliche Ursache für die nachfolgende Inaktivität des Enzyms kommt eine Denaturierung bei der Aufreinigung mittels Streptavidin Affinitätschromatographie infrage. Möglicherweise wird aber auch ein für die Aktivität des Proteins essentielles Fragment bei der Aufreinigung entfernt.

3.5 Bestimmung der Substratspezifität der TvIP6K4

Die Bestimmung der Substratspezifität der TvIP6K4 erfolgte analog zur Bestimmung der Substratspezifität der TvIPMK. Zu Identifizierung erster Substrate erfolgte zunächst je eine Testung mit Phytinsäurehydrolysat bzw. mit einem InsP₇ Standard. Beides sind Gemische aus definierten Inositolphosphaten. Dazu wurde das Enzym mit den entsprechenden Inositolphosphatstandards versetzt und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen (s.2.5.8), die anschließend mittels MDD-HPLC aufgearbeitet wurden (s.2.5.10). Die identifizierten putativen Substrate wurden zur Verifizierung der Substrat-Produktbeziehung ausgetestet und mittels MDD-HPLC analysiert.

Bei der Auswertung der MDD-HPLC Analyse zeigte sich, dass die TvIP6K4 die Fähigkeit besitzt, zahlreiche Inositolphosphate zu pyrophosphorylieren. Bei der Durchführung der MDD-HPLC Analysen ergab sich das Problem, dass höhergradig pyrophosphorylierte Produkte ausfielen und nicht nachweisbar waren. Dies ist am ehesten darauf zurück zu führen, dass das Enzym optimal bei einer relativ hohen Konzentration an freiem MgCl₂ arbeitet und gleichzeitig zahlreiche Phosphatgruppen vorliegen, sodass es zu ein Bildung unlöslicher Produkt-Magnesium Komplexe kommt. Trotz Anpassung der MgCl₂-Konzentration ließ sich dieses Problem nicht vollständig beheben.

Die Bezeichnung der pyrophosphorylierten Produkte in dieser Arbeit beruht auf Veröffentlichungen von Hongying Lin und Torsten Wundenberg (Lin et al., 2010, Wundenberg et al., 2019). In der Arbeit von Torsten Wundenberg wurde gezeigt, dass eine sichere Identifikation der Struktur von pyrophosphorylierten Produkten - im konkreten Fall handelte es sich um ein InsP₇ - allein auf der Basis von der MDD-HPLC nicht möglich ist. Die Annotation erfolgt unter Berücksichtigung dieser wissenschaftlichen Erkenntnis in dem Bewusstsein das zur endgültigen Klärung der Struktur der pyrophosphorylierten Inositolphosphate weitere Forschungsarbeiten nötig sind.

3.5.1 Umsatz von Phytinsäurehydrolysat

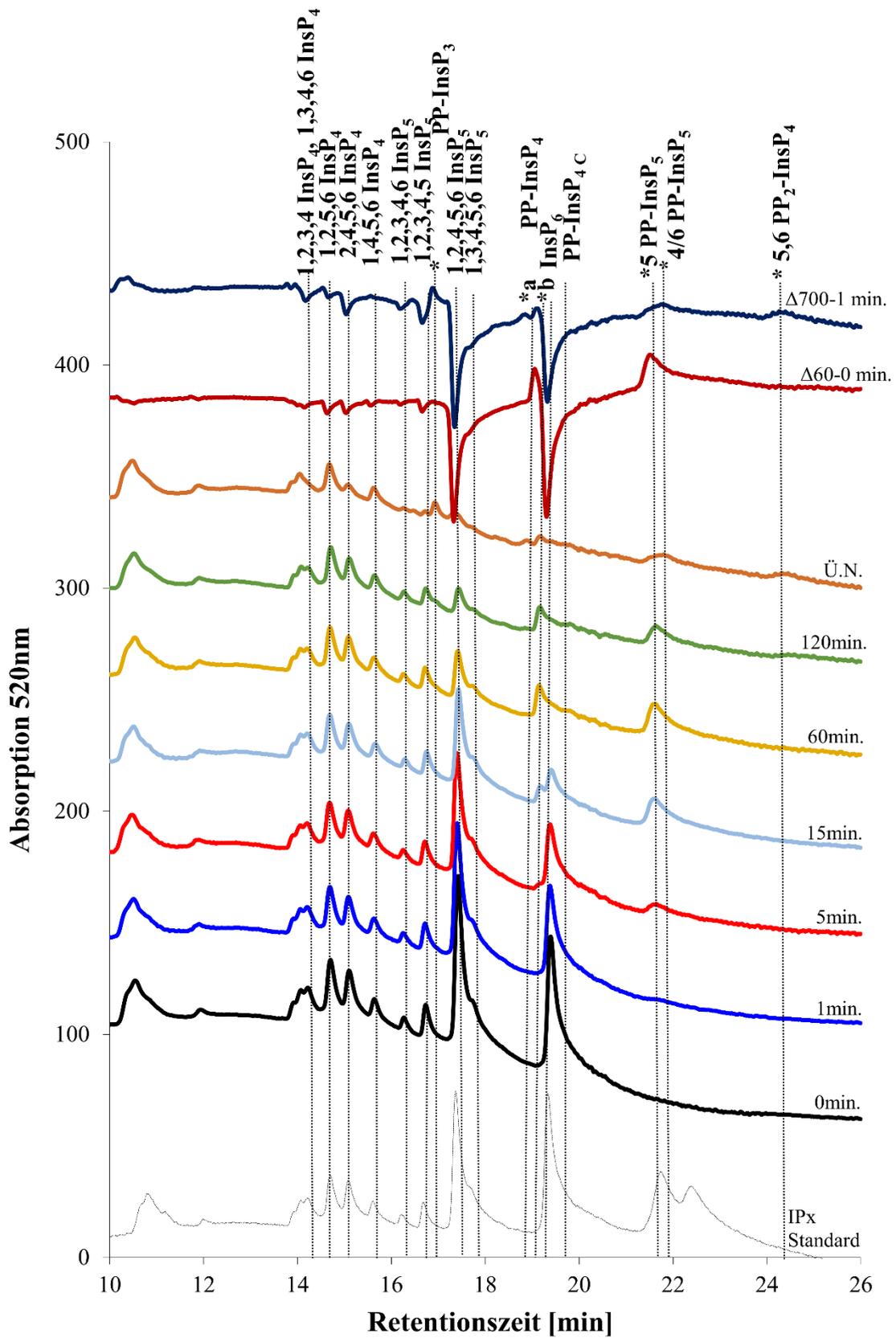


Abbildung 52: Chromatogramm – Umsatz von InsP_x Standard durch die TvIP6K4

Das Chromatogramm zeigt einerseits den Umsatz von Phytinsäurehydrolysat durch die TvIP6K4 und andererseits enthält es ein Differenzchromatogramm ($\Delta 700$ -1min. und $\Delta 60$ -1min.).

Im regulären Chromatogramm lässt sich die Abnahme aller InsP₅-Isomere ausmachen. Außerdem ist die Abnahme von InsP₆ ersichtlich. Außerdem scheinen alle InsP₄-Isomere mit der Ausnahme von D/L-1,2,4,6 InsP₄ und 1,2,3,5 InsP₄ Substrate zu sein.

Beim unteren Differenzchromatogramm wurden die InsP-Analyse zum Zeitpunkt 0 Minuten von der InP-Analyse zum Zeitpunkt 60 Minuten abgezogen. Substrate entsprechen somit negativen Peaks und Produkte positiven Peaks. Diese bestätigen die Beobachtung hinsichtlich der InsP₄- und InsP₅- Isomere, sowie hinsichtlich InsP₆. Produkte sind zwei PP-InsP₄ (PP-InsP_{4 A} und PP-InsP_{4 B}), 5PP-InsP₅ und 4/6PP-InsP₅. Beim oberen Differenzchromatogramm wurden die InsP-Analyse zum Zeitpunkt 1 Minute von der InsP-Analyse zum Zeitpunkt 700 Minuten abgezogen. Hier zeigt sich zusätzlich zu den genannten Produkten ein PP-InsP₃ und ein 4,5/5,6 PP₂-InsP₄.

3.5.2 Umsatz von InsP₇ Standard

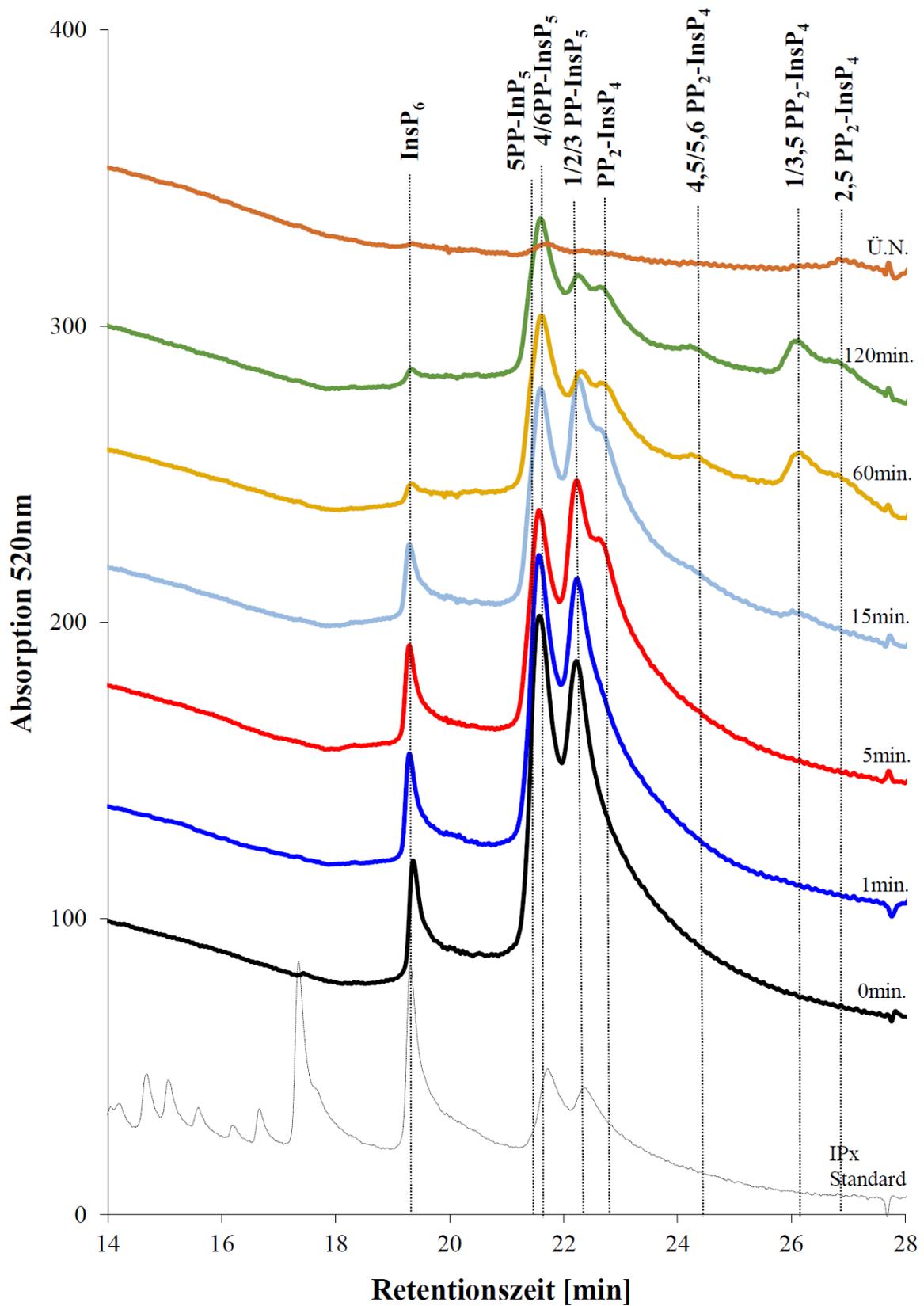


Abbildung 53: Chromatogramm – Umsatz von InsP₇ Standard durch die TvIP6K4

Das Chromatogramm zeigt den Umsatz des getesteten InsP₇ Standards. Die Peaks, die in ihrer Höhe abnehmen, werden durch das Enzym umgesetzt. Eindeutig umgesetzt werden InsP₆, 5PP-InsP₅ und 4/6PP-InsP₅. Entstehende Produkte sind 1/2/3PP-InsP₅ und mindestens vier verschiedene PP₂-InsP₄. Über Nacht sind keine Produkte mehr sichtbar. Entweder die Produkte sind ausgefallen oder das Enzym hat die Substrate so weit aufphosphoryliert, dass sie in der MDD-HPLC nicht mehr nachweisbar sind.

3.5.3 Umsatz von 1,2,4,5 InsP₄

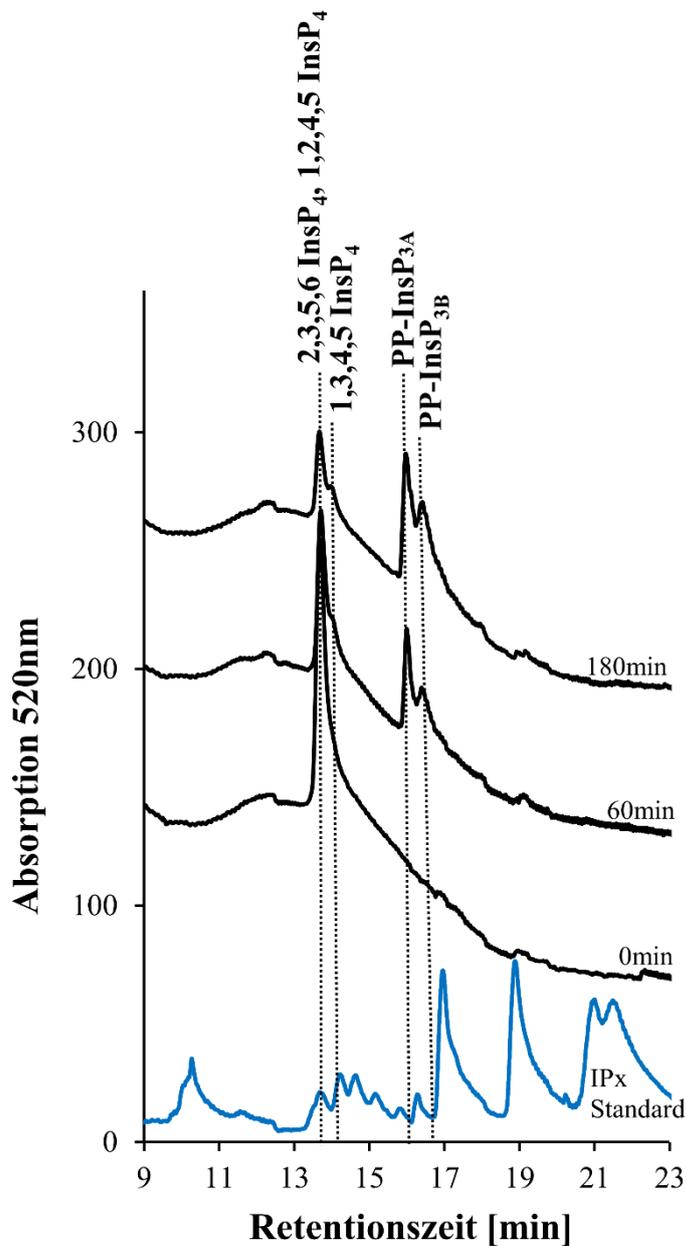


Abbildung 54: Chromatogramm – Umsatz von 1,2,4,5 InsP₄ durch die TvIP6K4

Das Substrat 1,2,4,5 InsP₄ liegt als Enantiomergemisch mit 2,3,5,6 InsP₄ vor und ist zudem zu 31,67% mit 1,3,4,5 InsP₄ verunreinigt. Als Produkte entstehen zwei verschiedene PP-InsP₃ (PP-InsP_{3A} und PP-InsP_{3B}) durch Pyrophosphorylierung von InsP₄. Da die genaue Struktur der entstehenden PP-InsP₃ nicht bekannt ist, lässt sich nicht feststellen ob beide Enantiomere oder nur eines der Enantiomere Substrat ist und pyrophosphoryliert wird. Sicher ist, dass 1,3,4,5 InsP₄ ein Substrat ist und zur PP-InsP₃ pyrophosphoryliert ist.

Zusammenfassend ergeben sich folgende putativen Reaktionswege:



3.5.4 Umsatz von 1,2,4,6 InsP₄

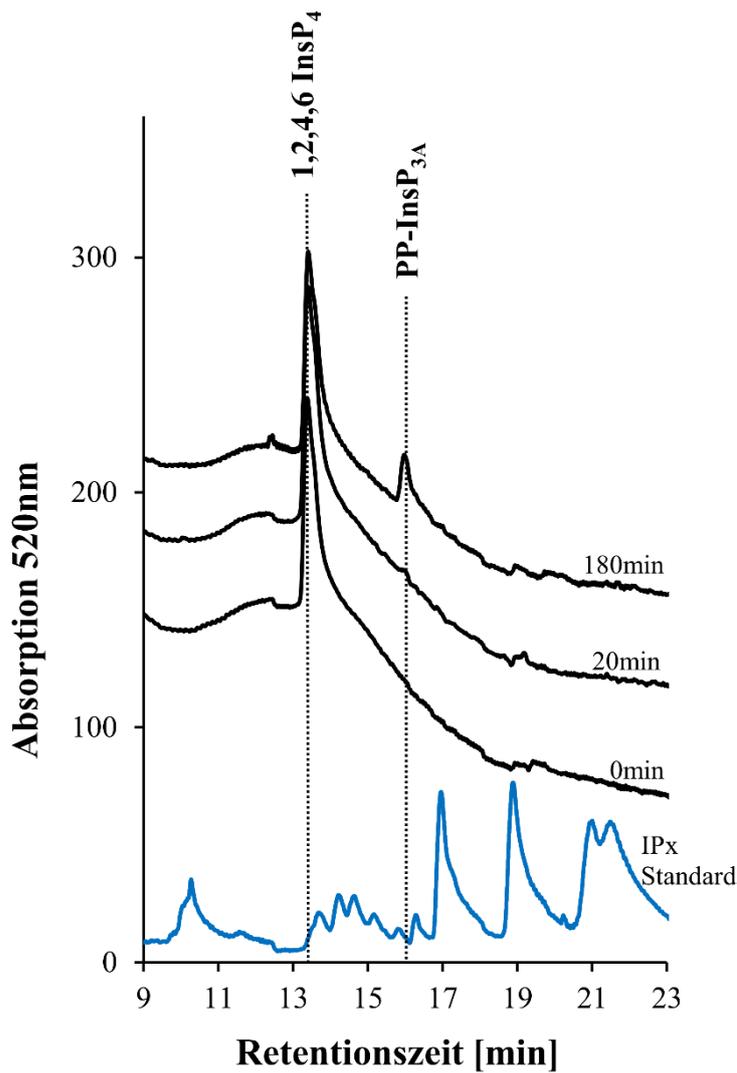


Abbildung 55: Chromatogramm – Umsatz von 1,2,4,6 InsP₄ durch die TvIP6K4

Das Chromatogramm zeigt den Umsatz von 1,2,4,6 InsP₄ durch die TvIP6K4. Dieses ein hochreines Substrat und wird in einer langsamen Reaktion an unbekannter Position pyrophosphoryliert, sodass ein PP-InsP₃ entsteht, dessen genaue Struktur aktuell nicht bekannt ist.

Zusammenfassend ergibt sich folgender Reaktionsweg.



3.5.5 Umsatz von 2,4,5,6 InsP₄

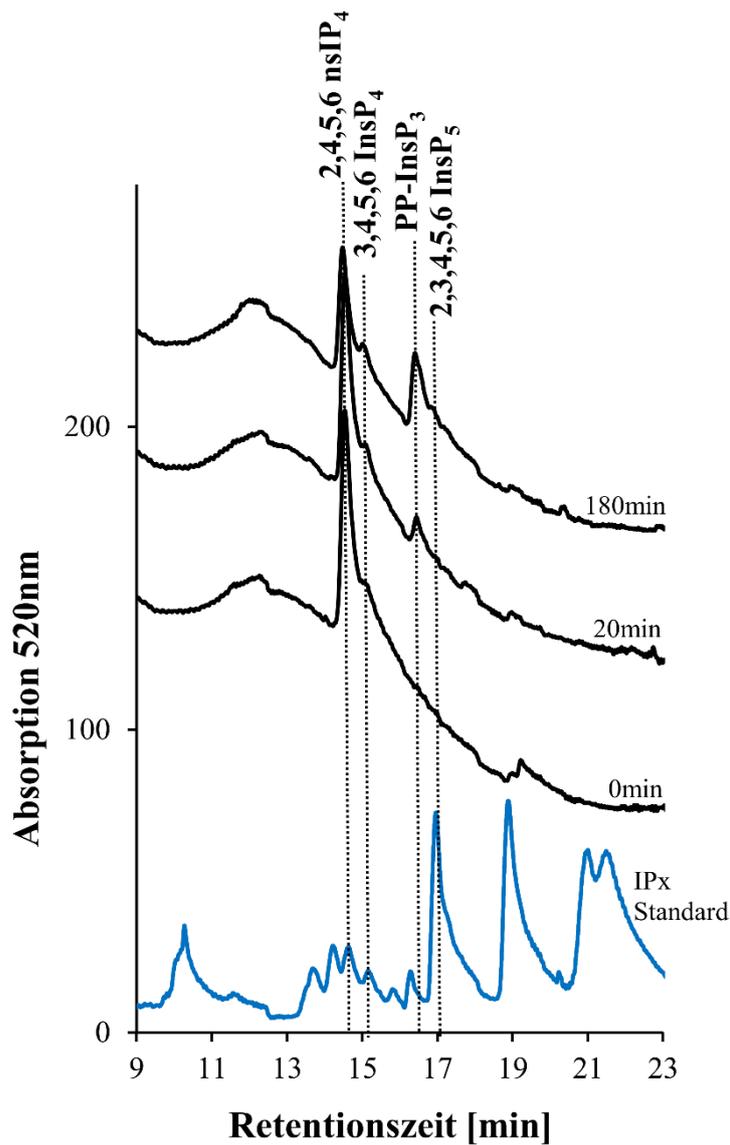
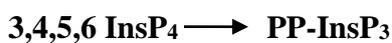


Abbildung 56: Chromatogramm – Umsatz von 2,4,5,6 InsP₄ durch die TvIP6K4

Das Substrat 2,4,5,6 InsP₄ ist zu 21% mit dem 3,4,5,6 InsP₄ verunreinigt. 2,4,5,6 InsP₄ wird an der 3-Position zu 2,3,4,5,6 InsP₅ phosphoryliert (s.3.6.3). 3,4,5,6 InsP₄ wird an unbekannter Stelle pyrophosphoryliert, sodass PP-InsP₃ entsteht.

Zusammenfassend ergeben sich folgende Reaktionswege:



3.5.6 Umsatz von 2,3,4,5,6 InsP₅

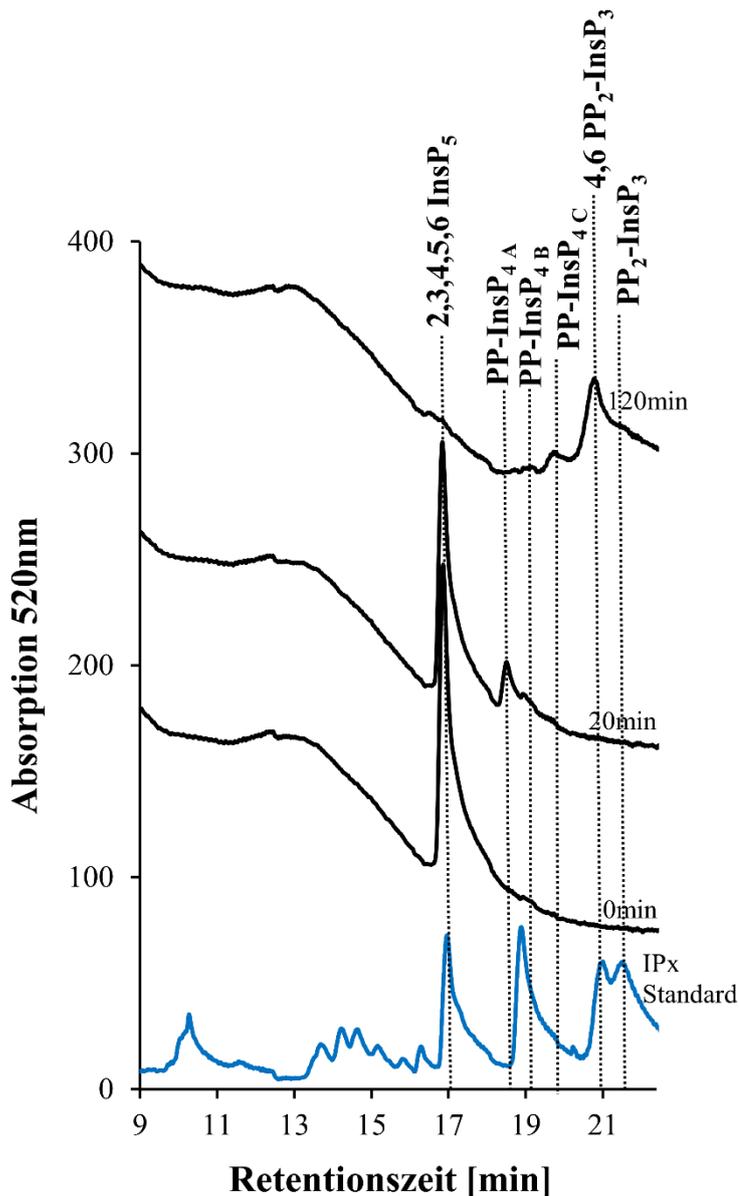
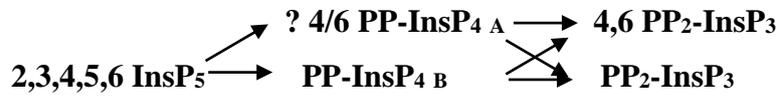


Abbildung 57: Chromatogramm – Umsatz von 2,3,4,5,6 InsP₅ durch die TvIP6K4

Das Chromatogramm zeigt den Umsatz von 2,3,4,5,6 InsP₅. Bei dem Substrat handelt es sich um ein hochreines Substrat. Nach 20 Minuten zeigen sich als Produkte drei verschiedene PP-InsP₄ (PP-InsP₄ A, PP-InsP₄ B und PP-InsP₄ C), welche durch Pyrophosphorylierung aus 2,3,4,5,6 InsP₅ entstanden sind. Die Position der Pyrophosphate lässt sich mittels MDD-HPLC nicht eindeutig ermitteln. Nach 120 Minuten finden sich im Bereich des InsP₇ Standards zwei neue Produkte. Da das Ausgangssubstrat nicht mit InsP₆ kontaminiert war, wird für diese beiden Produkte postuliert, dass sie durch Pyrophosphorylierung aus einem oder mehreren PP-InsP₄ entstanden sein müssen und in der Form von PP₂-InsP₃ vorliegen. Für das PP₂-InsP₃, welches bei 21 Minuten eluiert

konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass es sich um ein 4,6PP₂-InsP₃ handelt (Wundenberg et al., 2019).

Zusammenfassend ergibt sich folgender putativer Reaktionsweg:



3.5.7 Umsatz von 1,2,3,4,5 InsP₅

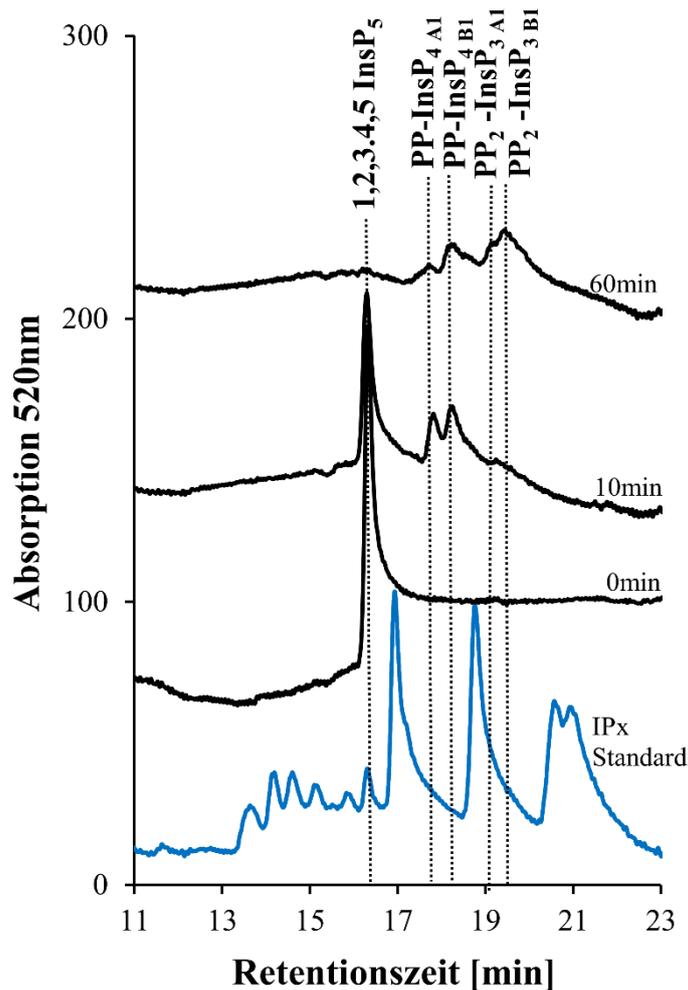
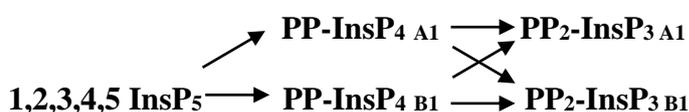


Abbildung 58: Chromatogramm – Umsatz von 1,2,3,4,5 InsP₅ durch die TvIP6K4

Das Chromatogramm zeigt den Umsatz von 1,2,3,4,5 InsP₅ durch die TvIP6K4. Hierbei handelt es sich um ein hochreines Substrat. Durch Pyrophosphorylierung entstehen nach zehnmütiger Inkubation zwei PP-InsP₄ (PP-InsP₄ A₁ und PP-InsP₄ B₁). Nach 60 Minuten sind zwei Peaks bei der Retentionszeit von InsP₇ ersichtlich. Die Analyse der Produkte mit MDD-HPLC zeigt deutlich, dass es zum Ausfall von Produkten gekommen ist. Somit lässt sich keine eindeutige Relation zwischen Abnahme der Substrate und Zunahme der Produkte erstellen. Da das Ausgangssubstrat nicht mit InsP₆ verunreinigt ist und das InsP₇ erst nach PP-InsP₄ entstanden ist, wird postuliert, dass es sich um zwei verschiedene PP₂-InsP₃ handelt, die durch Pyrophosphorylierung von einem oder beiden PP-InsP₄ entstanden sind.

Zusammenfassend ergibt sich folgender putativer Reaktionsweg:



3.5.8 Umsatz von 1,2,3,4,6 InsP₅

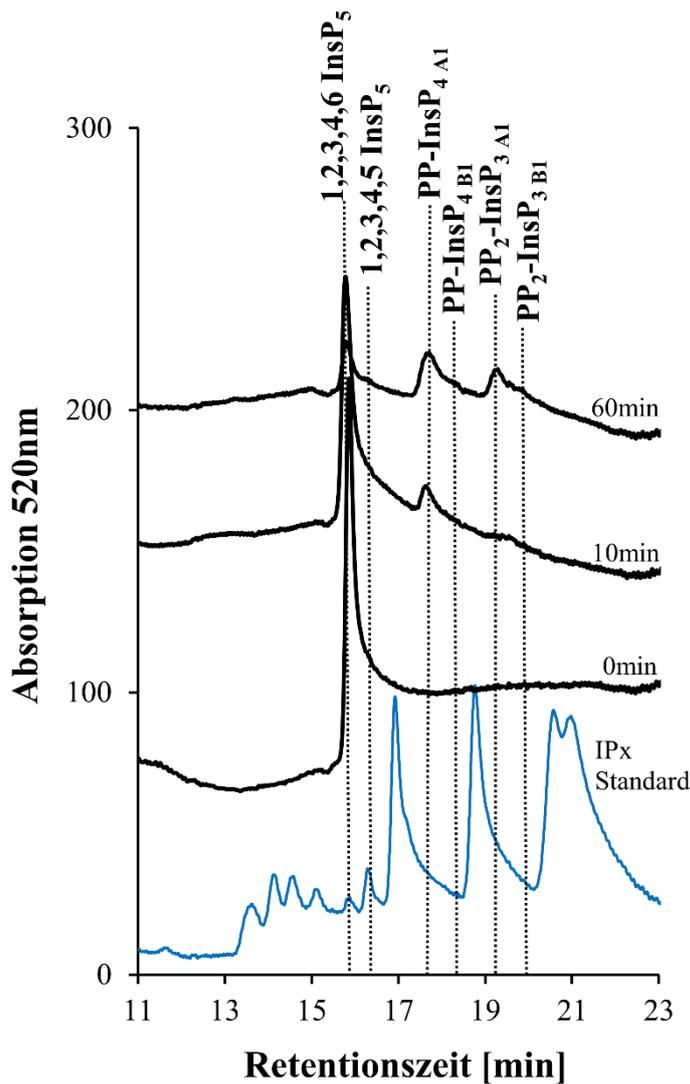


Abbildung 59: Chromatogramm – Umsatz von 1,2,3,4,6 InsP₅ durch die TvIP6K4

Das Chromatogramm zeigt den Umsatz von 1,2,3,4,6 InsP₅. Das Substrat ist zu 13,302% mit 1,2,3,4,5 InsP₅ verunreinigt. Nach 10 Minuten zeigt sich eine deutliche Abnahme der Ausgangssubstrate und es entsteht durch Pyrophosphorylierung ein PP-InsP₄ (PP-InsP_{4 A1}). Nach 60 Minuten ist es zu einem starken Ausfall der Produkte gekommen, was eine eindeutige Zuordnung der Substrat-Produktbeziehung erschwert. Es sind nach 60 Minuten ein zweites PP-InsP₄ (PP-InsP_{4 B1}), sowie zwei weitere PP₂-InsP₃ (PP₂-InsP_{3 A1} und PP₂-InsP_{3 B2}) entstanden. Quantitativ lässt sich deren Entstehung nicht allein aus der Abnahme von 1,2,3,4,5 InsP₅ erklären (s. auch 3.6.12), sodass es sich hierbei auch um Produkte von 1,2,3,4,6 InsP₅ handelt.

Zusammenfassend ergibt sich folgender putativer Reaktionsweg:



3.5.9 Umsatz von 1,2,4,5,6 InsP₅

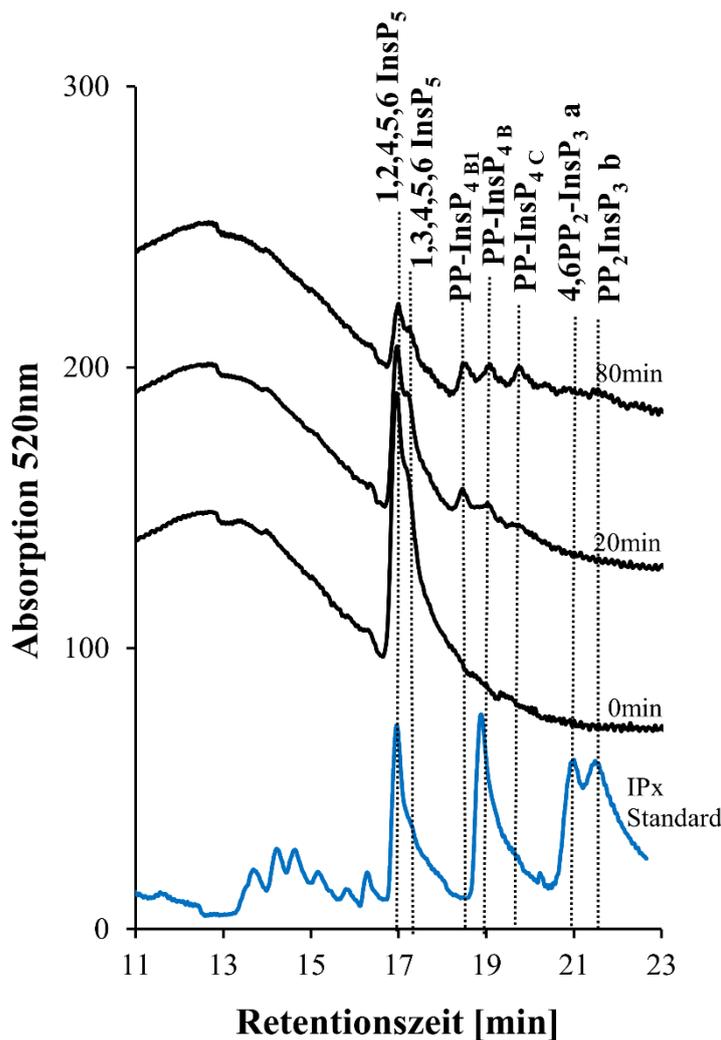


Abbildung 60: Chromatogramm – Umsatz von 1,2,4,5,6 InsP₅ durch die TvIP6K4

Das Substrat 1,2,4,5,6 InsP₅ ist zu 31% mit 1,3,4,5,6 InsP₅ verunreinigt. Die Auswertung erfolgte in Zusammenschau mit den Ergebnissen zum Umsatz von 1,3,4,5,6 InsP₅ (s.3.51.10.). Nach 15 Minuten entstehen durch Pyrophosphorylierung drei verschiedene PP-InsP₄. PP-InsP_{4B1} entsteht nur, wenn 1,2,4,5,6 InsP₅ im Überschuss vorliegt (s.3.6.10), sodass es durch Pyrophosphorylierung aus 1,2,4,5,6 InsP₅ entstehen zu scheint. Außerdem entstehen zwei weitere PP-InsP₄ (PP-InsP_{4B} und PP-InsP_{4C}). Inwiefern diese aus 1,2,4,5,6 InsP₅ entstehen bleibt offen. Nach 80 Minuten entstehen zwei verschiedene InsP₈. Da das Enzym eine Affinität zu Pyrophosphorylierung hat und es auch kein anderes mögliches Ausgangssubstrat für die Entstehung des InsP₈ gibt, wird postuliert, dass es sich um ein x,yPP₂-InsP₃ handelt, welches durch Pyrophosphorylierung aus PP-InsP₄ entsteht. Das PP₂-InsP₃ welches bei einer Retentionszeit von 21 Minuten eluiert, wurde in vorangegangenen Arbeiten als 4,6 PP₂-InsP₃ identifiziert (Wundenberg et al., 2019).

Zusammenfassend ergibt sich folgender putativer Reaktionsweg:



3.5.10 Umsatz von 1,3,4,5,6 InsP₅

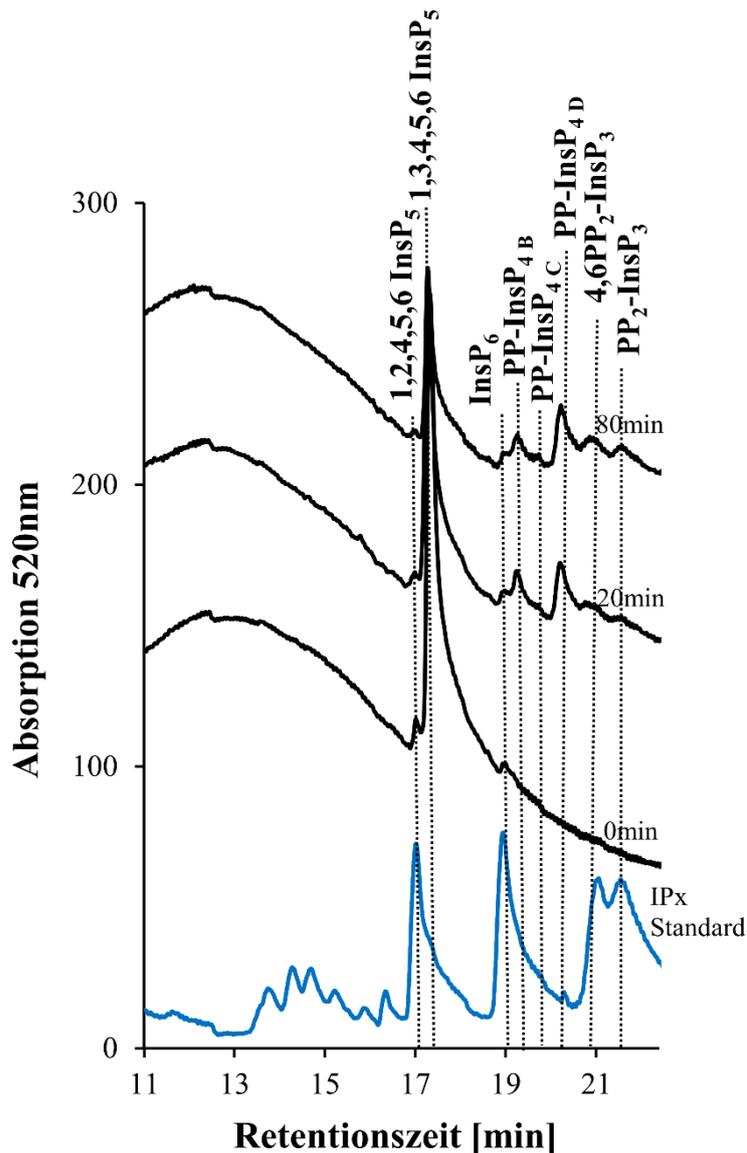


Abbildung 61: Chromatogramm – Umsatz von 1,3,4,5,6 InsP₅ durch die TvIP6K4

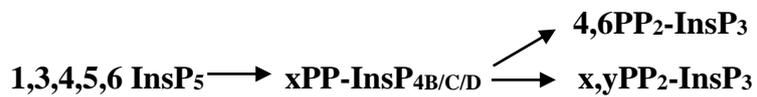
Die Auswertung des Umsatzes von 1,3,4,5,6 InsP₅ erfolgt in Zusammenschau mit dem Ergebnissen des Umsatzes von 1,2,4,5,6 InsP₅. Beide Substrate sind mit dem jeweils anderen verunreinigt. Das 1,3,4,5,6 InsP₅ ist mit 0,8% 1,2,4,5,6 InsP₅ und mit 0,6% InsP₆ verunreinigt.

Innerhalb von 20 Minuten entstehen zwei verschiedene InsP₇. Da InsP₆ nicht umgesetzt wird, können diese nur durch die Pyrosphosphorylierung von InsP₅ entstehen. Das 1,3,4,5,6 InsP₅ wird an unbekannter Position zu drei verschiedenen PP-InsP₄ pyrophosphoryliert (PP-InsP_{4B}, PP-InsP_{4C}, PP-InsP_{4D}). PP-InsP_{4D} entsteht dabei ausschließlich, wenn 1,3,4,5,6 InsP₅ im Verhältnis zu 1,2,4,5,6 InsP₅ in Überschuss vorliegt (s.3.6.11), sodass es mit Sicherheit aus 1,3,4,5,6 InsP₅ entsteht. Die Zunahme von

PP-InsP_{4B} und PP-InsP_{4C} lässt sich quantitativ nicht ausschließlich aus der Abnahme von 1,2,4,5,6 InsP₅ erklären, sodass hier ebenfalls postuliert wird, dass es aus 1,3,4,5,6 InsP₅ entsteht. Nach 80 Minuten entstehen zwei verschiedene InsP₈. Da das Enzym eine Affinität zu Pyrophosphorylierung hat und es auch kein anderes mögliches Ausgangssubstrat für die Entstehung des InsP₈ gibt, wird postuliert, dass es sich um ein x,yPP₂-InsP₃ handelt, welches durch Pyrophosphorylierung aus dem PP-InsP₄ entsteht. Das PP₂-InsP₃ welches bei einer Retentionszeit von 21 Minuten eluiert, wurde in vorrangigen Arbeiten als 4,6 PP₂-InsP₃ identifiziert (Wundenberg et al., 2019).

Das 1,2,4,5,6 InsP₅ wird ebenfalls an unbekannter Stelle zu PP-InsP₄ pyrophosphoryliert (PP-InsP_{4B}). Das InsP₆ reagiert nicht weiter.

Zusammenfassend ergibt sich folgender putativer Reaktionsweg:



3.5.11 Umsatz von InsP₆

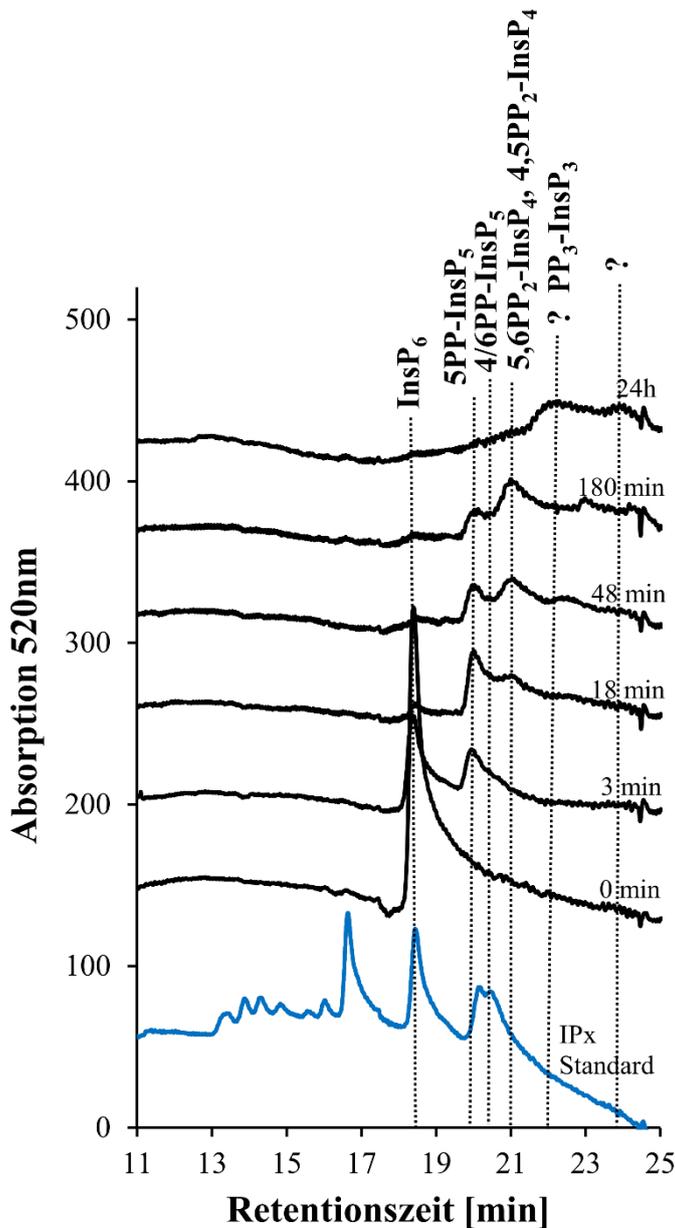
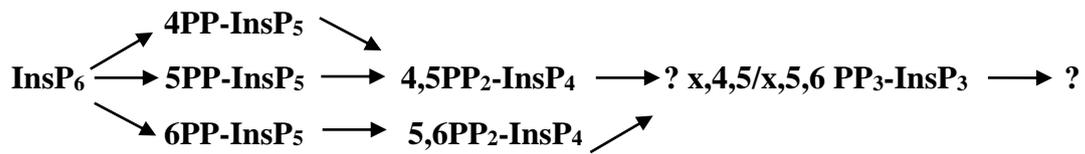


Abbildung 62: Chromatogramm – Umsatz von InsP₆ durch die TvIP6K4

Das Chromatogramm zeigt den Umsatz von InsP₆ durch die TvIP6K4. Das Substrat ist hochrein. Die Kinase pyrophosphoryliert das Inositolphosphat zunächst an der 5-Position zu 5PP-InsP₅, sowie an der 4- oder der 6-Position. Die MDD-HPLC ermöglicht keine Unterscheidung zwischen diesem Enantiomerenpaar, sodass es sich bei dem entstehenden Produkt entweder um 4PP-InsP₅ oder um 6PP-InsP₅ handelt. Diese Produkte werden im Verlauf an einer 2. Position weiter pyrophosphoryliert, sodass 4,5PP₂-InsP₄ bzw. 5,6PP₂-InsP₄ entsteht. Beide Produkte eluieren zur selben Retentionszeit, sodass eine Unterscheidung derselben mittels MDD-HPLC nicht möglich ist. Beide Produkte können jedoch sowohl durch erneute Pyrophosphorylierung von 4PP-InsP₅, 5PP-InsP₅ und 6PP-

InsP₅ entstehen (s.u.). Anschließend entsteht ein InsP₉. Da das Enzym eine Affinität zur Pyrophosphorylierung von Produkten hat, wird postuliert, dass es sich um ein PP₃-InsP₃ handelt. Über Nacht zeigt das Chromatogramm bei einer Retentionszeit von 24,10 Minuten die Entstehung eines weiteren Peaks (?), dessen Phosphorylierungsgrad nicht bekannt ist.

Zusammenfassend ergibt sich folgender putativer Reaktionsweg:



3.5.12 Umsatz von 4/6PP-InsP₅

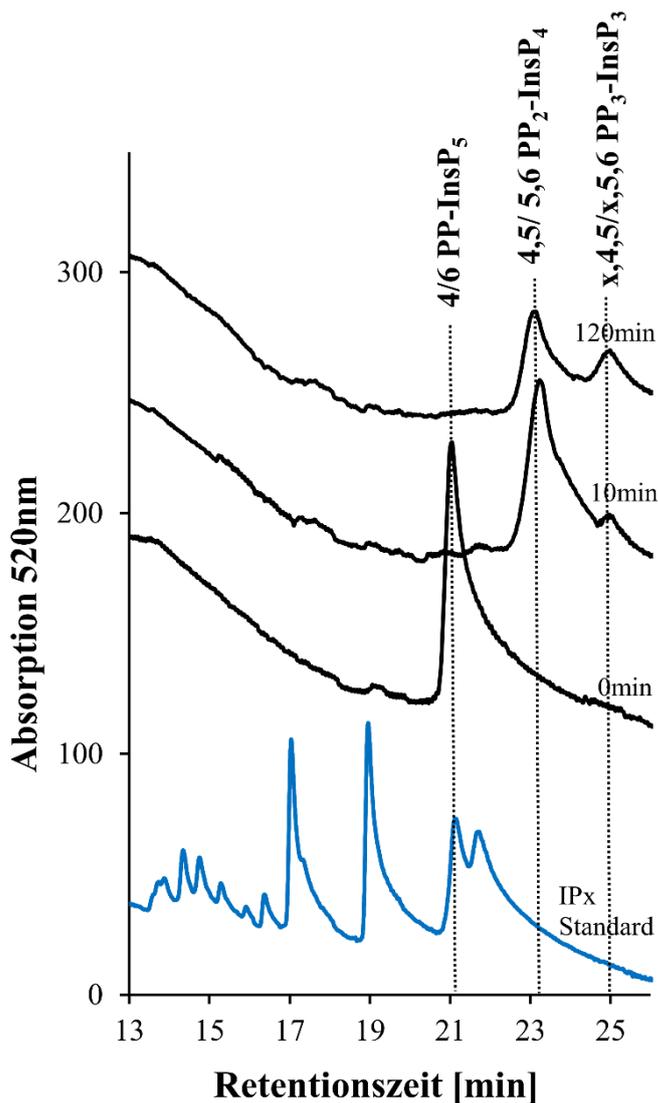


Abbildung 63: Chromatogramm – Umsatz von 4/6PP-InsP₅ durch die TvIP6K4

Das Chromatogramm zeigt den Umsatz von 4/6PP-InsP₅ durch die TvIP6K4. Es wird innerhalb von 10 Minuten zweimal pyrophosphoryliert. Da die MDD-HPLC die Unterscheidung des Enantiomerenpaares nicht erlaubt gibt es zwei Optionen. 4PP-InsP₅ wird an der 5-Position pyrophosphoryliert, sodass 4,5PP₂-InsP₄ entsteht. Letzteres wird dann erneut an unbekannter Stelle zu x,4,5PP₂-InsP₃ pyrophosphoryliert. Die zweite Option ist folgende: 6PP-InsP₅ wird an der 5-Position pyrophosphoryliert, sodass 5,6PP₂-InsP₄ entsteht. Letzteres wird dann erneut an unbekannter Stelle zu x,5,6PP₂-InsP₃ pyrophosphoryliert

Zusammenfassend ergeben sich folgende putative Reaktionswege:



3.5.13 Umsatz von 5PP-InsP₅

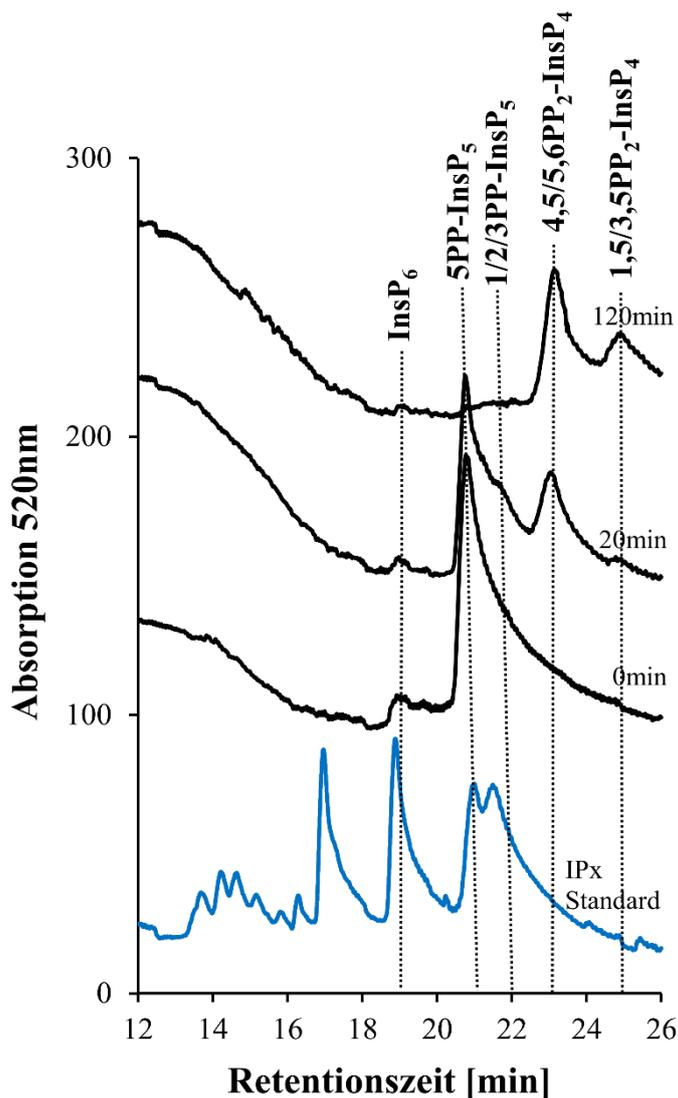
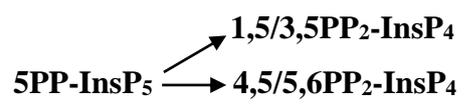


Abbildung 64: Chromatogramm – Umsatz von 5PP-InsP₅ durch die TvIP6K4

Das Chromatogramm zeigt den Umsatz von 5PP-InsP₅. Dieses wird innerhalb von 20 Minuten an mindestens zwei unterschiedlichen Positionen pyrophosphoryliert. Die erste Pyrophosphorylierung erfolgt entweder an 4-Position oder an der 6-Position. Da das Enantiomerenpaar zur selben Retentionszeit eluiert, ist eine Unterscheidung nicht möglich. Außerdem entsteht innerhalb von 20 Minuten durch Pyrophosphorylierung aus 5PP-InsP₅ 1,5PP₂-InsP₄ bzw. 3,5PP₂-InsP₄. Auch hier ist eine genaue Unterscheidung des Enantiomerenpaares in der MDD-HPLC nicht möglich. Der Ursprung des 1/2/3PP-InsP₅ ist unklar, da bei der Testung von InsP₆ gezeigt werden konnte, dass dies kein Produkt aus dem Umsatz von InsP₆ ist (s.3.6.12).

Zusammenfassend ergeben sich folgende putative Reaktionswege:



3.5.14 Überblick über die Substratspezifität der TvIP6K4

Die nachstehende Tabelle fasst die oben beschriebenen Reaktionswege und die daraus resultierenden Substrat-Produkt Beziehungen im Überblick zusammen.

InsP	Substrat	Produkte
InsP ₄	1,2,4,5 InsP ₄ / 2,3,5,6 InsP ₄	PP-InsP _{3 A/B}
	1,2,4,6 InsP ₄	PP-InsP _{3A}
	1,3,4,5 InsP ₄	PP-InsP _{3 A/B}
	2,4,5,6 InsP ₄	2,3,4,5,6 InsP ₅
	3,4,5,6 InsP ₄	PP-InsP ₃
InsP ₅	2,3,4,5,6 InsP ₅	4/6 PP-InsP _{4 A} → 4,6 PP ₂ -InsP _{3/} PP ₂ -InsP ₃ PP-InsP _{4 B} → PP ₂ -InsP _{3/} 4,6 PP ₂ -InsP ₃
	1,2,3,4,5 InsP ₅	PP-InsP _{4 A1/B1} → PP ₂ -InsP _{3 A1/B1}
	1,2,3,4,6 InsP ₅	PP-InsP _{4 A1/B1} → PP ₂ -InsP _{3 A1/B1}
	1,2,4,5,6 InsP ₅	xPP-InsP _{4 B1} → x,y PP ₂ -InsP ₃
	1,3,4,5,6 InsP ₅	xPP-InsP _{4 B/C/D} → x,y PP ₂ -InsP ₃ + 4,6 PP ₂ -InsP ₃
InsP ₆	InsP ₆	4PP-InsP ₅ → 4,5PP ₂ -InsP ₄ → ? x,4,5PP ₃ -InsP ₃ → ? 5PP-InsP ₅ → 4,5PP ₂ -InsP ₄ → ? x,4,5PP ₃ -InsP ₃ → ? 6PP-InsP ₅ → 5,6PP ₂ -InsP ₄ → ? x,5,6PP ₃ -InsP ₃ → ?
InsP ₇	4PP-InsP ₅	4,5PP ₂ -InsP ₄ → x,4,5PP ₃ -InsP ₃
	6PP-InsP ₅	5,6PP ₂ -InsP ₄ → x,5,6PP ₃ -InsP ₃
	5PP-InsP ₅	1,5/3,5PP ₂ -InsP ₄ 4,5/5,6PP ₂ -InsP ₄

Tabelle 15: Substratanalyse der TvIP6K4

Die Kinase ist in der Lage fünf verschiedene InsP₄-Isomere, fünf verschiedene InsP₅-Isomere, InsP₆ und zwei InsP₇-Isomere zu phosphorylieren. Auffällig ist die Tatsache, dass die Kinase ihre Substrate vorzugsweise pyrophosphoryliert. Die einzigen beiden Substrate, welche sie nicht pyrophosphoryliert sind 1,4,5,6 InsP₄ und 2,4,5,6 InsP₄.

Alle Substrate wurden im enzymatisch optisch-gekoppelten Test vermessen. Für die Substrate, welche in der initialen Analyse im optisch-gekoppelten Test und in der Analyse durch die MDD-HPLC die höchsten Umsatzraten zeigten, wurde die spezifische Aktivität, sowie die initiale Umsatzgeschwindigkeit und apparenten Km-Werte ermittelt.

Enantiomergemische und sehr unreine Substratgemische wurden für diese Analyse nicht benutzt. Ursächlich hierfür ist die Tatsache, dass sich die einzelnen Substrate und deren entstehenden Produkte den Umsatz durch das Enzym gegenseitig beeinflussen und die ermittelten spezifischen Umsatzraten nicht mehr spezifisch für das Substrat sind, sondern vielmehr für das Substratgemisch.

Substrat	c_{Substrat}	Spezifische Aktivität (U/mg)	v_{max} apparent ($\mu\text{mol}/\text{min.}$)	n
2,3,4,5,6 InsP ₅	5 μM	0,11 \pm 0,057	1,471 \pm 0,077	2
1,2,3,4,5 InsP ₅	5 μM	0,0434 \pm 0,0003	0,38 \pm 0,047	2
1,2,4,5,6 InsP ₅	5 μM	0,074 \pm 0,012	0,996 \pm 0,168	2
1,3,4,5,6 InsP ₅	5 μM	0,039 \pm 0,02	0,52 \pm 0,274	2
4/6PP-InsP ₅	8 μM	2,419 \pm 0,08	5,443 \pm 0,179	2
InsP ₆	20 μM	0,276 \pm 0,002	2,53 \pm 0,93	2

Tabelle 16: Substratanalyse der TvIP6K4 – Enzymkinetik

Die Tabelle verdeutlicht, dass das Hauptsubstrat des Enzyms 4/6PP-InsP₅ ist. Vergleicht man die spezifischen Aktivität der einzelnen Substrate so ist das zweitbeste Substrat InsP₆ mit einer spezifischen Aktivität von 0,2419 U/mg.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung der Substratspezifität der TvIPK-1

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Substratspezifität der TvIPK-1 zeigen, dass es sich bei dem Enzym um eine Multiphosphatkinase handelt, welches zahlreiche InsP₃-Isomere, zahlreiche InsP₄-Isomere, alle InsP₅-Isomere und InsP₆ phosphorylieren kann. Auffällig ist, dass das Enzym alle Substrate außer drei monophosphoryliert. Grundsätzlich besitzt es jedoch die Fähigkeit die Substrate, nämlich 1,3,4,5,6 InsP₅ zu PP-InsP₄, InsP₆ zu 1/2/3PP-InsP₅, 1,3,4,5 InsP₄ zu PP-InsP₃ und PP-InsP₃ zu PP-InsP₄ zu pyrophosphorylieren. Somit hat das Enzym eine duale Spezifität und ist sowohl eine Hydroxy- als auch eine Phosphokinase.

Die nachfolgende Tabelle fasst die einzelnen Substratspezifitäten zusammen:

InsP	Substrat	Produkte	Kinase-Selektivität
InsP ₂	1,4 InsP ₂	1,3,4 InsP ₃	1,4 InsP ₂ -3-OH-Kinase
	4,5 InsP ₂	3,4,5 InsP ₃ 4,5,6 InsP ₃	4,5 InsP ₂ -3-OH-Kinase 4,5 InsP ₂ -6-OH-Kinase
InsP ₃	1,2,5 InsP ₃	1,2,5,6 InsP ₄	1,2,5 InsP ₃ -6-OH-Kinase
	1,3,4 InsP ₃	1,3,4,6 InsP ₄	1,3,4 InsP ₃ -6-OH-Kinase
	1,4,5 InsP ₃	1,3,4,5 InsP ₄	1,4,5 InsP ₃ -3-OH-Kinase
		1,4,5,6 InsP ₄	1,4,5 InsP ₃ -6-OH-Kinase
	1,4,6 InsP ₃	1,4,5,6 InsP ₄	1,4,6 InsP ₃ -5-OH-Kinase
	2,3,5 InsP ₃	2,3,5,6 InsP ₄	2,3,5 InsP ₃ -6-OH-Kinase
	D-2,4,5 InsP ₃	2,3,4,5 InsP ₄	D-2,4,5 InsP ₃ -3-OH-Kinase
		2,4,5,6 InsP ₄	D-2,4,5 InsP ₃ -6-OH-Kinase
	3,4,5 InsP ₃	3,4,5,6 InsP ₄	3,4,5 InsP ₃ -6-OH-Kinase
PP-InsP ₂		3,4,5 InsP ₃ -x-P-Kinase	
D-3,4,6 InsP ₃	3,4,5,6 InsP ₄	3,4,6 InsP ₃ -5-OH-Kinase	
4,5,6 InsP ₃	3,4,5,6 InsP ₄	4,5,6 InsP ₃ -3-OH-Kinase	
	PP-InsP ₂	4,5,6 InsP ₃ -x-P-Kinase	
InsP ₄	1,2,3,4 InsP ₄	1,2,3,4,6 InsP ₅	1,2,3,4 InsP ₄ -6-OH-Kinase
	1,2,3,5 InsP ₄	1,2,3,5,6 InsP ₅	1,2,3,5 InsP ₄ -6-OH-Kinase
		1,2,3,4,5 InsP ₅	1,2,3,5 InsP ₄ -4-OH-Kinase
D-1,2,3,6 InsP ₄	1,2,3,5,6 InsP ₅	D-1,2,3,6 InsP ₄ -5-OH-Kinase	

	1,2,4,5 InsP ₄	1,2,3,4,5 InsP ₅ 1,2,3,4,6 InsP ₅	1,2,4,5 InsP ₄ -3-OH-Kinase 1,2,4,5 InsP ₄ -6-OH-Kinase
	1,2,4,5 InsP ₄	1,2,4,5,6 InsP ₅	1,2,4,5 InsP ₄ -6-OH-Kinase
	D-1,3,4,5 InsP ₄	1,3,4,5,6 InsP ₅ PP-InsP ₃	1,3,4,5 InsP ₄ -6-OH-Kinase 1,3,4,5 InsP ₄ -x-P-Kinase
	1,3,4,6 InsP ₄	1,3,4,5,6 InsP ₅	1,3,4,6 InsP ₄ -5-OH-Kinase
	1,4,5,6 InsP ₄	m-1,3,4,5,6 InsP ₅	1,4,5,6 InsP ₄ -3-OH-Kinase
	1,3,5,6 InsP ₄	1,3,4,5,6 InsP ₅	1,3,5,6 InsP ₄ -4-OH-Kinase
	2,3,4,5 InsP ₄	2,3,4,5,6 InsP ₅	2,3,4,5 InsP ₄ -6-OH-Kinase
	2,4,5,6 InsP ₄	2,3,4,5,6 InsP ₅	2,4,5,6 InsP ₄ -3-OH-Kinase
InsP ₅	1,2,3,4,5 InsIP ₅	InsP ₆	1,2,3,4,5 InsP ₅ -6-OH-Kinase
	1,2,3,4,6 InsIP ₅	InsP ₆	1,2,3,4,6 InsP ₅ -5-OH-Kinase
	1,2,3,5,6 InsIP ₅	InsP ₆	1,2,3,5,6 InsP ₅ -4-OH-Kinase
	1,2,4,5,6 InsIP ₅	InsP ₆	1,2,4,5,6 InsP ₅ -3-OH-Kinase
	1,3,4,5,6 InsP ₅	PP-InsP ₄	1,3,4,5,6 InsP ₅ -x-P-Kinase
	2,3,4,5,6 InsP ₅	InsP ₆	2,3,4,5,6 InsP ₅ -1-OH-Kinase
	PP-InsP ₃	PP-InsP ₄	PP-InsP ₃ -x-P-Kinase
InsP ₆	InsP ₆	1/2/3PP-InsP ₅	InsP ₆ -1/2/3-P-Kinase

Tabelle 17: Überblick über die Substratspezifität der TvIPK-1

Da es sich bei dem Substrat um eine Multiphosphatkinase handelt, wird diese fortlaufend nicht mehr als TvIPK-1, sondern als TvIPMK bezeichnet.

4.2 Stereochemie der Substratbindung

Zur Analyse der Stereochemie der Substratbindung, zum sogenannten „substrate binding“ oder „recognition mapping“ wurden alle identifizierten Substrate der TvIPMK unabhängig von der Nummerierung ihrer Substituenten nach der „relaxed IUPAC rule“ (1989a) so ausgerichtet und um eine Achse parallel zur Inositol-Ringebene gespiegelt, dass die OH-Gruppe, die phosphoryliert wird so wie die 5-OH Gruppe entsprechend der des besten Substrats, des 1,3,4,6 InsP₄ orientiert ist. Es zeigten sich dann bei allen Substraten gewisse Positionen und Orientierungen der essentiellen Substituenten relativ zur phosphorylierten, im Ring nach oben gerichteten, äquatorialen Hydroxylgruppe (oder, bei erfolgreicher Pyrophosphorylierung der Akzeptor Phosphoestergruppe). Diese kann in anderen

Substraten eine andere Nummerierung besitzen (3, 4 oder 6), muss aber immer gleich zum Inositolring ausgerichtet sein. Die identifizierten Substrate wurden nun nach Ihrer „Qualität“ gereiht, die gemessen wurde anhand der initialen Umsatzgeschwindigkeit bei der höchsten Substratkonzentration (i.d.R. 5-10 μM). Es zeigten sich Regelmäßigkeiten der anderen Substituenten eines Substrates, die Indiz dafür sind, welche Substituenten das Enzym vorfinden muss, damit es ein InsP_x als Substrat binden kann. In der Regel sind das drei asymmetrisch angeordnete Kontakt-Substituenten oder besser Kontaktbereiche. Letzterer Begriff ist korrekter, da sich an einem substituierten Inositol durch die Art und Orientierung des Substituenten nicht nur der Satz der Substituenten-Atome unterscheidet, sondern auch, durch die Lage zum Inositolring bedingt, ein vicinales, jeweils dem Substituenten tetraedrisch gegenüber liegendes H-Atom des Inositolrings mit hydrophober Eigenschaft. Bindende Gruppen des Enzyms sind auf diese Art und Weise sowohl polare Gruppen, welche ionische oder Wasserstoffbrücken bilden können als auch hydrophobe Aminosäureseitenketten. Es zeigt sich bei derartigen Substraten eines Enzyms immer das Phänomen der asymmetrischen Erkennung des Substrates mit mindestens drei Kontakten einer „substrate recognition site“, einer Substrat-Erkennungs- bzw. -bindungsdomäne des Enzyms. Da die Inositolphosphatkinasen Zwei-Substrat-Enzyme mit einer zweiten, in richtiger Orientierung und Distanz zur Inositolphosphat-Bindungsstelle gelegenen ATP-Bindungsstelle sind, muss das Enzym ein komplex aufgebautes aktives Zentrum besitzen, dessen Selektivität für zu phosphorylierende Substrate durch eben diese Dreipunkt-Erkennung und Positionierung der geeigneten Inositolphosphate mit ihrer zu phosphorylierenden Hydroxyl- oder Phosphatgruppe in direktem Kontakt zur Gamma Phosphatgruppe des gebundenen ATP erfolgt.

4.3 Substrate recognition mapping der TvIPMK

D-myo-InsP _x enantiom	V mU/mg	1			2			3			4			5			6			n P
		#	P	OH	#	P	OH	#	P	OH	#	P	OH	#	P	OH	#	P	OH	
m-Ins(1,3,4,6)P ₄	59300	1	ue		2	uax		3	ue		4	de		5	ue		6	de		4
Ins(1,2,4,5,6)P ₅	46400	5	ue		6	de		1	ue		2	uax		3	ue		4	de		5
Ins(1,2,4,5)P ₄ #	36100	5	ue		6	de		1	ue		2	uax		3	ue		4	de		4
Ins(1,4,5)P ₃ +	6610	4	ue		3	de		2	dax		1	de		6	ue		5	de		3
Ins(2,4,5,6)P ₄	5240	5	ue		6	de		1	ue		2	uax		3	ue		4	de		4
Ins(2,4,5)P ₃ ++	5030	5	ue		6	de		1	ue		2	uax		3	ue		4	de		3
Ins(1,2,3,4,6)P ₅	3610	1	ue		2	uax		3	ue		4	de		5	ue		6	de		5
Ins(1,2,4,6)P ₄	predicted	1	ue		2	uax		3	ue		4	de		5	ue		6	de		4
Ins(1,4,6)P ₃	3150	1	ue		2	uax		3	ue		4	de		5	ue		6	de		3
Ins(2,3,5,6)P ₄	1640	2	dax		1	de		6	ue		5	de		4	ue		3	de		4
Ins(1,4,5)P ₃ +	1310	5	ue		6	de		1	ue		2	uax		3	ue		4	de		3
Ins(1,2,4,5)P ₄ #	?	4	ue		3	de		2	dax		1	de		6	ue		5	de		4
Ins(2,4,5)P ₃ ++	500	4	ue		3	de		2	dax		1	de		6	ue		5	de		3
Ins(1,3,4,5)P ₄	401	4	ue		3	de		2	dax		1	de		6	ue		5	de		4
Ins(3,4,6)P ₃	383	1	ue		2	uax		3	ue		4	de		5	ue		6	de		3
Ins(1,4,5,6)P ₄	273	5	ue		6	de		1	ue		2	uax		3	ue		4	de		4
Ins(2,3,4,5)P ₄	94	4	ue		3	de		2	dax		1	de		6	ue		5	de		4
Ins(1,2,3,4,5)P ₅	54	4	ue		3	de		2	dax		1	de		6	ue		5	de		5
3PP-Ins(1,4,5)P ₃	45	4	ue		3	dePP		2	dax		1	de		6	ue		5	de		5
Ins(1,3,4)P ₃	6	4	ue		3	de		2	dax		1	de		6	ue		5	de		3
Ins(2,3,4,5,6)P ₅	8	3	ue		4	de		5	ue		6	de		1	ue		2	uax		5
Ins(3,4,5,6)P ₄	0.2	3	ue		4	de		5	ue		6	de		1	ue		2	uax		4
Ins(1,3,4,5)P ₄	50	5	ue		6	de		1	ue		2	uax		3	ueP		4	de		4
Ins(1,3,4,5,6)P ₅ "	30	1	ue		2	uax		3	ue		4	de		5	ueP		6	de		5
Ins(1,3,4,5,6)P ₅ "		4	ue		3	de		2	dax		1	de		6	ueP		5	de		5
Ins(1,2,3,4,5,6)P ₆	7,9	5	ue		6	de		1	ue		2	uax		3	ueP		4	de		6

Tabelle 18: Active site mapping der TvIPMK

Kopfteil der Tabelle: Zu den umgesetzten Isomeren ist jeweils die initiale Reaktionsgeschwindigkeit aufgeführt.

Die Zahlen in den mit # gekennzeichneten Spalten benennen die zum besten Substrat, 1,3,4,6 InsP₄ (s. Kopfzeile) äquivalenten Inositolring-Positionen. Angegeben ist dann die Art (P, Phosphat; OH, Hydroxylgruppe der Ring Substituenten (bzw. mit uep codiert die Akzeptor-Phosphatgruppe) und ein Code, s.u., für seine Konfiguration am entsprechenden Ring C-Atom. Die Nummerierung ist gemäß der relaxierten IUPAC Regel (1989b) für *myo*-Inositolphosphate.

ue: äquatorial nach oben gegenüber dem Inositolring konfiguriert

de: äquatorial nach unten gegenüber dem Inositolring konfiguriert

uax: axial nach oben gegenüber dem Inositolring konfiguriert

dax: axial nach unten gegenüber dem Inositolring konfiguriert

Im unteren Teil der Tabelle sind die in dieser Arbeit identifizierten Substrate aufgeführt, welche pyrophosphoryliert werden (Akzeptorcode ueP).

Grün unterlegt ist die jeweilige Akzeptorgruppe (immer in 5-äquivalente Position gebracht), rot unterlegt sind essentielle Phosphatreste für gute Substrate, hellrot unterlegt sind weitere Phosphatgruppen im Substrat, axiale Phosphate sind blau unterlegt. Mit * bzw. + oder # markiert sind die InsP_x Isomere, welche in zwei alternativen Orientierungen phosphoryliert werden. 1,2,4,6 InsP_4 wurde als Substrat prädiiziert.

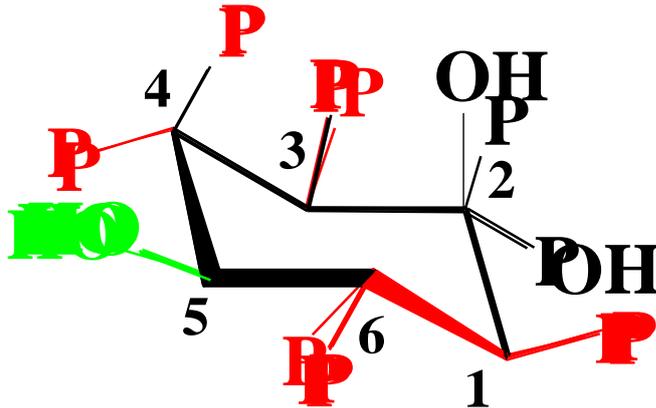


Abbildung 65: Überlagerung der besten Substrate der TvIPMK wie in Tabelle 18 beschrieben

Zur Übersichtlichkeit wurde 1,4,5 InsP_3 weg gelassen. Im Vordergrund dargestellt ist das Drei-Punkt Erkennungsmotiv mit der Akzeptor-Hydroxylgruppe in grün und den beiden (von oben auf den Inositolring in Sesselkonformation gesehen) gegen den Uhrzeigersinn rechts davon positionierten Phosphaten (P), in alternierender äquatorialer trans-Konfiguration. Die Nummerierung bezeichnet die zum 1,3,4,6 InsP_4 äquivalenten Positionen.

Tabelle 18 und Abbildung 65 zeigen nun klar das Prinzip der Substrat-Erkennung: Gegen den Uhrzeigersinn (von oben auf den Inositolring geschaut) rechts von der Ziel-OH-Gruppe (5-äquivalente Position) befindet sich an der nächsten Position (6-äquivalente Position) immer eine Phosphatgruppe. Die Ziel OH-Gruppe und die beiden rechts davon liegenden Phosphatgruppen bilden offensichtlich den Kernbereich der asymmetrischen 3-Punkt Erkennung geeigneter Substrate. Hierbei sind die drei äquatorialen Substituenten (am OH beginnend) so orientiert, dass sie immer alternierend zum Ring nach oben (ue), unten (de) und wieder oben (ue), also in jeweils trans-geminaler Konfiguration, stehen. Es ergibt sich ein asymmetrischer Kern-Erkennungsbereich, welcher bei jedem Substrat vorhanden sein muss. Dabei handelt es sich um eine „half ring recognition“ (an 5',6',1'-

Position) mit einer 5-OH Gruppe und zwei Phosphat-substituierten OH-Gruppen, welche sich entgegen des Uhrzeigersinns an der 1- bzw. 6-Position befinden.

Eine Besonderheit betrifft das Substrat 2,3,4,5,6 InsP₅. Dieses besitzt zwar ein Phosphat an der 6-äquivalenten Position. Dieses ist aber nach axial oben orientiert, was nicht der regulären Ausrichtung des 6-äquivalenten Phosphats nach unten äquatorial entspricht. Dem Substrat 1,3,4 InsP₃ fehlt das 6-äquivalente Phosphat. 3,4,6 InsP₃, dem das Phosphat an der 1-äquivalenten Position fehlt und welches ein Phosphat an der 6-äquivalenten Position besitzt, wird besser als 1,3,4 InsP₃ umgesetzt. 3,4,5,6 InsP₄, welches kein Substrat ist, fehlt das Phosphat an der 6- äquivalenten Position. Daraus kann man schließen dass für das Enzym das Erkennen eines 6-äquivalenten Phosphats wichtiger ist, als das des 1-äquivalenten Phosphats.

In seiner Funktion als Phosphokinase arbeitet TvIPMK nach demselben 3 Punkt-Erkennungsmechanismus im Sinne einer „half ring recognition“ (an 5-,6-,1-Position), nur dass hier anstelle des 5-äquivalenten Hydroxyls jeweils ein analog orientiertes Phosphat (3-, 5-, bzw. 6- ueP Codierung in Tabelle 18) die vom ATP transferierte Gamma-Phosphatgruppe akzeptiert.

Die einzigen Ausnahmen von der asymmetrischen Drei-Punkt-Erkennungsregel bilden wie oben beschrieben die relativ schlechten Substrate 3,4,6 InsP₃, 1,3,4 InsP₃, und 2,3,4,5,6 InsP₅. Offensichtlich reicht das in diesem Fall für eine Bindung als Substrat in zwei alternativen Positionierungen aus (s. Abb. 66). Die zwei alternativen Produkte von 1,3,4 InsP₃, 1,3,4,6 InsP₄ und, in geringerem Maße 1,3,4,5 InsP₄ werden beide schnell zu 1,3,4,5,6 InsP₅ weiter phosphoryliert, welches langsam zu den an 3- bzw. 6-Stelle pyrophosphorylierten PP-InsP₅ Produkten (s.u.) werden.

Gute Substrate können insgesamt drei bis fünf Phosphoester-Substituenten besitzen. Das weist darauf hin, dass die InsP_x-Bindungsdomäne des Enzyms ein bis zwei zusätzliche basische Gruppen (Arg, Lys, His) für die Substraterkennung benutzen könnte. Hierbei scheint die Bindung jedoch sterisch nicht so restriktiv zu sein wie bei der Dreipunkterkennung. So kann ein links von dem Ziel-OH gelegenes Phosphat seine Position zum Ring sowohl äquatorial als auch axial einnehmen. Substrate, welche neben der bezeichneten Dreipunkt-Erkennungsstruktur noch an 4-äquivalenter Stelle ein Phosphat (in de oder uax Orientierung) und/oder Phosphat an 2- und/oder 3-äquivalenter Position (ue oder dax an 3-, de oder uax an 2-äquivalenter Position) liefern in der Regel guten Umsatz.

Da 1,2,6 InsP₃ im Gegensatz zum sehr guten Substrat 1,2,3,4,6 InsP₅ nicht umgesetzt wird, lässt sich folgern, dass bei einem axialen noch oben orientierten 2-äquivalenten Phosphat

rechts vom essentiellen 1-äquivalenten Phosphat nur dann ein Substrat toleriert wird, wenn gleichzeitig Phosphatgruppen links vom Ziel-OH vorhanden sind. In diesem Zusammenhang wurde 1,2,4,6 InsP₄ als gut umgesetztes Molekül prädiziert. Weiterhin zeigt sich, dass die TvIPMK keines seiner Substrate am axialen 2-OH phosphoryliert. Dies wird insbesondere am Umsatz von 1,3,4,5,6 InsP₅ deutlich, welches nicht an der 2-Position hydroxyphosphoryliert, sondern sehr langsam zu PP-InsP₄ pyrophosphoryliert wird.

4.4 Enantiomerenselektivität der TvIPMK

Enantiomerenpaare		Enantioselektivität Faktor V ₁ /V ₂	
D () InsP _x	D () InsP _x		
2,3,5	>	1,2,5	11,4
1,4,6	>	3,4,6	8,2
1,3,4,5	>	1,3,5,6	7,7
1,4,5,6	>	3,4,5,6	1365
1,2,3,6	>	1,2,3,4	29,0
2,3,4,5	>	1,2,5,6	1,6
1,2,4,5,6	>	2,3,4,5,6	5658
1,2,3,4,5	>	1,2,3,5,6	3,1

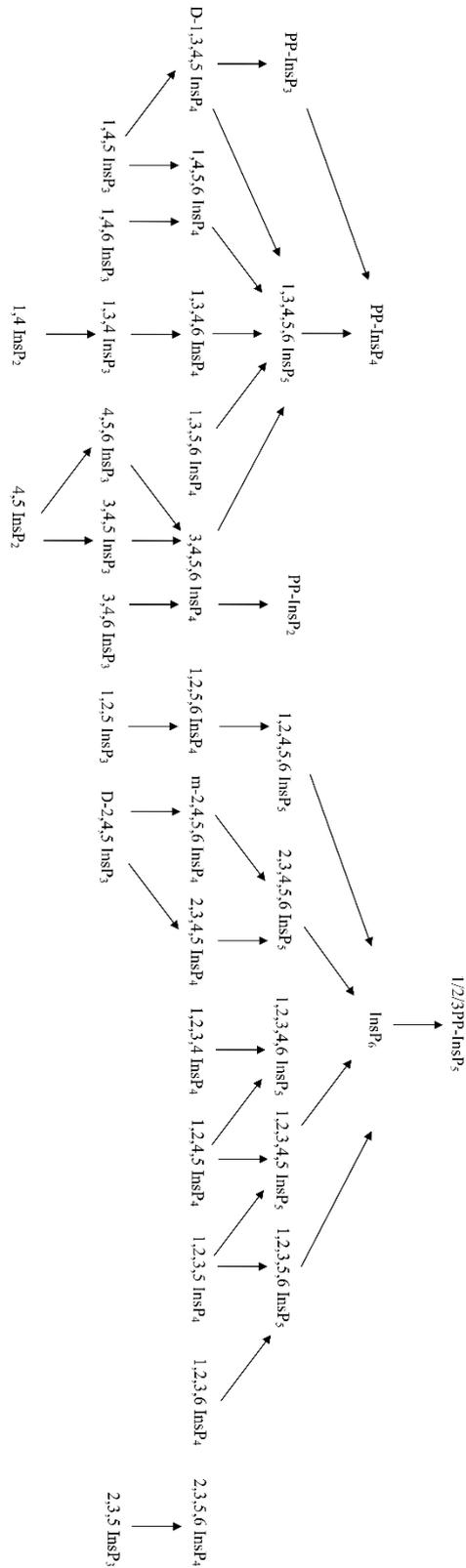
Abbildung 66: Enantiomerenselektivität der TvIPMK

Unter Berücksichtigung der Umsetzung aller 34 Substrate der TvIPMK ergibt sich die oben gezeigte Enantiomerenselektivität des Enzyms. Diese ist besonders auffällig in Bezug auf die Enantiomerenpaare 1,2,3,4,5,6 InsP₅/2,3,4,5,6 InsP₅ und 1,4,5,6 InsP₄/3,4,5,6 InsP₄. Bei den schlechter umgesetzten Substraten handelt es sich dabei um jene, die wie oben beschrieben von dem beschriebenen bevorzugten 3- Punkte Erkennungsmechanismus abweichen. Den im Enantiomerenvergleich schlechteren Substraten 2,3,4,5,6 InsP₅ und 3,4,5,6 InsP₄ ist dabei gemeinsam, dass ihnen das Phosphat an der 6-äquivalenten Position fehlt.

Die Enantiomerenselektivität, welche sich hier für das Enantiomerenpaar 1,2,3,4,5,6 InsP₅/2,3,4,5,6 InsP₅ findet, findet sich in ähnlicher Weise in der humane IPMK (Wundenberg et al., 2014). Die humane IPMK setzt unter den getesteten Bedingungen ausschließlich 1,2,4,5,6 InsP₅ und nicht 2,3,4,5,6 InsP₅ um.

4.5 Der Inositolphosphatmetabolismus der TvIPMK in *Trichomonas vaginalis*

Die untenstehende Abbildung fasst den Metabolismus der Inositolphosphate durch die TvIPMK im Überblick zusammen:



4.6 Diskussion der Bedeutung der TvIPMK

Unter Betrachtung der Abbildung zum Inositolphosphatmetabolismus wird deutlich, dass die TvIPMK dafür verantwortlich ist, eine Vielzahl an InsP_3 -, InsP_4 -, und InsP_5 -Isomere zu phosphorylieren. Als gemeinsames Endprodukt zahlreicher verschiedener InsP_3 -, InsP_4 -, und InsP_5 -Isomere entsteht auf diese Weise 1,3,4,5,6 InsP_5 bzw. InsP_6 . In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, dass InsP_6 das Inositolphosphat ist, welches am häufigsten in *Trichomonas vaginalis* vorkommt (Wundenberg et al., 2019). Das zweithäufigste Inositolphosphat, welches sich in *Trichomonas vaginalis* findet ist PP- InsP_4 (Wundenberg et al., 2019). Die genaue Zusammensetzung von Inositolphosphaten in lebenden *Trichomonas vaginalis* wird in der nachfolgenden Abbildung verdeutlicht.

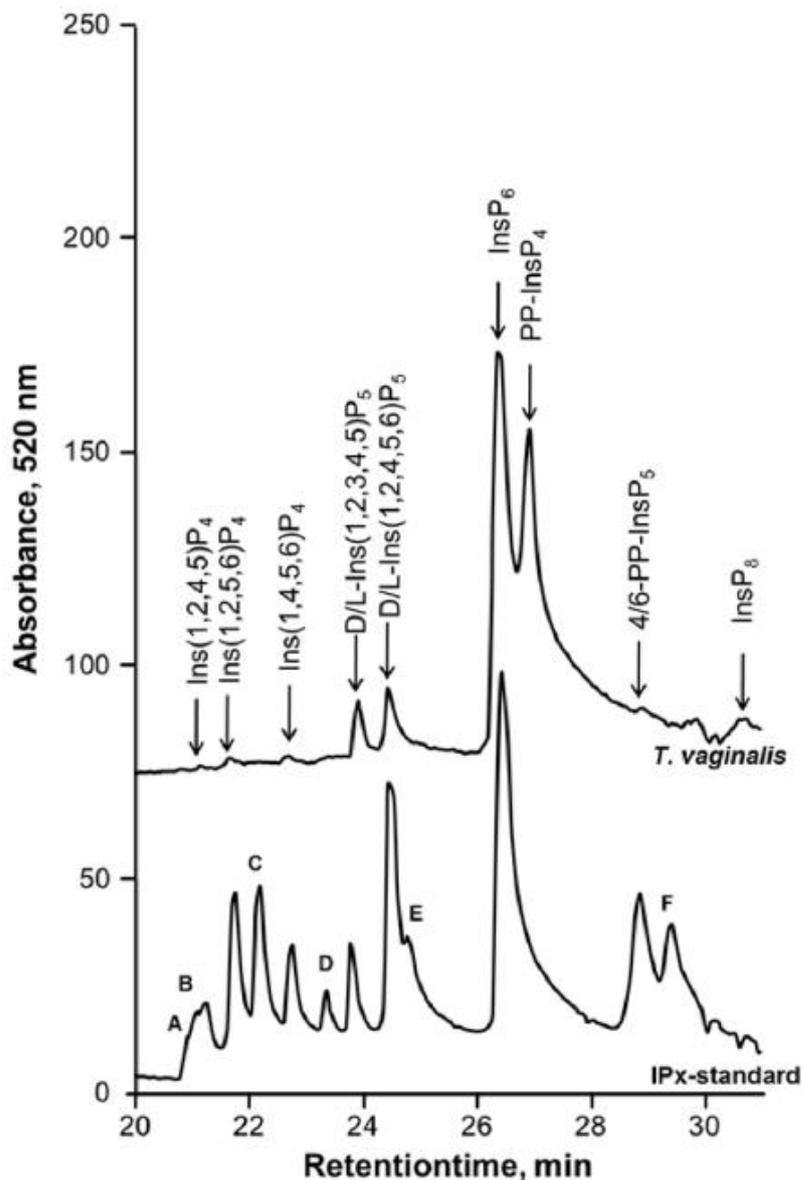


Abbildung 68: Inositolphosphatzusammensetzung in lebenden *Trichomonas vaginalis*

Beschriftung zu Abbildung 68:

A = 1,2,4,6 InsP₄, 1,2,3,5 InsP₄

B = 1,2,3,4 InsP₄, 1,3,4,6 InsP₄

C = 2,4,5,6 InsP₄

D = 1,2,3,4,6 InsP₅

E = 1,3,4,5,6 InsP₅

F = 1/2/3PP-InsP₅

aus Wundenberg T et al. (2019). A novel 6-pyrophosphorylating IP6 kinase (IP6-6K) discovered in the protozoon *Trichomonas vaginalis* Inositol derivatives: evolution and functions. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 227, 60: Fig. 8 Analysis of inositol phosphate content in living *T. vaginalis*

Unter Betrachtung der Inositolphosphatzusammensetzung in *Trichomonas vaginalis* scheint es, dass TvIPMK das Enzym bzw. eines der Enzyme ist, welches für die Bildung von großen Mengen InsP₆ in *Trichomonas vaginalis* verantwortlich ist. Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit als weiteres Hauptprodukt der TvIPMK 1,3,4,5,6 InsP₅ identifiziert (s. Abbildung 67). Letzteres wird durch die TvIPMK in einer sehr langsamen Reaktion zu PP-InsP₄ pyrophosphoryliert. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die TvIPMK für die Bildung desjenigen Substrates verantwortlich ist, aus welchem in großen Mengen PP-InsP₄ gebildet werden kann – ein Teil davon möglicherweise von der TvIPMK. Aufgrund der geringen spezifischen Aktivität des Enzyms für das Substrat, erscheint es jedoch sehr wahrscheinlich, dass es noch ein weiteres bzw. andere Enzyme gibt, die für die Bildung von PP-InsP₄ hauptverantwortlich sind. Diese Überlegung ist konkordant mit den Forschungsergebnissen von Torsten Wundenberg et al.. So konnte für die TvIP6K1 gezeigt werden, dass sie 1,3,4,5,6 InsP₅ pyrophosphoryliert und zwar zu 4/6PP-InsP₄, welches anschließend zu 4,6PP₂-InsP₃ pyrophosphoryliert wird. Die spezifische Aktivität für den Umsatz der TvIP6K4 für 1,3,4,5,6 InsP₅ beträgt 160 nmol/mg/min. (Wundenberg et al., 2019).

Die Bedeutung der Synthese von 1,3,4,5,6 InsP₅ durch die TvIPMK für *Trichomonas vaginalis* scheint unter anderem in seiner Rolle als Ausgangsprodukt für die Synthese von PP-InsP₄ zu liegen. Konkordant mit dieser Hypothese ist, dass das Inositolphosphat 1,3,4,5,6 InsP₅ auch bei Mammalia der Dreh- und Angelpunkt des Inositolphosphatmetabolismus ist (Irvine and Schell, 2001).

Die Bedeutung von PP-InsP₄ für *Trichomonas vaginalis* ist bis dato nicht erforscht, jedoch liegen Forschungsarbeiten zur Bedeutung von PP-InsP₄ für Mammalia und Hefen vor. Das Enzym *ksc1* in Hefen und das Enzym IP6K in Mammalia können nämlich 1,3,4,5,6 InsP₅ pyrophosphorylieren. In Mammalia und Hefen korreliert das zelluläre Vorliegen von PP-InsP₄ negativ mit der Telomerlänge (Saiardi et al., 2005, York et al., 2005). Als Gegenspieler wurden in Hefen die Familie der PIKK (Phosphoinositide-3-kinase-related protein kinase) identifiziert, zu denen die Proteinkinasen Tel1, Mec1 und Tor1/2 gehören (York et al., 2005). Tel1 ist notwendig für die regelrechte Assoziation von Telomerasen an Telomere (Bianchi and Shore, 2007, Ritchie et al., 1999, Shore and Bianchi, 2009, Takata et al., 2004). Außerdem konnte für Tel1 gezeigt werden, dass es zusammen mit weiteren Proteinen dafür verantwortlich ist, DNA-Doppelstrangbrüche, durch seine Kinaseaktivität zu signalisieren und Reparaturkomplexe zu formen (Hiom, 2005, Longhese, 2008). Interessanterweise scheint die Tel1 Aktivität durch erhöhte PP-InsP₄ Konzentrationen gehemmt zu werden (Saiardi et al., 2005). Somit führen erhöhte PP-InsP₄ Konzentrationen zu einer Beeinträchtigung der DNA-Reparatur Mechanismen und zu einer Verkürzung der Telomerlänge. Der PIKK Familie in Mammalia beinhaltet die Proteine ATM, ATR, DNA-PKcs, und mTor (Shiloh, 2003). DNA-PKcs detektieren verkürzte Telomere, signalisieren das Vorhandensein „geschädigter“ DNA und triggern die Zellapoptose (Espejel et al., 2002). Außerdem interagieren sie mit der Telomerase, um die regelrechte Telomerlänge aufrecht zu erhalten und sind für das Aufrechterhalten der 5'-Cap Struktur von Bedeutung (Bailey et al., 2001, Espejel et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von DNA-Reparatur Faktoren XRCC4 abhängig von InsP₆ ist (Hanakahi, 2011). Deren Phosphorylierung ist wiederum vom Vorliegen von DNA-PK abhängig (Hanakahi, 2011). DNA-PK beschreibt den DNA-PK_{cs}-Komplex, der sich bildet, wenn InsP₆ an das Protein Ku bindet und welcher eine Rolle bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen spielt (Ma and Lieber, 2002).

Ob und inwiefern, die Signaltransduktion bei *Trichomonas vaginalis* vergleichbar ist mit derjenigen, der hier beschriebenen Hefen und Mammalia können nur weitere Forschungen zeigen.

Neben der Bedeutung als Ausgangsprodukt für PP-InsP₄ kommen 1,3,4,5,6 InsP₅ möglicherweise weitere bedeutende Eigenschaften zu.

Bezüglich der möglichen Bedeutung von 1,3,4,5,6 InsP₅ konnten kürzlich hochinteressante Ergebnisse für den Parasit *Trypanosoma brucei*, dem Erreger der Schlafkrankheit aufgezeigt werden. Ähnlich wie *Trichomonas vaginalis* durchläuft der Erreger im Laufe

seines Lebenszyklus verschiedene Stadien (Cestari and Stuart, 2020). Über den Stich einer infizierten Tsetsefliege gelangen mit dem Speichel metazyklische trypomastigote Zellen ins Gewebe des Säugetierwirtes. Diese wandeln sich Trypomastigoten um und vermehren sich durch Längsteilung. Anschließend gelangen sie ins lymphatische System und in die Blutbahn, wo sie sich weiter vermehren und schließlich in kurze, gedrungene Trypomastigote umwandeln, die sich nicht mehr vermehren, aber infektiös für Fliegen sind (Cestari and Stuart, 2020). Nach Aufnahme durch die Fliegen wandeln sich diese erneut in proliferative prozyklische Formen um, die sich dann weiter zur Epimastigoten umwandeln, die die Speicheldrüsen kolonisieren und die infektiöse metazyklische Form produzieren. Während der Parasit im Säugetierwirt lebt, stellt er seinen Stoffwechsel auf Glykolyse um und mit Aufnahme in die Tsetsefliege nutzt er die oxydative Decarboxylierung (Cestari and Stuart, 2020). Hierbei scheint die IPMK, welche für die Synthese von 1,3,4,5,6 InsP₅ verantwortlich ist, eine entscheidende Rolle zu spielen. Beim Knockout derselben kommt es zum Übergang der sich im Blut vermehrenden Trypomastigote in die proliferative prozyklische Form und zum Wechsel von der Glykolyse zur oxidativen Phosphorylierung (Cestari et al., 2016, Cestari and Stuart, 2020). Möglicherweise spielt auch die Synthese des 1,3,4,5,6 InsP₅ in *Trichomonas vaginalis* durch die TvIPMK eine bedeutende Rolle beim Übergang von einem Stadium ins andere in Lebenszyklus von *Trichomonas vaginalis*.

Das zweite gemeinsame Endprodukt zahlreicher verschiedener InsP₃-, InsP₄- und InsP₅-Isomere der TvIPMK ist InsP₆. Dasjenige Inositolphosphat, welches am häufigsten in *Trichomonas vaginalis* vorkommt (Wundenberg et al., 2019) und welches Ausgangsprodukt für die Entstehung höherphosphorylierter Inositolphosphate ist (s. 4.1., 4.5 und 4.10).

In Eukaryoten konnten bereits verschiedene Funktionen des InsP₆ identifiziert werden. InsP₆ wird eine Bedeutung bei der DNA-Reparatur zugeschrieben. So haben Studien gezeigt, dass InsP₆ bei DNA-Doppelstrangbrüchen die DNA-PK-abhängige Reparatur mittels nicht homologen End joining stimuliert (Hanakahi et al., 2000).

Dies wirft die Frage auf, ob die Inositolphosphate InsP₆ und PP-InsP₄ funktionell zueinander wie Gegenspieler wirken, da das Vorhandensein von PP-InsP₄ DNA-Reparatur Mechanismen beeinträchtigt und eine Verkürzung von Telomeren begünstigt, während InsP₆ genau das Gegenteil bewirkt. Somit könnte diesen beiden Inositolphosphate insbesondere auch in Abhängigkeit des jeweiligen Stadiums im Lebenszyklus von *Trichomonas vaginalis* eine nicht unwesentliche Rolle spielen.

Darüber hinaus spielt InsP_6 eine Rolle beim Chromatin Remodelling, welches es inhibiert, wohingegen es durch 1,4,5,6 InsP_4 und InsP_5 stimuliert wird (Shen et al., 2003, Steger et al., 2003). Dies könnte insbesondere in Hinblick auf die große Größe des Genoms von *Trichomonas vaginalis* von Bedeutung sein.

Weiterhin wird InsP_6 eine Rolle bei dem nukleären mRNA Export zugeschrieben, (York et al., 1999). So wird diskutiert, dass InsP_6 eine Rolle bei Formation des Kernporenkomplexes zukommt bzw. es der Inhibition des mRNA Exports entgegenwirkt.

Auch wurde postuliert, dass InsP_6 eine Rolle beim Vesikeltransport spielt. So konnte gezeigt werden, dass InsP_6 mit verschiedenen intrazellulären Proteinen interagiert, namentlich AP2 und Arrestin, die alle eine Rolle beim Vesikeltransport spielen (Voglmaier et al., 1992, Gaidarov et al., 1999, Norris et al., 1995). InsP_6 bindet an den tetrameren Komplex von AP-2 und an das AP180-Monomer. Beide Proteine spielen eine Rolle bei der Endozytose, bei der Polymerisation von Clathrin und der Vesikelbildung (Beck and Keen, 1991, Gaidarov et al., 1996, Norris et al., 1995, Ye et al., 1995). Jedoch legen neuere Studien nahe, dass Phospholipide stärkere Liganden sind als InsP_6 , sodass die physiologische Bedeutung dieser Ergebnisse fraglich ist (Gaidarov et al., 1996, Hao et al., 1997).

Bei der Interaktion mit Arrestin behindert InsP_6 in hohen Konzentrationen die Bindung an Clathrin bzw. den Rezeptor (Sasakawa et al., 1995, Shears, 1996). Da InsP_6 jedoch physiologisch in mikromolaren Konzentrationen vorkommt, ist ungeklärt, inwiefern dies von physiologischer Relevanz ist.

Welche Bedeutung InsP_6 für *Trichomonas vaginalis* hat und inwiefern diese vergleichbar ist, können nur weitere Forschungen zeigen.

Setzt man die Ergebnisse dieser Doktorarbeit mit den aktuellen Forschungsergebnissen in Verbindung, lässt sich jedoch die Hypothese etablieren, dass die Produkte der TvIPMK, insbesondere InsP_6 und 1,3,4,5,6 InsP_5 eine bedeutende Rolle bei der Pathogenese und der Vermehrung von *Trichomonas vaginalis* spielen und möglicherweise Einfluss auf den Übergang von einer Phase des Lebenszyklus zur nächsten haben und zudem die Schnittstelle zu Entstehung pyrophosphorylierter Inositolphosphate darstellen.

4.7 Charakterisierung der Substratspezifität der TvIP6K4

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Substratspezifität der TvIP6K4 zeigen, dass es sich bei dem Enzym um eine multiple Inositolphosphatphosphokinase handelt, welche fünf verschiedene InsP₄-Isomere, fünf verschiedene InsP₅-Isomere, InsP₆ und zwei InsP₇-Isomere pyrophosphorylieren kann. Dabei pyrophosphoryliert sie ihre Substrate vorzugsweise. Die einzigen beiden Substrate, welche sie nicht pyrophosphoryliert sind 1,4,5,6 InsP₄ und 2,4,5,6 InsP₄. Die Hauptaktivität zeigt das Enzym dabei als PP-InsP₅-Phosphokinase. Ihr identifiziertes Hauptsubstrat ist 4/6 PP-InsP₅.

Die nachfolgende Tabelle fasst die einzelnen Substratspezifitäten zusammen:

x und y sind dabei Platzhalter für unbekannte und nicht notwendigerweise identische Phosphorylierungspositionen.

InsP	Substrat	Produkte	Kinase-Selektivität
InsP ₄	1,2,4,5 InsP ₄ / 2,3,5,6 InsP ₄	PP-InsP _{3 A/B}	1,2,4,5 InsP _{4-x} -P-Kinase 2,3,5,6 InsP _{4-x} -P-Kinase
	1,2,4,6 InsP ₄	PP-InsP ₃	1,2,4,6 InsP _{4-x} -P-Kinase
	1,3,4,5 InsP ₄	PP-InsP _{3 A/B}	1,3,4,5 InsP _{4-x} -P-Kinase
	2,4,5,6 InsP ₄	2,3,4,5,6 InsP ₅	2,4,5,6 InsP ₄₋₃ -OH-Kinase
	3,4,5,6 InsP ₄	PP-InsP ₃	3,4,5,6 InsP _{4-x} -P-Kinase
InsP ₅	2,3,4,5,6 InsP ₅	4/6 PP-InsP _{4 A} PP-InsP _{4 B}	2,3,4,5,6 InsP _{5-4/6} -P-Kinase 2,3,4,5,6 InsP _{5-x} -P-Kinase
	1,2,3,4,5 InsP ₅	PP-InsP _{4 A1/B1}	1,2,3,4,5 InsP _{5-x/y} -P-Kinase
	1,2,3,4,6 InsP ₅	PP-InsP _{4 A1/B1}	1,2,3,4,6 InsP _{5-x/y} -P-Kinase
	1,2,4,5,6 InsP ₅	PP-InsP _{4 B1}	1,2,4,5,6 InsP _{5-x} -P-Kinase
	1,3,4,5,6 InsP ₅	4/6PP-InsP ₄ xPP-InsP _{4 B/C/D}	1,3,4,5,6 InsP _{5-4/6} -P-Kinase 1,3,4,5,6 InsP _{5-x} -P-Kinase
InsP ₆	InsP ₆	4PP-InsP ₅ 5PP-InsP ₅ 6PP-InsP ₅	InsP ₆₋₄ -P-Kinase InsP ₆₋₅ -P-Kinase InsP ₆₋₆ -P-Kinase
	4 PP-InsP _{4 A}	4,6PP ₂ -InsP ₃	4PP-InsP ₄₋₆ -P-Kinase
	6 PP-InsP _{4 A}	4,6PP ₂ -InsP ₃	6PP-InsP ₄₋₄ -P-Kinase
	xPP-InsP _{4 A1}	x,yPP ₂ -InsP _{3 A1}	PP-InsP _{4-y} -P-Kinase
	xPP-InsP _{4 B}	x,yPP ₂ -InsP _{3 B}	xPP-InsP _{4 B-y} -P-Kinase

		4,6PP ₂ -InsP ₃	xPP-InsP _{4 A} -4/6-P-Kinase
	xPP-InsP _{4 B1}	x,yPP ₂ -InsP _{3 A1}	xPP-InsP ₄ -y-P-Kinase
	xPP-InsP _{4 C}	x,yPP ₂ -InsP _{3 C}	xPP-InsP _{4 C} -y-P-Kinase
		4,6PP ₂ -InsP ₃	xPP-InsP _{4 C} -4/6-P-Kinase
	xPP-InsP _{4 D}	x,yPP ₂ -InsP _{3 D}	xPP-InsP _{4 D} -y-P-Kinase
		4,6PP ₂ -InsP ₃	xPP-InsP _{4 D} -4/6-P-Kinase
InsP ₇	4PP-InsP ₅	4,5PP ₂ -InsP ₄	4PP-InsP ₅ -5-P-Kinase
	5PP-InsP ₅	1,5PP ₂ -InsP ₄	5PP-InsP ₅ -1-P-Kinase
		3,5PP ₂ -InsP ₄	5PP-InsP ₅ -3-P-Kinase
		4,5PP ₂ -InsP ₄	5PP-InsP ₅ -4-P-Kinase
		5,6PP ₂ -InsP ₄	5PP-InsP ₅ -6-P-Kinase
	6PP-InsP ₅	5,6PP ₂ -InsP ₄	6PP-InsP ₅ -5-P-Kinase
InsP ₈	4,5PP ₂ -InsP ₄	x,4,5PP ₃ -InsP ₃	4,5PP ₂ -InsP ₄ -x-P-Kinase
	5,6PP ₂ -InsP ₄	x,5,6PP ₃ -InsP ₃	5,6PP ₂ -InsP ₄ -x-P-Kinase

Tabelle 19: Überblick über die Substratspezifität der TvIP6K4

4.7.1 Prädiktion von Modellstrukturen der pyrophosphorylierten Inositolphosphate

Nachfolgend werden mögliche Strukturmodelle der pyrophosphorylierten Inositolphosphate diskutiert. Diese Diskussion erfolgt unter Berücksichtigung der etablierten Substrat-Produkt-Beziehungen, die in der obenstehenden Abbildung im Überblick zusammengefasst werden.

Allen Substraten ist gemeinsam, dass sie ein Phosphat an der 4-Position besitzen. Das Hauptsubstrat besitzt außerdem ein Pyrophosphat entweder an der 4- oder an der 6-Position. Dies spricht dafür, dass das Phosphat in der 4-Position eine Rolle für die Bindung der Substrate an das aktive Zentrum spielen könnte bzw. spricht es dafür, dass die 4-Phosphat-Position ein gutes Pyrophosphorylierungsziel für das Enzym ist.

4.7.1.1 Prädiktion von Modellstrukturen der pyrophosphorylierten Inositol-4-Phosphate

Beim Umsatz von sämtlichen InsP_4 entsteht PP-InsP_3 (PP-InsP_{3A}). Beim Umsatz des Enantiomeregemischs 1,2,4,5/2,3,5,6 InsP_4 und beim Umsatz von 1,3,4,5 InsP_4 entsteht ein PP-InsP_3 (PP-InsP_{3B}), welches bei dem Umsatz der anderen InsP_4 -Isomere nicht entsteht. Alle InsP_4 besitzen mit Ausnahme von 2,3,5,6 InsP_4 , ein Phosphat in der 4-Position. Da 2,3,5,6 InsP_4 das einzige Substrat ist, welches von dieser Regelmäßigkeit abweicht, erscheint es möglich, dass das PP-InsP_{3B} als Produkt aus 2,3,5,6 InsP_4 entsteht.

Den übrigen InsP_4 -Isomeren, die pyrophosphoryliert werden, ist gemeinsam, dass sich im Uhrzeigersinn von der 4-Position maximal ein Phosphat in nächster bzw. übernächster Position befindet. Unter Betrachtung all dieser Aspekte wird die Hypothese aufgestellt, dass diese InsP_4 -Isomere an der 4-Phosphat-Position pyrophosphoryliert werden.

Unter Berücksichtigung dieser Aspekte ergeben sich zusammenfassend folgende Prädiktionen zur Struktur der Inositolphosphate:

InsP	Substrat	Produkte	Kinase-Selektivität
InsP ₄	1,2,4,5 InsP ₄	4PP-InsP ₃	1,4,5,6 InsP ₄ -4-P-Kinase
	1,2,4,6 InsP ₄	4PP-InsP ₃	1,2,4,6 InsP ₄ -4-P-Kinase
	1,3,4,5 InsP ₄	4PP-InsP ₃	1,3,4,5 InsP ₄ -4-P-Kinase
	3,4,5,6 InsP ₄	4PP-InsP ₃	3,4,5,6 InsP ₄ -4-P-Kinase

Tabelle 20: Prädiktion der Struktur der pyrophosphorylierten Inositol-4-Phosphate

4.7.1.2 Prädiktion von Modellstrukturen der pyrophosphorylierten Inositol-5-Phosphate

Das Enzym pyrophosphoryliert fünf der InsP₅-Isomere. Bei dreien, namentlich 1,3,4,5,6 InsP₅, 2,3,4,5,6 InsP₅ und 1,2,4,5,6 InsP₅ ist bekannt, dass diese weiter zu 4,6PP₂-InsP₃ pyrophosphoryliert werden. Es ist unklar, ob die erste Pyrophosphorylierung an der 4- oder an der 6-Position erfolgt. Dafür, dass die Pyrophosphorylierung zuerst an der 4-Position erfolgt, spricht, dass sich bei allen Enzymen im Uhrzeigersinn von dieser Pyrophosphorylierungsstelle zwei weitere Phosphate befinden, sodass die Inositolphosphate für die erste Pyrophosphorylierung in ähnlicher Weise ausgerichtet werden könnten.

1,3,4,5,6 InsP₅, 2,3,4,5,6 InsP₅ und 1,2,4,5,6 InsP₅ werden außerdem weiter zu PP-InsP_{4 B} pyrophosphoryliert. Ihnen ist gemeinsam, dass sich im Uhrzeigersinn von dem Phosphat in der 4-Position zwei Phosphate befinden. Da dies bei den übrigen InsP₅-Isomeren nicht der Fall ist, kann dies ein Hinweis darauf sein, dass das Enzym diese Substrate an der 5-Position pyrophosphoryliert.

Das Produkt PP-InsP_{4 B1} entsteht aus Pyrophosphorylierung von 1,2,3,4,5 InsP₅, 1,2,4,5,6 InsP₅ und 1,2,3,4,6 InsP₅. All diesen Produkten ist das Phosphat an 1- und 2-Position gemeinsam. Da für keine der charakterisierten Inositolphosphatkinasen aus *Trichomonas vaginalis* die Fähigkeit zur Phosphorylierung bzw. Pyrophosphorylierung der umgesetzten Inositolphosphate gezeigt werden konnte, erscheint es aufgrund der Struktur der Substrate möglich, dass diese an ihrer 1-Phosphat-Position pyrophosphoryliert werden.

1,2,3,4,6 InsP₅ und 1,2,3,4,6 InsP₅ werden zusätzlich noch zu PP-InsP_{4 A1} pyrophosphoryliert. Beiden Substraten ist gemeinsam, dass sie an 1-, 2- und 3-Position ein Phosphat besitzen. Vergleicht man sie mit den Ausgangssubstraten von PP-InsP_{4 B1} so sind die Eigenschaften, die alle Substrate gemeinsam haben die Phosphate in der 2- und 3-Position. Unter Beachtung der Hypothese, dass keine Pyrophosphorylierung an der 2-Position erfolgt, wird postuliert, dass es sich bei PP-InsP_{4 A1} um 3-PP-InsP_{4 A1} handelt.

Unter Berücksichtigung dieser Aspekte ergeben sich zusammenfassend folgende Prädiktionen zur Struktur der Inositolphosphate:

InsP	Substrat	Produkte	Kinase-Selektivität
InsP ₅	2,3,4,5,6 InsP ₅	4/6 PP-InsP ₄ 5PP-InsP _{4 B}	2,3,4,5,6 InsP ₅ -4/6-P-Kinase 2,3,4,5,6 InsP ₅ -3-P-Kinase
	1,2,4,5,6 InsP ₅	5PP-InsP _{4 B} 1PP-InsP _{4 B1}	1,2,4,5,6 InsP ₅ -3-P-Kinase 1,2,4,5,6 InsP ₅ -1-P-Kinase

	1,3,4,5,6 InsP ₅	4/6PP-InsP ₄ 5PP-InsP _{4 B}	1,3,4,5,6 InsP ₅ -4/6-P-Kinase 1,3,4,5,6 InsP ₅ -5-P-Kinase
	1,2,3,4,5 InsP ₅	3PP-InsP _{4 A1} 1PP-InsP _{4 B1}	1,2,3,4,5 InsP ₅ -3-P-Kinase 1,2,3,4,5 InsP ₅ -1-P-Kinase
	1,2,3,4,6 InsP ₅	3PP-InsP _{4 A1} 1PP-InsP _{4 B1}	1,2,3,4,6 InsP ₅ -3-P-Kinase 1,2,3,4,6 InsP ₅ -1-P-Kinase
InsP ₆	5PP-InsP _{4 B}	5,yPP ₂ -InsP _{3 B}	5PP-InsP _{4 B} -y-P-Kinase

Tabelle 21: Prädiktion der Struktur der pyrophosphorylierten Inositol-5-Phosphate

4.7.1.3 Prädiktion von Modellstrukturen der PP₂-InsP₃-Isomere

4/6PP-InsP₄ und 5PP-InsP₄ werden ein zweites Mal pyrophosphoryliert, sodass ein PP₂-InsP₃ entsteht. Dieses wurde in dieser Arbeit zunächst als PP₂-InsP_{3 B1} bezeichnet. Unter Betrachtung der Tatsache, dass dieses sowohl aus 5PP-InsP₄ als auch aus 4/6PP-InsP₄ entsteht und unter Berücksichtigung der prädizierten Inositolphosphate, handelt es sich am ehesten um ein 5,6PP₂-InsP₃ bzw. 4,5PP₂-InsP₃. Diese Hypothese beruht auf der Tatsache, dass das Enzym unter Betrachtung aller Ergebnisse seine Substrate am ehesten an der 5-, der 4- und der 6-Position zu pyrophosphorylieren scheint.

Unter Berücksichtigung dieser Aspekte ergeben sich zusammenfassend folgende Prädiktionen zur Struktur der Inositolphosphate:

InsP	Substrat	Produkte	Kinase-Selektivität
4PP-InsP ₄	4PP-2,3,5,6 InsP ₄	4,5PP ₂ -2,3,6 InsP ₃	4PP-2,3,5,6 InsP ₄ -5-P-Kinase
	4PP-1,3,5,6 InsP ₄	4,5PP ₂ -1,3,6 InsP ₃	4PP-1,3,5,6 InsP ₄ -5-P-Kinase
5PP-InsP ₄	5PP-2,3,4,6 InsP ₄	4,5PP ₂ -2,3,6 InsP ₃	5PP-2,3,4,6 InsP ₄ -4-P-Kinase
	5PP-1,3,4,6 InsP ₄	4,5PP ₂ -1,3,4,6 InsP ₃	5PP-1,3,4,6 InsP ₄ -4-P-Kinase
6PP-InsP ₄	6PP-2,3,4,5 InsP ₄	5,6 PP-2,3,4 InsP ₃	6PP-2,3,4,5 InsP ₄ -5-P-Kinase
	6PP-1,3,4,5 InsP ₄	5,6 PP-1,3,4 InsP ₃	6PP-1,3,4,5 InsP ₄ -5-P-Kinase

Tabelle 22: Prädiktion der Struktur der PP₂-InsP₃-Isomere

4.8 Der Inositolphosphatmetabolismus der TvIP6K4 in Trichomonas vaginalis

Die untenstehende Abbildung fasst den Metabolismus der Inositolphosphate durch die TvIP6K4 unter Berücksichtigung der prädizierten Inositolphosphatstrukturen im Überblick zusammen.

4.9 Diskussion der Bedeutung der TvIP6K4

Unter Betrachtung der Inositolphosphatzusammensetzung in *Trichomonas vaginalis* wird hier postuliert, dass die TvIPK4 das Enzym bzw. eines der Enzyme ist, welches für die Bildung einer breiten Vielzahl pyrophosphorylierter Inositolphosphate, insbesondere aber für die Pyrophosphorylierung von 4/6PP-InsP₅ in *Trichomonas vaginalis* verantwortlich ist. Für die TvIP6K1 konnte gezeigt werden, dass sie InsP₆ zu 6PP-InsP₅ pyrophosphoryliert, (Wundenberg et al., 2019). Somit scheint es möglich, dass der TvIP6K1 eine Bedeutung für die Synthese des Hauptsubstrates der TvIP6K4 zukommt. Das zweitbeste identifizierte Substrate der TvIP6K4 ist InsP₆, welches zusammen mit 1,3,4,5,6 InsP₅ eines der Hauptprodukte der TvIPMK für *Trichomonas vaginalis* ist. Zusätzlich pyrophosphoryliert die TvIP6K4 mehrere InsP₄- und InsP₅-Isomere. Es erscheint somit möglich, dass die TvIP6K4 in *Trichomonas vaginalis* eine wichtige Schnittstelle zwischen dem Stoffwechsel von monophosphorylierten hin zu pyrophosphorylierten Inositolphosphaten bildet.

Möglicherweise hat die TvIP6K4 auch einen nicht unbedeutenden Anteil an der Bildung des zweithäufigsten in *Trichomonas vaginalis* nachgewiesenem Inositolphosphat PP-InsP₄ (Wundenberg et al., 2019). Nicht nur pyrophosphoryliert das Enzym multiple InsP₅, das drittbeste identifizierte Substrat 2,3,4,5,6 InsP₅ ist eines der Ausgangssubstrate hierfür.

In der Vergangenheit wurden in verschiedenen Forschungsbereichen unterschiedliche Stoffwechselwege und zelluläre Vorgänge untersucht, bei denen pyrophosphorylierte Inositolphosphate von Bedeutung sind. Nachfolgend werden ausgewählte Vorgänge vorgestellt. Hinsichtlich der möglichen Bedeutung von PP-InsP₄ wird auf den Abschnitt 4.6 verwiesen.

Für Mammalia scheinen pyrophosphorylierte Inositolphosphate eine bedeutende Rolle in der Regulation des Phosphathaushaltes zu spielen (Azevedo and Saiardi, 2017). So waren in IP6K1/2 Knockout Zellen in Mammalia InP₆, InsP₇ und InsP₈ nicht mehr messbar, PP-InsP₄ erniedrigt bei gleichzeitig erhöhten Leveln an ATP und freien Phosphat (Wilson et al., 2019). Für Mammalia wurde gezeigt, dass sich die Konzentration an 1,5PP₂-InsP₄ deutlich beim Auftreten von osmotischem Stress, Hitze oder Kälte erhöht (Choi et al., 2005, Choi et al., 2007, Pesesse et al., 2004).

Die Genregulation bei oxidativem Stress wurde von Gould et al. bei *Trichomonas vaginalis* untersucht (Gould et al., 2013). Hierbei wurde gezeigt, dass TvIP6K4 nach dreißigminütiger Exposition gegenüber oxidativem Stress herunter reguliert wurde. Hingegen wurden die Gene für TvIPK-2 und TvIP6K-3 herauf reguliert. Somit scheint *Trichomonas vaginalis* ähnlich wie Mammalia ein protektiver Mechanismus gegenüber

äußeren, umweltbedingten Stressoren zu besitzen. Da bislang jedoch nicht erforscht ist, welche Rolle im Inositolphosphatmetabolismus TvIPK2 und TvIP6K3 übernehmen, ist keine Aussage darüber möglich, ob die Regulation der pyrophosphorylierten Inositolphosphate vergleichbar ist mit der der Mammalia.

Weiterhin konnten Forschungen zeigen, dass PP-InsP_x eine Rolle bei der Regulation der Telomerlänge (s.4.4), der Cyclin-CDK gesteuerten Expression von Genen des Phosphatstoffwechsels und der Histon Demethylierung spielt (Morrison et al., 2007, Verbsky and Majerus, 2005, Lee et al., 2008, Lee et al., 2007). Auch kommt pyrophosphorylierten Inositolphosphaten eine Bedeutung bei der posttranslationalen Modifikation von Proteinen zu (Manning et al., 2002a, Manning et al., 2002b). Diese erfolgt einerseits durch Proteinkinasen, aber auch durch enzymunabhängigen Phosphattransfer eines Phosphats auf präphosphorylierte Proteine. Dieser Vorgang konnte experimentell für 5PP-InsP₅, 1PP-InsP₅ und 1,5PP₂-InsP₄ belegt, wobei der Transfer einer β-Phosphatgruppe auf präphosphorylierte Serine erfolgte (Bhandari et al., 2007, Saiardi et al., 2004). Zudem soll dieses Serinpyrophosphat gegenüber Phosphatasen stabiler sein.

4.10 Ausblick

4.10.1 Phylogenie der Inositolphosphatkinasen mit Entwicklung eines InsP_6 Syntheseweges und Unmöglichkeit einer Spezifitätsvorhersage aus der Aminosäuresequenz

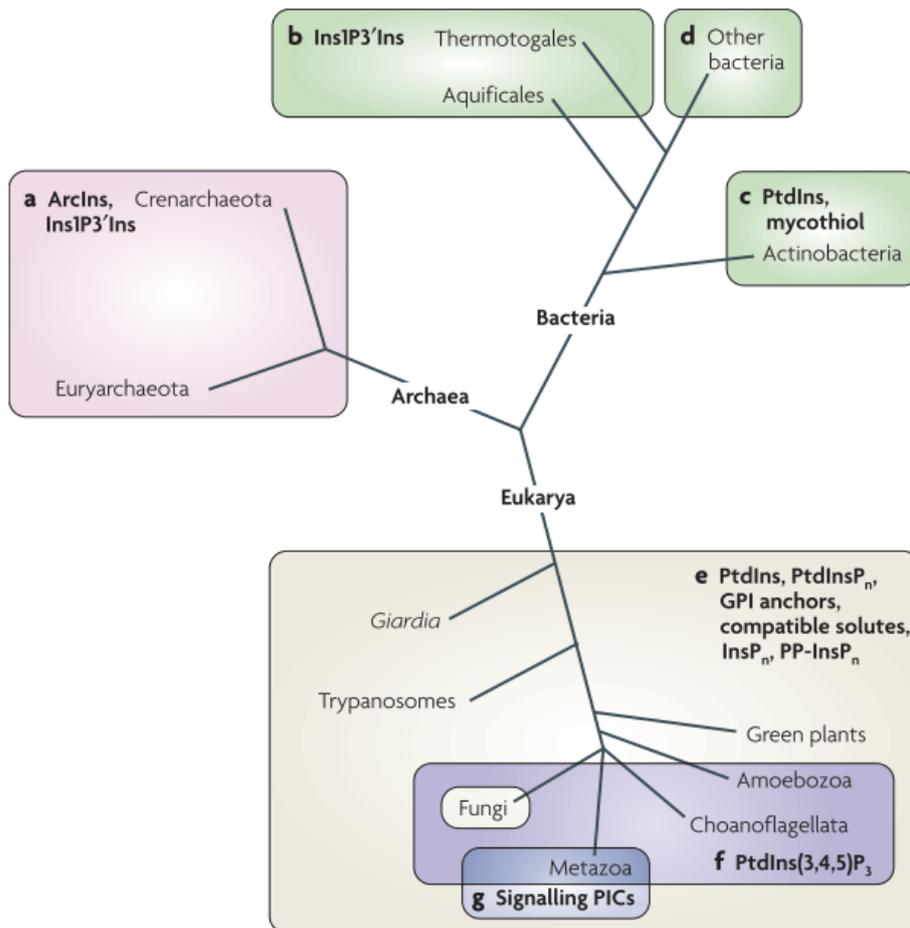


Abbildung 71: Die Phylogenie der Eukaryoten unter Berücksichtigung der Nutzung der Inositolphosphate

Modifiziert nach Michell RH (2008) Inositol derivatives: evolution and functions. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 9, 156: Figure 4: Development of the diverse usage of ins derivatives through evolution

Farbcodierung:

- pink: Stoffwechsel der Archaeen
- grün: Stoffwechsel der Bakterien
- beige: Stoffwechsel der Eukaryoten
- blau: Stoffwechsel der Metazoen

Abkürzung: GPI: Glycophosphoinositid

Der phylogenetische Baum zeigt die Entwicklung der verschiedenen Organismen und Beachtung ihrer evolutionären Beziehung zueinander auf. Den Buchstaben a-g ist dabei jeweils der zentrale Aspekt der Nutzung der Inositol durch die jeweiligen Organismus zugeordnet. Im nachfolgenden Abschnitt wird die Nutzung der Inositolphosphate im Kontext der Evolution und insbesondere bezüglich der Nutzung durch *Trichomonas vaginalis* beleuchtet.

Bezüglich der Evolution von Pflanzen, Archaeen und Eukaryoten gibt es zwei Theorien:

Zu einem, dass Archaeen und Bakterien gleichzeitig aus einem gemeinsamen Vorfahren entstanden sind und Eukaryoten im Verlauf aus einer symbiotischen Beziehung zwischen Archaeen und Bakterien entstanden sind; zum Anderen, dass Archaeen und Eukaryoten Schwestertaxen sind, die aus einem gemeinsamen Vorfahren entstanden sind (Poole and Penny, 2007, Gribaldo and Brochier-Armanet, 2006).

Bei Eukaryoten (s. Abschnitt 1.4.1), Archaeen und Metazoen sind verschiedene Stoffwechselwege für die Synthese von Inositol- und Inositolphosphatderivaten bekannt (siehe auch. Abbildung 4) (Laha et al., 2021).

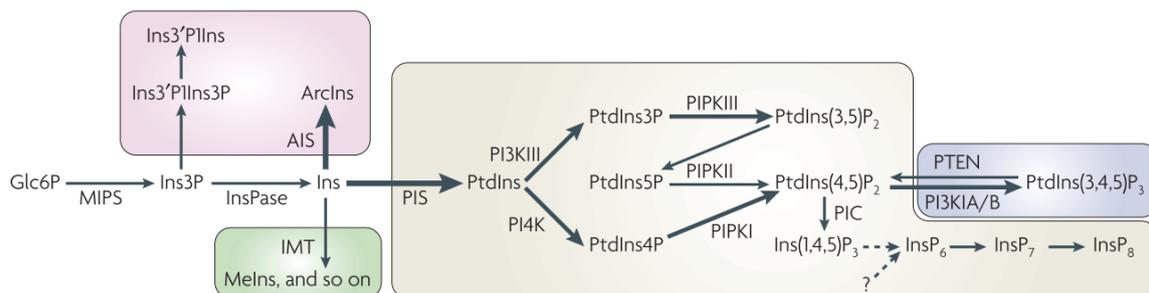


Abbildung 72: Stoffwechselwege für die Synthese von Inositolderivaten

Farbcodierung:

- pink: Stoffwechsel der Archaeen
- grün: Stoffwechsel der Pflanzen
- beige: Stoffwechsel der Eukaryoten
- blau: Stoffwechsel der Metazoen
- keine Farbe: Stoffwechsel von Archaeen, Pflanzen, Eukaryoten und Metazoen

aus Michell RH (2008). Inositol derivatives: evolution and functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 9: 153 Fig. 2 Metabolic pathways for the synthesis of inositol derivatives.

Bakterien, Archaeen und Eukaryoten ist der erste Schritt der Inositolsynthese mit Zyklisierung von D-Glucose-6-Phosphat zu D-myo-Inositol-3-Phosphat durch die NAD⁺-abhängige Myo-Inositol-3-Phosphat-Synthase gemeinsam (Majumder et al., 2003, Stieglitz et al., 2005), ebenso wie die Dephosphorylierung des Inositol-3-Phosphats durch die Inositolmonophosphatase zu Inositol (Stieglitz et al., 2007). Daher ist davon auszugehen, dass die Enzyme MIPS und InsPase von dem gemeinsamen Vorfahren der Archaeen und Eukaryoten stammen bzw. von einem archaealen Vorfahren der Eukaryoten (Michell, 2008). Eine weitere Gemeinsamkeit zwischen Archaeen und Eukaryoten ist das Vorhandensein eines Membranlipides, welches ein Inositol-1-Phosphat enthält. Bei den Archaeen handelt es sich um das Membranlipid Glycerophospholipid, bei den Eukaryoten um das Membranlipid Phosphatidylinositol (Koga and Morii, 2007). Verglichen mit der recht eingeschränkten Nutzung der Inositole durch Archaeen und Bakterien, hat sich bei den Eukaryoten eine viel breitere und spezialisierte Nutzung entwickelt (Michell, 2008), welche mit einer zunehmenden Spezialisierung der Inositolphosphatkinasen einhergeht. Diese spiegelt die zunehmend differenzierte Nutzung der Inositolphosphate im Laufe der Evolution wider. Umfasst der Inositolstoffwechsel in Archaeen vor allem die Synthese von Di-Inositol-1,3-phosphat (Rodrigues et al., 2007) und Archaeatidylinositol, sowie Glycerophospholipid (Morii et al., 2009), so umfasst der Inositolstoffwechsel bei Eukaryoten die Phosphatidylinositolsynthese, diverse Synthesewege von höherphosphorylierten Inositolphosphaten (s. Abschnitt 1.4.1), inklusive pyrophosphorylierten Inositolphosphaten (s. Abschnitt 1.4.2) (Michell, 2008). In Metazoen ist der Stoffwechsel der Inositolphosphate mit dem der Phosphatidylinositole verknüpft und das Phosphatidylinositol PtdIns(4,5)P₂ nimmt dabei bei Eukaryoten weit über die Stellung eines Membranlipides hinaus eine zentrale Stellung im Inositolphosphatmetabolismus ein (Bilanges et al., 2019). So katalysiert Phospholipase C nach G-Protein gekoppelter Aktivierung die Hydrolyse von PtdIns(4,5)P₂ zu Diacylglycerol und 1,4,5 InsP₃, welches intrazellulär zur Calciumfreisetzung führt (Berridge, 2016). 1,4,5 InsP₃ wird in der Folge entweder durch die InsP₃-3-Kinase zu 1,3,4,5 InsP₄ phosphoryliert oder sequentiell durch Inositolphosphaten dephosphoryliert,

sodass Inositol entsteht, welches wieder in die Synthese von Phosphatidylinositol einfließen kann (Berridge, 2016).

Zusätzlich kann das Membranphospholipid PtdIns(4,5)P₂ durch Phosphatidylinositol 3-Kinasen der Klasse I zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat metabolisiert werden (Halstead et al., 2001).

Betrachtet man die Phylogenie der Protozoen, so repräsentiert das Enzym TvIPMK möglicherweise einen Archetyp der Inositolphosphatmultikinasen der Protozoen.

Passend dazu ist die Beobachtung, dass es zu einer zunehmenden Spezialisierung der Inositolphosphatkinasen im Lauf der Evolution kommt. So finden sich in Metazoen neben der IPMK weitere spezialisierte Inositolphosphatkinasen mit der 1,4,5 InsP₃-3-Kinase und der Inositolhexakisphosphatkinase (Schell, 2010, Shears and Wang, 2019).

Diese Beobachtungen untermauern die Hypothese, dass die TvIPMK mit ihrem breiten Substratspektrum ein Archetyp von Inositolphosphatmultikinasen in Protozoen darstellen kann, da es in dem Maße wie es zu einer differenzierten Nutzung der Inositolphosphate gekommen ist, auch zu einer zunehmenden „Spezialisierung“ der Inositolphosphatkinasen gekommen ist. Diesbezüglich sind weitere Forschungen notwendig.

Setzt man die Enzyme TvIPMK und TvIP6K4 in Bezug zu zueinander, so ist auffällig, dass die gemeinsame Endstrecke des Inositolphosphatmetabolismus der TvIPMK die Produkte 1,3,4,5,6 InsP₅ und InsP₆ sind. Beide Produkte können als Ausgangssubstrat für pyrophosphorylierte Produkte und damit für das Enzym TvIP6K4 und auch TvIP6K1 dienen und eine Schlüsselrolle im weiteren Inositolphosphatmetabolismus von *Trichomonas vaginalis* spielen.

Das Enzym TvIP6K4 phosphoryliert mehrere InsP₄-, InsP₅-Isomere, sowie InsP₆ und hat seine höchste spezifische Aktivität für 4/6PP-InsP₅. Die TvIP6K-1 hat ihre höchste spezifische Aktivität für den Umsatz von InsP₆ zu 6PP-InsP₅. Setzt man die Kinasen in Bezug auf ihre höchste spezifische Aktivität in Bezug zueinander, so erscheint es möglich, dass die TvIPMK, das am häufigsten in *Trichomonas vaginalis* vorkommenden Inositolphosphat InsP₆ mit hoher spezifischer Aktivität aus einer großen Bandbreite von Inositolphosphaten bildet, welches wiederum das wichtigste Ausgangssubstrat für die TvIP6K1 sein kann, welche wiederum das Hauptsubstrat für die TvIP6K4 bildet, sollte es sich bei dem identifizierten Hauptsubstrat 4/6PP-InsP₅ um 6PP-InsP₅ handeln.

Die durchgeführten in vivo Analysen von *Trichomonas vaginalis* im nicht stimulierten Zustand haben den Nachweis von großen Mengen an InsP₆ und PP-InsP₄ gezeigt. Dieses PP-InsP₄ kann auch aus InsP₅ durch die TvIP6K4 erzeugt werden. Möglicherweise wird es

aber auch durch noch andere noch nicht entdeckte Enzyme mit wesentlich größerer spezifischer Aktivität erzeugt. Hierbei erscheint es nicht unwahrscheinlich, dass es noch ein weiteres Enzym gibt, welches diese aus 1,3,4,5,6 InsP₅ generieren kann, da letzteres eines der Hauptprodukte der TvIPMK ist.

Die *in vivo* Analysen von *Trichomonas vaginalis* spiegeln eine Momentaufnahme im Lebenszyklus von *Trichomonas vaginalis* wider. Führt man sich vor Augen, dass für *Trypanosoma brucei* die Bedeutung des Inositolphosphatstoffwechsels für den Übergang der verschiedenen Stadien im Lebenszyklus gezeigt werden konnte, (Cestari and Stuart, 2020), so erscheint es wahrscheinlich, dass dieser in diesem Zusammenhang auch bei *Trichomonas vaginalis* eine Rolle spielt. Hinweisend hierfür ist, dass für die Enzyme TvIP6K4, TvIPK-2 und TvIPK-3 eine Genregulation gezeigt werden konnte. Hierbei wurde gezeigt, dass TvIP6K4 nach dreißigminütiger Exposition gegenüber oxidativem Stress herunter reguliert wurde. Hingegen wurden die Gene für TvIPK-2 und TvIP6K-3 herauf reguliert (Gould et al., 2013). Darüber hinaus ist bekannt, dass die stressadaptierte Form von *Trichomonas vaginalis* das Pseudocystenstadium ist (Afzan and Suresh, 2012). Somit mag das Herunterregulieren der Expression von TvIP6K4 für den Übergang in dieses Stadium möglicherweise bedeutsam sein. Betrachtet man die *in vivo* Analysen von *Trichomonas vaginalis*, so fällt das Vorliegen von InsP₆ und PP-InsP₄ bei gleichzeitiger Abwesenheit von 1,3,4,5,6 InsP₅ auf (Wundenberg et al., 2019). PP-InsP₄ ist im vorliegenden unstimuliertem Stadium wahrscheinlich durch die TvIP6K1 aus 1,3,4,5,6 InsP₅ generiert worden. Gleichzeitig liegen neben PP-InsP₄ nur wenige weitere pyrophosphorylierte Produkte vor. Bei gleichzeitig vorliegendem InsP₆ deutet dies daraufhin, dass hier eine Regulation der pyrophosphorylierenden Inositolphosphatkinasen vorliegt bzw. alternativ dass die Inositolphosphate soweit pyrophosphoryliert sind, dass sie nicht mehr per MDD-HPLC nachweisbar sind. Die Schnittstelle zwischen InsP₆ und seinen pyrophosphorylierten Produkten ist möglicherweise auch die Schnittstelle zu einem anderen Stadium im Lebenszyklus von *Trichomonas vaginalis*. Dies können jedoch nur abschließende Forschungen klären.

Betrachtet man zusätzlich die bislang charakterisierten Inositolphosphatkinasen in *Trichomonas vaginalis*, so fällt die Abwesenheit einer Inositolpentakisphosphate-2-Kinase auf.

Laha et al. haben in verschiedenen Eukaryoten, beispielsweise Apicomplexa, den Verlust von Inositolpentakisphosphate-2-Kinase gezeigt (Laha et al., 2021). Hierbei wurde eine Verbindung zwischen dem Verlust der Kinase und dem Übergang zur parasitischen

Lebensform aufgezeigt (Laha et al., 2021). Dies mag darauf hinweisen, dass diese parasitischen Organismen möglicherweise, Inositole des Wirtes aufnehmen können oder es einen alternativen Weg der InsP_6 Synthese gibt, ähnlich wie für die TvIPMK aus dem parasitischen Protozoon *Trichomonas vaginalis* aufgezeigt. Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass sich der Verlust der Inositolpentakisphosphate-2-Kinase auch in nicht parasitischen Organismen findet und das noch nicht alle Inositolphosphatkinasen in *Trichomonas vaginalis* charakterisiert sind (Laha et al., 2021).

4.10.2 TvIPMK und TvIP6K4 – Mögliche Targets für antimikrobielle Therapien?

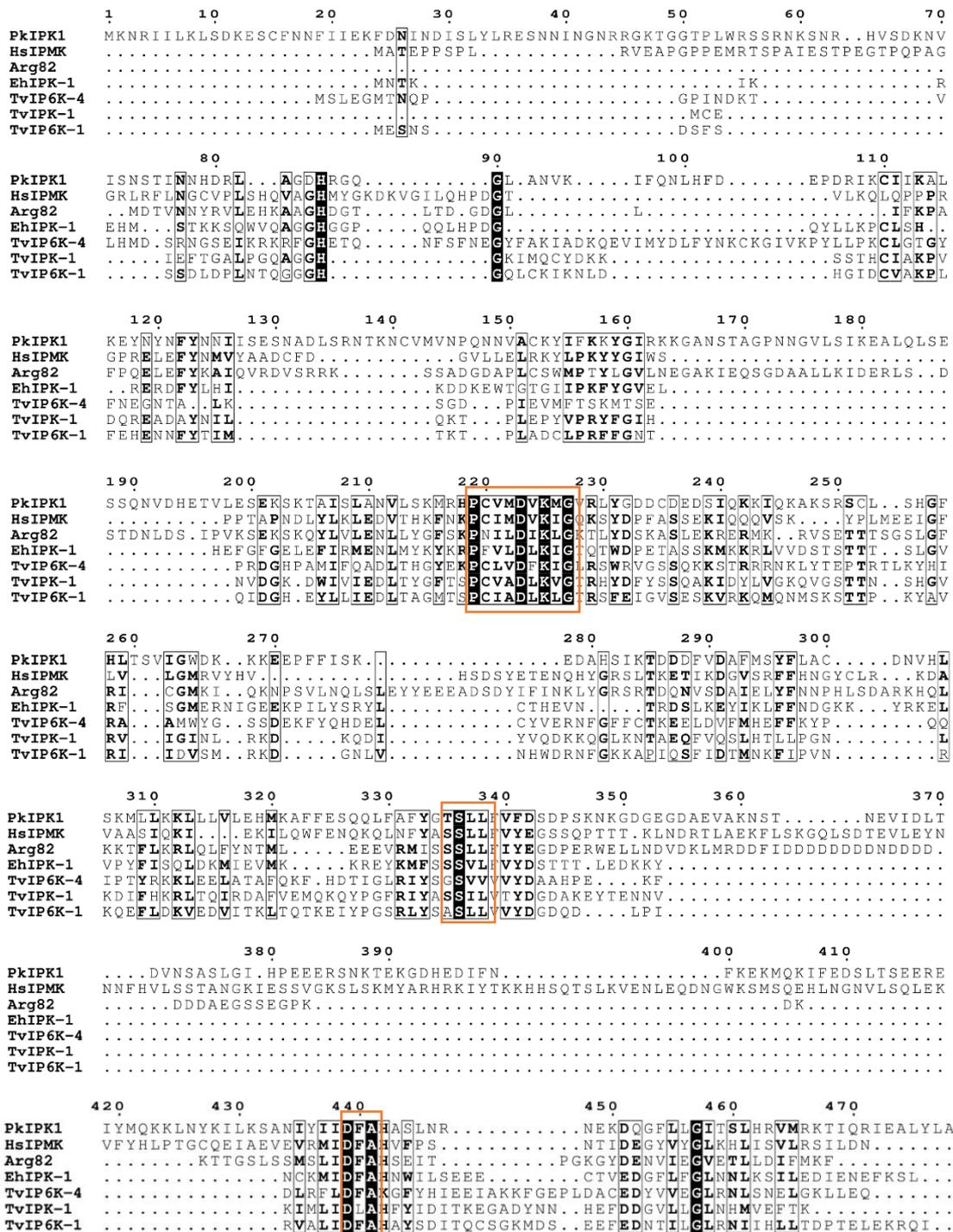


Abbildung 73: Vergleich der Aminosäuresequenzen mehrerer PDKG Kinasen

Die oben stehende Abbildung zeigt das Alignment der Aminosäuresequenzen verschiedener PDKG Kinasen aus *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica*, Hefen und dem Menschen, basierend auf dem Programm ENDscript (Robert and Gouet, 2014). Gleiche und ähnliche Sequenzen sind als weiße Buchstaben auf schwarzem Hintergrund dargestellt. PDKG, SSLL und DFG/A Motive sind eingerahmt.

Die Kinase EhIPK-1 aus *Entamoeba histolytica* pyrophosphoryliert InsP_6 an seiner 5-Position. Ebenso phosphoryliert sie multiple InsP_3 -, InsP_4 - und InsP_5 -Isomere. Die Kinase phosphoryliert $1,4,5 \text{ InsP}_3$ zu $1,4,5,6 \text{ InsP}_4$ und letzteres zu $1,3,4,5,6 \text{ InsP}_5$ (Löser et al., 2012). Weitere identifizierte Substrate umfassen $1,3,4,5,6 \text{ InsP}_5$, $1,2,3,5,6 \text{ InsP}_5$ und $1,2,4,5,6 \text{ InsP}_5$ (Löser et al., 2012). Eine weitere PDKG Kinase, PkIPK1, welche den Inositolphosphatmultikinasen der Vertebraten ähnelt, wurde in *Plasmodium knowlesii* gefunden. Sie phosphoryliert Hydroxylgruppen von InsP_3 -, InsP_4 - and InsP_5 -Isomeren (Stritzke et al., 2012). Die TvIP6K1 *Trichomonas vaginalis* ist eine $\text{InsP}_5/\text{InsP}_6$ Phospho-6-kinase, welche InsP_6 zu 6PP-InsP_5 pyrophosphoryliert und außerdem zwei InsP_5 -Isomere pyrophosphoryliert; namentlich $1,2,3,5,6\text{InsP}_5$ zu 6PP-InsP_4 und $1,3,4,5,6 \text{ InsP}_5$ zu $4/6\text{PP-InsP}_4$, welches dann weiter zu $4,6\text{PP}_2\text{-InsP}_3$ bis-pyrophosphoryliert wird (Wundenberg et al., 2019).

Die humane IPMK agiert mit hoher spezifischen Aktivität als $1,4,5 \text{ InsP}_3$ -3-Kinase (Nalaskowski et al., 2002). Außerdem agiert sie als $1,4,5,6 \text{ InsP}_4$ -3-Kinase, $1,4,5 \text{ InsP}_3$ -6-Kinase und als $1,3,4,5 \text{ InsP}_4$ -6-Kinase (Nalaskowski et al., 2002).

Die Inositolphosphatmultikinase aus Hefen Arg82, auch IPK2 verfügt über $1,4,5 \text{ InsP}_3$ -6-Kinase und $1,4,5,6 \text{ InsP}_4$ -3-Kinase Aktivität (Seeds et al., 2005).

Sowohl bei der TvIP6K4 als auch bei der TvIP6K1 handelt es sich um Inositolphosphatphosphokinasen mit unterschiedlichen Spezifitäten. Bei EhIPK-1, PkIPK1, Arg82, der humanen IPMK und der TvIPMK handelt es sich um Inositolphosphatmultikinasen, wobei die TvIPMK das breiteste Substratspektrum umfasst. Betrachtet man die Aminosäuresequenzen der genannten Enzyme vergleichend und versucht aufgrund ähnlicher Substratspezifitäten der Enzyme Rückschlüsse auf deren Funktion zu schließen, so ist dies nicht möglich. Wie für die TvIPMK gezeigt, „richtet“ das Enzym sein Substrat in einem dreidimensionalen Raum dynamisch zwischen der ATP Bindungsdomäne und der Inositolphosphatbindungsdomäne aus. Für eine sichere Spezifitätsvorhersage ist somit eine Prädiktion der 3D Struktur des Proteins in Lösung und nicht starr als Kristall notwendig.

Hochinteressant sind in diesem Zusammenhang aber die stark divergierenden Aminosäuresequenzen der TvIPMK und der humanen IPMK. Unter Betrachtung dieses Aspektes erscheint die TvIPMK als hochaktives, zentrales Enzym des Inositolphosphatmetabolismus, ein vielversprechendes Target für zukünftige Therapien und Hemmstofftests mit möglicherweise geringen Interaktionen im menschlichen

Stoffwechsel, bei zunehmender Resistenzentwicklung von *Trichomonas vaginalis* gegen herkömmliche Medikamente.

5 Zusammenfassung

Trichomonas vaginalis ist ein parasitisches Protozoon und der Erreger der Trichomoniasis, der zweithäufigsten Geschlechtskrankheit weltweit überhaupt. Inositolphosphate spielen eine bedeutende Rolle in der Pathogenese zahlreicher humanpathogener Protozoen. Sechs Gene für Inositolphosphatkinasen aus der Familie der PDKG Kinasen wurden in *Trichomonas vaginalis* identifiziert, namentlich TvIPK-1, TvIPK-2, TvIP6K1, TvIP6K2, TvIP6K3 und TvIP6K4.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die TvIPK-1 und die TvIP6K4 erfolgreich exprimiert, aufgereinigt und hinsichtlich ihrer Substratspezifität charakterisiert. Dabei wurde gezeigt, dass das Enzym TvIPK-1 eine hochaktive Inositolphosphatmultikinase ist, welche über eine duale Spezifität verfügt und sowohl als Hydroxykinase, als auch als Phosphokinase agiert. In ihrer Eigenschaft als Phosphokinase verfügt sie über eine vergleichsweise geringe spezifische Aktivität für ihre Substrate. Ihr Hauptsubstrat ist 1,3,4,6 InsP₄, welches sie mit einem V_{\max} von bis zu 59,29 U/mg an der 5-OH Position zu 1,3,4,5,6 InsP₅ phosphoryliert. Weitere Hauptsubstrate sind 1,2,4,5 InsP₄, 1,2,4,5,6 InsP₅, 1,4,5 InsP₃ und 1,2,3,4,6 InsP₅. Bezüglich der Stereochemie der Substratbindung wurde ausgehend vom Hauptsubstrat ein asymmetrischer Kern-Erkennungsbereich, welcher bei jedem Substrat vorhanden sein muss, identifiziert. Dabei handelt es sich um eine „half ring recognition“ mit einer 5'-OH Gruppe und zwei Phosphat-substituierten OH-Gruppen, welche sich entgegen des Uhrzeigersinns an der 1- bzw. 6-Position befinden. Da Trichomonaden phylogenetisch wahrscheinlich aus anaeroben Protozoen entstanden sind, repräsentiert die TvIPMK wahrscheinlich ein Archetyp der Inositolphosphatmultikinasen der Protozoen. Bei dem Enzym TvIP6K4 handelt es sich um eine multiple Inositolphosphatphosphokinase. Die Hauptaktivität zeigt das Enzym dabei als PP-InsP₅-Phosphokinase. Ihr identifizierte Hauptsubstrat ist 4/6 PP-InsP₅. Die einzigen untersuchten Substrate, welche sie nicht pyrophosphoryliert sind 1,4,5,6 InsP₄ und 2,4,5,6 InsP₄.

Setzt man die Ergebnisse dieser Doktorarbeit mit aktuellen Forschungsergebnissen in Verbindung, lässt sich die Hypothese etablieren, dass beide Hauptprodukte der TvIPMK InsP₆ und 1,3,4,5,6 InsP₅ die Schnittstelle zu Entstehung pyrophosphorylierter Inositolphosphate durch die TvIP6K4 und TvIP6K1 in *Trichomonas vaginalis* darstellen. Außerdem ist es wahrscheinlich, dass der Inositolphosphatmetabolismus eine bedeutende Rolle beim Lebenszyklus von *Trichomonas vaginalis* spielt. Die stark divergierenden Aminosäuresequenzen der TvIPMK und der humanen IPMK machen dieses Enzym zu einem vielversprechendem Target für zukünftige Therapien und Hemmstofftests.

5.1 Abstract

Trichomonas vaginalis is the parasitic protozoon causing Trichomoniasis, the second most common sexually transmitted sexual disease worldwide. Inositol phosphates play an important role in the pathogenic mechanisms of a number of human pathogenic protozoa. Six inositol phosphate kinase genes (TvIPK1-2, TvIP6K1-4) were identified in the *Trichomonas vaginalis* genome. All of them belong to the phylogenetic family of PDKG kinases.

In this doctoral thesis the enzymes TvIPK-1 and TvIP6K4 were successfully expressed, purified and their substrate specificity was characterized. TvIPK-1 is a highly active inositol phosphate multikinase which possesses a dual specificity and acts as hydroxykinase on one hand and as a phosphokinase on the other hand. The phosphokinase activity of the enzyme is low compared to the hydroxykinase activity of the enzyme. The main substrate of the TvIPK-1 is 1,3,4,6 InsP₄, which is phosphorylated at the 5-OH position with a V_{\max} of up to 59,29 U/mg. Further main substrates are 1,2,4,5 InsP₄, 1,2,4,5,6 InsP₅, 1,4,5 InsP₃ and 1,2,3,4,6 InsP₅. The substrate recognition mapping lead to the identification of an asymmetric stereoselective three point recognition motif. More precisely it is an „half ring recognition motif“ including the hydroxyl group at the 5-aequivalent position of the ring of underlying best substrate, and anticlockwise from it, in alternating equatorial trans orientation, two neighbouring phosphates.

Since trichomonads are likely to be phylogenetic descendants of early anaerobic protozoa TvIPMK may represent an archetype of inositol phosphate multikinase.

The enzyme TvIP6K4 is an inositol phosphate phosphokinase. The enzyme shows its main activity as a PP-InsP₅ phosphokinase. Its main substrate is 4/6 PP-InsP₅. All in all it pyrophosphorylates five different InsP₄-isomers, five different InsP₅-isomers, InsP₆ and two InsP₇-isomers. The only substrates which are not pyrophosphorylated are 1,4,5,6 InsP₄ and 2,4,5,6 InsP₄.

When putting the results of this doctoral thesis in perspective with recent research one can propose the hypothesis that the two main products of the TvIPMK InsP₆ and 1,3,4,5,6 InsP₅ form the interface to the formation of pyrophosphorylated inositol phosphates via TvIP6K4 and TvIP6K4 in *Trichomonas vaginalis*. It seems probable that the inositol phosphate metabolism in *Trichomonas vaginalis* has an important role in the life cycle of *Trichomonas vaginalis*. In this context the highly divergent aminoacid sequences of TvIPMK and the human IPMK are highly interesting. They show that this enzyme might be a promising target for inhibitor screening and new therapies in the future.

6 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	mikroliter
µM	mikromolar
AIS	Archaetidylinositol Synthase
APS	Ammoniumpersulfat
ArcIns	Archaetidylinositol
Asn	Asparagin
ATM	ataxia teleangiectasia mutated
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	ataxia teleangiectasia mutated-related
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw	beziehungsweise
CaCl ₂	Kalziumchlorid
C _{Substrat}	Substratkonzentration
CV	column volume
D	Durchlauf
DAG	Diacylglycerin
dax	axial nach unten gegenüber dem Inositolring konfiguriert
de	äquatorial nach unten gegenüber dem Inositolring konfiguriert
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DIPP	Diphosphoinositol-polyphosphat Phosphohydrolasen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	G Zahl
GEF	Guanin Exchange Factor
Glc6P	D-Glucose-6-Phosphat
Gln	Glutamin
Glu	Glutamin

GPI:	Glycophosphoinositid
HABA	2-(4'-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure
HCl	Salzsäure, Salzsäure
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HPLC	high performance liquid chromatography
HSV	Herpes simplex Virus
IMT	Inositolmethyltransferase
Ins3'P1Ins:	Di-Inositol-1,3-phosphate
Ins3'P1Ins3P	Di-Inositol-1,3-phosphate-1-phosphate
Ins3P	D-myo-Inositol-3-Phosphat
InsP	Inositolphosphat
InsP ₂	Inositolbisphosphat
InsP ₃	Inositoltrisphosphat
InsP ₄	Inositoltetrakisphosphat
InsP ₅	Inositolpentakisphosphat
InsP ₆	Inositolhexakisphosphat
InsP ₇	Inositolheptakisphosphat
InsPase	Inositolmonophosphatase
IP	Inositolphosphat
IP6K	Inositolhexakisphosphatkinase
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kDa	kilodalton
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LMW	Low Molecular Weight marker
Lys	Lysin
M	molar
MDD	Metal-Dye Detection
MeIns	Methylinositol
mg	milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid

min		Minuten
MIPS	Inositol3Phosphat Synthase, Myo-Inositol-3-Phosphat-Synthase	
ml		mililiter
mM		milimolar
MnCl ₂		Manganchlorid
MOPS		3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MTOC		Mikrotubuli-organisierende Zentrum
mTor		mammalian target of rapamycin
n		Anzahl
NaCl		Natriumchlorid
NADH		Nicotinamidadenindinukleotid
NaF		Natriumfluorid
NaOH		Natriumhydroxid
ng		nanogramm
nm		nanometer
nmol		nanomol
OD		optische Dichte
OH		Hydroxylgruppe
P		Pellet
PAR		4-(2-Pyridylazo)resorcinol
PCR		Polymerase-Kettenreaktion
PEP		Phosphoenolpyruvat
pH		potentia Hydrogenii
Phe		Phenylalanin
PI3KIA/B		PtdIns(4,5)P ₂ 3-Kinase Typ A und B
PI3KIII		PtdIns3Kinase
PI4K		Phosphatidylinositol 4-Kinase
PIC		Phosphoinositidase C
PIKK		phosphoinositide-3-kinase-related protein kinase
PIPKI		PtdIns4P5-Kinase
PIPKII		PtdIns5P4-Kinase
PIPKIII		PtdIns3P-5-Kinase
PIS		PtdIns Synthase
PK		Pyruvatkinase

PLC β	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PIP5K	Pyrophosphoinositolpentakisphosphat Phosphodhydrolasen
Pro	Prolin
PtdIns	Phosphatidylinositol
PtdIns(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol 4,5, biphosphat
PtdIns4-Kinase	Phosphatidylinositol 4-Kinase
PtdIns4P5-Kinase	Phosphatidylinositol4phosphat 5-Kinase
PTEN	PtdIns (3,4,5)P ₃ -3-Phosphatase
RbCl	Rubidiumchlorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunden
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE Gel	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Ser	Serin
t	Zeit
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Siehe N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	Tryptophan
Ü	Überstand
uax	axial nach oben gegenüber dem Inositolring konfiguriert
ue	äquatorial nach oben gegenüber dem Inositolring konfiguriert
UV	ultraviolett
v	Geschwindigkeit
V _{ges}	Gesamtvolumen
V _{max}	maximale Geschwindigkeit
YCl ₃	Yttrium(III)-chlorid
yIP6K	Inostiolhexakisphosphatkinase in Hefen

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Substratanalyse der TvIP6K1	17
Tabelle 2: Ansätze für den präparativen Restriktionsverdau.....	30
Tabelle 3: Ansätze zur Ligation der DNA Fragmente.....	32
Tabelle 4: Ansatz für den analytischen Restriktionsverdau	33
Tabelle 5: Schema zur Herstellung des SDS-Polyacrylamid-Gels.....	41
Tabelle 6: Screeningansatz für die TvIPK-1 und die TvIP6K4.....	42
Tabelle 7: Standardansatz für die TvIPK-1	43
Tabelle 8: Standardansatz für die TvIP6K4	43
Tabelle 9: Standardansatz für die TvIPK-1	47
Tabelle 10: Standardansatz für die TvIP6K4	47
Tabelle 11: Verdünnungsmix für die TvIPK-1.....	48
Tabelle 12: Substratanalyse der TvIPK-1.....	89
Tabelle 13: Substratanalyse der TvIPK-1 – Enzymkinetik	90
Tabelle 14: Substratanalyse der TvIPK-1 – Katalytische Effizienz	90
Tabelle 15: Substratanalyse der TvIP6K4	121
Tabelle 16: Substratanalyse der TvIP6K4 – Enzymkinetik	122
Tabelle 17: Überblick über die Substratselektivität der TvIPK-1	124
Tabelle 18: Active site mapping der TvIPMK	126
Tabelle 19: Überblick über die Substratselektivität der TvIP6K4	137
Tabelle 20: Prädiktion der Struktur der pyrophosphorylierten Inositol-4-Phosphate	139
Tabelle 21: Prädiktion der Struktur der pyrophosphorylierten Inositol-5-Phosphate	141
Tabelle 22: Prädiktion der Struktur der PP ₂ -InsP ₃ -Isomere	141

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung von <i>Trichomonas vaginalis</i>	2
Abbildung 2: Der Lebenszyklus von <i>Trichomonas vaginalis</i>	5
Abbildung 3: Strukturformel von D-myo-Inositol (a) in Harworth Projektion (b) in Sesselkonformation und (c) in Form der „Agranoff-Schildkröte“	8
Abbildung 4: Stoffwechselwege für die Synthese von Inositolderivaten	9
Abbildung 5: Inositolphosphatmetabolismus bis InsP_6	12
Abbildung 6: Inositolphosphatmetabolismus pyrophosphorylierter Inositolphosphate in Mammalia und Hefen	15
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz einer PDKG-Kinase	16
Abbildung 8: Sequenzalignment der hsIP6K2 mit 6 prädizierten IPKs aus <i>Trichomonas vaginalis</i>	19
Abbildung 9: 1,2%iges präparatives Agarosegel vor Extraktion der DNA Banden für die Ligation der DNA in den psk-Vektor	49
Abbildung 10: 1,2%iges präparatives Agarosegel nach Extraktion der DNA Banden für die Ligation der DNA in den Zielvektor	50
Abbildung 11: psk-TvIPK-1 und psk-TvIP6K4 nach analytischem Restriktionsverdau, 1,6%iges analytisches Agarosegel.....	50
Abbildung 12: Expressionskontrollen der Proteinexpression der TvIPK-1 bei 37°C, Coomassie gefärbtes 10%iges SDS-PAGE Gel	51
Abbildung 13: Elutionsfraktionen der TvIPK-1 nach Aufreinigung mittels P11-Phosphocellulosechromatographie, Coomassie gefärbtes 10%iges SDS-PAGE Gel	52
Abbildung 14: Chromatogramm - Umsatz von Phytinsäurehydrolysat durch die TvIPK-1 in 1:3 Verdünnung	53
Abbildung 15: Differenzchromatogramm - Umsatz von Phytinsäurehydrolysat durch die TvIPK-1 in 1:3 Verdünnung.....	55
Abbildung 16: Quantitative Analyse des Umsatzes von Phytinsäurehydrolysat durch die TvIPK-1 in 1:10 Verdünnung – Gesamtüberblick	56

Abbildung 17: Quantitative Analyse des Umsatzes von Phytinsäurehydrolysat durch die TvIPK-1 in 1:10 Verdünnung – schnelle initiale Reaktionen im Detail	57
Abbildung 18: Quantitative Analyse des Umsatzes von Phytinsäurehydrolysat durch die TvIPK-1 in 1:10 Verdünnung – Minute 0 bis 120	57
Abbildung 19: Chromatogramm – Umsatz von 1,4 InsP ₂ durch die TvIPK-1	59
Abbildung 20: Chromatogramm – Umsatz von 4,5 InsP ₂ durch die TvIPK-1	60
Abbildung 21: Chromatogramm – Umsatz von 1,2,5 InsP ₃ durch die TvIPK-1	61
Abbildung 22: Chromatogramm – Umsatz von 1,2,6 InsP ₃ durch die TvIPK-1	62
Abbildung 23: Chromatogramm – Umsatz von 1,3,4 InsP ₃ durch die TvIPK-1	63
Abbildung 24: Chromatogramm – Umsatz von 1,4,5 InsP ₃ durch die TvIPK-1	64
Abbildung 25: Chromatogramm – Umsatz von 1,4,6 InsP ₃ durch die TvIPK-1	65
Abbildung 26: Chromatogramm – Umsatz von D-2,4,5 InsP ₃ durch die TvIPK-1	66
Abbildung 27: Chromatogramm – Umsatz von D-3,4,6 InsP ₃ durch die TvIPK-1	68
Abbildung 28: Chromatogramm – Umsatz von 1,2,3,4 InsP ₄ durch die TvIPK-1	70
Abbildung 29: Chromatogramm – Umsatz von 1,2,3,5 InsP ₄ durch die TvIPK-1	71
Abbildung 30: Chromatogramm – Umsatz von D-1,2,3,6 InsP ₄ durch die TvIPK-1	72
Abbildung 31: Chromatogramm – Umsatz von 1,2,4,5 InsP ₄ durch die TvIPK-1	73
Abbildung 32: Chromatogramm – Umsatz von D-1,3,4,5 InsP ₄ durch die TvIPK-1	75
Abbildung 33: Chromatogramm – Umsatz von 1,3,4,6 InsP ₄ durch die TvIPK-1	77
Abbildung 34: Chromatogramm – Umsatz von 1,3,5,6 InsP ₄ durch die TvIPK-1	78
Abbildung 35: Chromatogramm – Umsatz von D-1,4,5,6 InsP ₄ durch die TvIPK-1	79
Abbildung 36: Chromatogramm – Umsatz von m-2,4,5,6 InsP ₄ durch die TvIPK-1	80
Abbildung 37: Chromatogramm – Umsatz von D-3,4,5,6 InsP ₄ durch die TvIPK-1	81
Abbildung 38: Chromatogramm – Umsatz von 1,2,3,4,5 InsP ₅ durch die TvIPK-1	82
Abbildung 39: Chromatogramm – Umsatz von 1,2,3,4,6 InsP ₅ durch die TvIPK-1	83
Abbildung 40: Chromatogramm – Umsatz von 1,2,4,5,6 InsP ₅ durch die TvIPK-1	84
Abbildung 41: Chromatogramm – Umsatz von 1,3,4,5,6 InsP ₅ durch die TvIPK-1	86

Abbildung 42: Chromatogramm – Umsatz von InsP_6 durch die TvIPK-1	87
Abbildung 43: Michaelis Menten Kinetik - Umsatz von 1,3,4,6 InsP_4 durch die TvIPK-1 (n=3)	91
Abbildung 44: Michaelis Menten Kinetik – Km Wert von ATP (n=3)	92
Abbildung 45: Expressionskontrollen der Proteinexpression der TvIP6K4 bei 37°C, Coomassie gefärbtes 10%iges SDS-PAGE Gel	93
Abbildung 46: Elutionsfraktionen der TvIP6K4 nach Aufreinigung mittels P11-Phosphocellulosechromatographiem, Coomassie gefärbtes 10%iges SDS-PAGE Gel	94
Abbildung 47: Proteinexpression der TvIP6K4 bei 37°C und unterschiedlichen IPTG Konzentrationen, Coomassie gefärbtes 10%iges SDS-PAGE Gel.....	95
Abbildung 48: Proteinexpression der TvIP6K4 bei 10°C und unterschiedlichen IPTG Konzentrationen, Coomassie gefärbtes 10%iges SDS-PAGE Gel.....	95
Abbildung 49: Optimierte Proteinexpression der TvIP6K4() Coomassie gefärbtes, 10%iges SDS-PAGE Gel	96
Abbildung 50: Aufreinigung der TvIP6K4 mittels P11 Phosphocellulosesäulen-chromatographie unter optimiertem Protokoll, Coomassie gefärbtes 10%iges SDS-PAGE Gel	96
Abbildung 51: Aufreinigung der TvIP6K4 () mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie, Coomassie gefärbtes 10%iges SDS-PAGE Gel.....	97
Abbildung 52: Chromatogramm – Umsatz von InsP_x Standard durch die TvIP6K4.....	99
Abbildung 53: Chromatogramm – Umsatz von InsP_7 Standard durch die TvIP6K4.....	101
Abbildung 54: Chromatogramm – Umsatz von 1,2,4,5 InsP_4 durch die TvIP6K4.....	103
Abbildung 55: Chromatogramm – Umsatz von 1,2,4,6 InsP_4 durch die TvIP6K4.....	105
Abbildung 56: Chromatogramm – Umsatz von 2,4,5,6 InsP_4 durch die TvIP6K4.....	106
Abbildung 57: Chromatogramm – Umsatz von 2,3,4,5,6 InsP_5 durch die TvIP6K4	107
Abbildung 58: Chromatogramm – Umsatz von 1,2,3,4,5 InsP_5 durch die TvIP6K4	109
Abbildung 59: Chromatogramm – Umsatz von 1,2,3,4,6 InsP_5 durch die TvIP6K4	110
Abbildung 60: Chromatogramm – Umsatz von 1,2,4,5,6 InsP_5 durch die TvIP6K4	112
Abbildung 61: Chromatogramm – Umsatz von 1,3,4,5,6 InsP_5 durch die TvIP6K4	114

Abbildung 62: Chromatogramm – Umsatz von InsP_6 durch die TvIP6K4	116
Abbildung 63: Chromatogramm – Umsatz von 4/6PP- InsP_5 durch die TvIP6K4	118
Abbildung 64: Chromatogramm – Umsatz von 5PP- InsP_5 durch die TvIP6K4	119
Abbildung 65: Überlagerung der besten Substrate der TvIPMK wie in Tabelle 17 beschrieben	127
Abbildung 66: Enantiomerelektivität der TvIPMK	129
Abbildung 67: Inositolphosphatmetabolismus der TvIPMK.....	130
Abbildung 68: Inositolphosphatzusammensetzung in lebenden <i>Trichomonas vaginalis</i> ..	131
Abbildung 69: Inositolphosphatmetabolismus der TvIP6K4	138
Abbildung 70: Inositolphosphatmetabolismus der TvIP6K4 unter Berücksichtigung der prädizierten Strukturen	142
Abbildung 71: Die Phylogenie der Eukaryoten unter Berücksichtigung der Nutzung der Inositolphosphate.....	145
Abbildung 72: Stoffwechselwege für die Synthese von Inositolderivaten	146
Abbildung 73: Vergleich der Aminosäuresequenzen mehrerer PDKG Kinasen	151
Abbildung 74: Sequenzalignment der hsIP6K2 mit 6 prädizierten IPKs aus <i>Trichomonas vaginalis</i>	192
Abbildung 75: Substratumsetzung der TvIPMK – Spezifische Aktivität und katalytische Effizienz.....	194

9 Literaturverzeichnis

1989a. Numbering of atoms in myo-inositol. *European Journal of Biochemistry*, 180, 485-486.

1989b. Numbering of atoms in myo-inositol. Recommendations 1988. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry. *The Biochemical journal*, 258, 1-2.

ABEL, K., ANDERSON, R. A. & SHEARS, S. B. 2001. Phosphatidylinositol and inositol phosphate metabolism. *Journal of Cell Science*, 114, 2207-2208.

ADEGBAJU, A. & MORENIKEJI, O. A. 2008. Cytoadherence and pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. *Scientific Research and Essays*, 3, 132-138.

ADU-SARKODIE, Y. 1995. *Trichomonas vaginalis* transmission in a family. *Genitourinary medicine*, 71, 199-200.

AFZAN, M. Y. & SURESH, K. 2012. Pseudocyst forms of *Trichomonas vaginalis* from cervical neoplasia. *Parasitology Research*, 111, 371-381.

AGRANOFF, B. W. 1983. II. Biochemical mechanisms in the phosphatidylinositol effect. *Life Sciences*, 32, 2047-2054.

AL-SALIHI, F. L., CURRAN, J. P. & WANG, J.-S. 1974. Neonatal *Trichomonas Vaginalis*. *Report of Three Cases and Review of the Literature*, 53, 196-200.

ALCÁZAR-ROMÁN, A. R. & WENTE, S. R. 2008. Inositol polyphosphates: a new frontier for regulating gene expression. *Chromosoma*, 117, 1-13.

ALESSIO, C. & NYIRJESY, P. 2019. Management of Resistant Trichomoniasis. *Current Infectious Disease Reports*, 21, 31.

ALI, N., CRAXTON, A. & SHEARS, S. B. 1993. Hepatic Ins(1,3,4,5)P₄ 3-phosphatase is compartmentalized inside endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 6161-6167.

ALLSWORTH, J. E., RATNER, J. A. & PEIPERT, J. F. 2009. Trichomoniasis and other sexually transmitted infections: results from the 2001-2004 National Health and Nutrition Examination Surveys. *Sexually transmitted diseases*, 36, 738-744.

AZEVEDO, C. & SAIARDI, A. 2017. Eukaryotic Phosphate Homeostasis: The Inositol Pyrophosphate Perspective. *Trends in Biochemical Sciences*, 42, 219-231.

BAILEY, S. M., CORNFORTH, M. N., KURIMASA, A., CHEN, D. J. & GOODWIN, E. H. 2001. Strand-Specific Postreplicative Processing of Mammalian Telomeres. *Science*, 293, 2462-2465.

BALLEREAU, S., GUÉDAT, P., POIRIER, S. N., GUILLEMETTE, G., SPIESS, B. & SCHLEWER, G. 1999. Synthesis, Acid-Base Behavior, and Binding Properties of 6-Modified myo-Inositol 1,4,5-Tris(phosphate)s. *Journal of Medicinal Chemistry*, 42, 4824-4835.

BECK, K. A. & KEEN, J. H. 1991. Self-association of the plasma membrane-associated clathrin assembly protein AP-2. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 4437-41.

BENCHIMOL, M. 2004. Trichomonads under Microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, 10, 528-550.

BENNETT, T. P. 1967. Membrane Filtration for determining Protein in the Presence of Interfering Substances. *Nature*, 213, 1131-1132.

BERRIDGE, M. 2016. The Inositol Trisphosphate/Calcium Signaling Pathway in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 96, 1261-1296.

BERRIDGE, M. J. & IRVINE, R. F. 1989. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*, 341, 197-205.

BERTSCH, U., DESCHERMEIER, C., FANICK, W., GIRKONTAITE, I., HILLEMEIER, K., JOHNEN, H., WEGLÖHNER, W., EMMRICH, F. & 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. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 1557-1564.

BHANDARI, R., SAIARDI, A., AHMADIBENI, Y., SNOWMAN, A. M., RESNICK, A. C., KRISTIANSEN, T. Z., MOLINA, H., PANDEY, A., WERNER, J. K., JULURI, K. R., XU, Y., PRESTWICH, G. D., PARANG, K. & SNYDER, S. H. 2007. Protein pyrophosphorylation by inositol pyrophosphates is a posttranslational event. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 15305-15310.

BIANCHI, A. & SHORE, D. 2007. Increased association of telomerase with short telomeres in yeast. *Genes & Development*, 21, 1726-1730.

BILANGES, B., POSOR, Y. & VANHAESEBROECK, B. 2019. PI3K isoforms in cell signalling and vesicle trafficking. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20, 515-534.

BIMBOIM, H. C. & DOLY, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7, 1513-1523.

BOYER, J. L., GRABER, S. G., WALDO, G. L., HARDEN, T. K. & GARRISON, J. C. 1994. Selective activation of phospholipase C by recombinant G-protein alpha- and beta gamma-subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 2814-2819.

BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

BRUNELLE, J. L. & GREEN, R. 2014. Chapter Twelve - One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE). In: LORSCH, J. (ed.) *Methods in Enzymology*. Academic Press.

BUNNEY, T. D. & KATAN, M. 2006. Phospholipase C epsilon: linking second messengers and small GTPases. *Trends in Cell Biology*, 16, 640-648.

CAFFREY, J. J., SAFRANY, S. T., YANG, X. & SHEARS, S. B. 2000. Discovery of Molecular and Catalytic Diversity among Human Diphosphoinositol-Polyphosphate

Phosphohydrolases: AN EXPANDING NUDT FAMILY. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 12730-12736.

CARLTON, J. M., HIRT, R. P., SILVA, J. C., DELCHER, A. L., SCHATZ, M., ZHAO, Q., WORTMAN, J. R., BIDWELL, S. L., ALSMARK, U. C. M., BESTEIRO, S., SICHERITZ-PONTEN, T., NOEL, C. J., DACKS, J. B., FOSTER, P. G., SIMILLION, C., VAN DE PEER, Y., MIRANDA-SAAVEDRA, D., BARTON, G. J., WESTROP, G. D., MÜLLER, S., DESSI, D., FIORI, P. L., REN, Q., PAULSEN, I., ZHANG, H., BASTIDA-CORCUERA, F. D., SIMOES-BARBOSA, A., BROWN, M. T., HAYES, R. D., MUKHERJEE, M., OKUMURA, C. Y., SCHNEIDER, R., SMITH, A. J., VANACOVA, S., VILLALVAZO, M., HAAS, B. J., PERTEA, M., FELDBLYUM, T. V., UTTERBACK, T. R., SHU, C.-L., OSOEGAWA, K., DE JONG, P. J., HRDY, I., HORVATHOVA, L., ZUBACOVA, Z., DOLEZAL, P., MALIK, S.-B., LOGSDON, J. M., HENZE, K., GUPTA, A., WANG, C. C., DUNNE, R. L., UPCROFT, J. A., UPCROFT, P., WHITE, O., SALZBERG, S. L., TANG, P., CHIU, C.-H., LEE, Y.-S., EMBLEY, T. M., COOMBS, G. H., MOTTRAM, J. C., TACHEZY, J., FRASER-LIGGETT, C. M. & JOHNSON, P. J. 2007. Draft Genome Sequence of the Sexually Transmitted Pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science*, 315, 207-212.

CATTERALL, R. D. & NICOL, C. S. 1960. Is trichomonal infestation a venereal disease? *British medical journal*, 1, 1177-1179.

CESTARI, I., HAAS, P., MORETTI, NILMAR S., SCHENKMAN, S. & STUART, K. 2016. Chemogenetic Characterization of Inositol Phosphate Metabolic Pathway Reveals Druggable Enzymes for Targeting Kinetoplastid Parasites. *Cell Chemical Biology*, 23, 608-617.

CESTARI, I. & STUART, K. 2020. The phosphoinositide regulatory network in *Trypanosoma brucei*: Implications for cell-wide regulation in eukaryotes. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 14, e0008689.

CHOI, J. H., WILLIAMS, J., CHO, J., FALCK, J. R. & SHEARS, S. B. 2007. Purification, Sequencing, and Molecular Identification of a Mammalian PP-InsP5 Kinase That Is Activated When Cells Are Exposed to Hyperosmotic Stress. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 30763-30775.

CHOI, K., KIM, H., LEE, S., MOON, K., SIM, S., KIM, J., CHUNG, H. & RHEE, S. 1990. Molecular cloning and expression of a complementary DNA for inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase. *Science*, 248, 64-66.

CHOI, K., MOLLAPOUR, E. & SHEARS, S. B. 2005. Signal transduction during environmental stress: InsP8 operates within highly restricted contexts. *Cellular Signalling*, 17, 1533-1541.

COTCH, M. F., PASTOREK, J. G. I., NUGENT, R. P., HILLIER, S. L., GIBBS, R. S., MARTIN, D. H., ESCHENBACH, D. A., EDELMAN, R., CAREY, C. J., REGAN, J. A., KROHN, M. A., KLEBANOFF, M. A., RAO, V. A., RHOADS, G. G., INFECTIONS, T. V. & GROUP, P. S. 1997. *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. *Sexually Transmitted Diseases*, 24, 353-360.

CREBA, J. A., DOWNES, C. P., HAWKINS, P. T., BREWSTER, G., MICHELL, R. H. & KIRK, C. J. 1983. Rapid breakdown of phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in rat hepatocytes stimulated by vasopressin and other Ca²⁺-mobilizing hormones. *The Biochemical journal*, 212, 733-747.

CROWTHER, I. A. 1962. *Trichomonas vaginitis* in infancy *The Lancet*, 279, 1074.

CRUCITTI, T., JESPERS, V., MULENGA, C., KHONDOWE, S., VANDEPITTE, J. & BUVÉ, A. 2011. Non-sexual transmission of *Trichomonas vaginalis* in adolescent girls attending school in Ndola, Zambia. *PloS one*, 6, e16310-e16310.

D'ANGELO, G., POLISHCHUK, E., TULLIO, G. D., SANTORO, M., CAMPLI, A. D., GODI, A., WEST, G., BIELAWSKI, J., CHUANG, C.-C., VAN DER SPOEL, A. C., PLATT, F. M., HANNUN, Y. A., POLISHCHUK, R., MATTJUS, P. & DE MATTEIS, M. A. 2007. Glycosphingolipid synthesis requires FAPP2 transfer of glucosylceramide. *Nature*, 449, 62-67.

DIJKEN, P., HAAS, J., CRAXTON, A., ERNEUX, C., SHEARS, S. & VAN HAASTERT, P. 1996. A Novel, Phospholipase C-independent Pathway of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Formation in Dictyostelium and Rat Liver. *The Journal of biological chemistry*, 270, 29724-29731.

DRAŠKOVIČ, P., SAIARDI, A., BHANDARI, R., BURTON, A., ILC, G., KOVAČEVIČ, M., SNYDER, S. H. & PODOBNIK, M. 2008. Inositol Hexakisphosphate Kinase Products Contain Diphosphate and Triphosphate Groups. *Chemistry & Biology*, 15, 274-286.

DRMOTA, T. & KRÁL, J. 1997. Karyotype of *Trichomonas vaginalis*. *European Journal of Protistology*, 33, 131-135.

DUBENDORF, J. W. & STUDIER, F. W. 1991. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *Journal of Molecular Biology*, 219, 45-59.

DUONG-LY, K. C. & GABELLI, S. B. 2014. Chapter Eight - Using Ion Exchange Chromatography to Purify a Recombinantly Expressed Protein. In: LORSCH, J. (ed.) *Methods in Enzymology*. Academic Press.

DURONIO, V. 2008. The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *Biochemical Journal*, 415, 333-344.

EISENBERG, F. 1967. d-Myoinositol 1-Phosphate as Product of Cyclization of Glucose 6-Phosphate and Substrate for a Specific Phosphatase in Rat Testis. *Journal of Biological Chemistry*, 242, 1375-1382.

ELCHUK, S. & CASSIDY, R. M. 1979. Separation of the lanthanides on high-efficiency bonded phases and conventional ion-exchange resins. *Analytical Chemistry*, 51, 1434-1438.

ERNEUX, C., ROECKEL, N., TAKAZAWA, K., MAILLEUX, P., VASSART, G. & MATTEI, M. G. 1992. Localization of the genes for human inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase A (ITPKA) and B (ITPKB) to chromosome regions 15q14-q21 and 1q41-q43, respectively, by in Situ hybridization. *Genomics*, 14, 546-547.

ESPEJEL, S., FRANCO, S., SGURA, A., GAE, D., BAILEY, S. M., TACCIOLI, G. E. & BLASCO, M. A. 2002. Functional interaction between DNA-PKcs and telomerase in telomere length maintenance. *The EMBO Journal*, 21, 6275-6287.

- EXTON, J. H. 1996. Regulation of Phosphoinositide Phospholipases by Hormones, Neurotransmitters, and Other Agonists Linked to G Proteins. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 36, 481-509.
- FODE, M., FUSCO, F., LIPSHULTZ, L. & WEIDNER, W. 2016. Sexually Transmitted Disease and Male Infertility: A Systematic Review. *European Urology Focus*, 2, 383-393.
- FRIDY, P. C., OTTO, J. C., DOLLINS, D. E. & YORK, J. D. 2007. Cloning and Characterization of Two Human VIP1-like Inositol Hexakisphosphate and Diphosphoinositol Pentakisphosphate Kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 30754-30762.
- FROGER, A. & HALL, J. E. 2007. Transformation of plasmid DNA into E. coli using the heat shock method. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 253-253.
- FROST, J. K. 1962. Trichomonas vaginalis and cervical epithelial changes *Annals of the New York Academy of Sciences*, 97, 792-799.
- GAIDAROV, I., CHEN, Q., FALCK, J. R., REDDY, K. K. & KEEN, J. H. 1996. A Functional Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate/Phosphoinositide Binding Domain in the Clathrin Adaptor AP-2 α Subunit. IMPLICATIONS FOR THE ENDOCYTIC PATHWAY. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 20922-20929.
- 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. *The EMBO Journal*, 18, 871-881.
- GARDOCKI, M. E., JANI, N. & LOPES, J. M. 2005. Phosphatidylinositol biosynthesis: Biochemistry and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1735, 89-100.
- GIORDANO, T. J., DEUSCHLE, U., BUJARD, H. & MCALLISTER, W. T. 1989. Regulation of coliphage T3 and T7 RNA polymerases by the lac represser-operator system. *Gene*, 84, 209-219.

- GLENNON, M. C. & SHEARS, S. B. 1993. Turnover of inositol pentakisphosphates, inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol polyphosphates in primary cultured hepatocytes. *The Biochemical journal*, 293 (Pt 2), 583-590.
- GOPAL, G. J. & KUMAR, A. 2013. Strategies for the Production of Recombinant Protein in Escherichia coli. *The Protein Journal*, 32, 419-425.
- GOULD, S. B., WOEHLER, C., KUSDIAN, G., LANDAN, G., TACHEZY, J., ZIMORSKI, V. & MARTIN, W. F. 2013. Deep sequencing of *Trichomonas vaginalis* during the early infection of vaginal epithelial cells and amoeboid transition. *International Journal for Parasitology*, 43, 707-719.
- GRAM, I. T., MACALUSO, M., CHURCHILL, J. & STALSBERG, H. 1992. *Trichomonas vaginalis* (TV) and human papillomavirus (HPV) infection and the incidence of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) grade III. *Cancer Causes & Control*, 3, 231-236.
- GREEN, R. & ROGERS, E. J. 2013. Transformation of chemically competent *E. coli*. *Methods in enzymology*, 529, 329-336.
- GREGORY, T. R. 2001. Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cellsize, and the C-value enigma. *Biological Reviews*, 76, 65-101.
- GRIBALDO, S. & BROCHIER-ARMANET, C. 2006. The origin and evolution of Archaea: a state of the art. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 361, 1007-22.
- GUMBO, F. Z., DURI, K., KANDAWASVIKA, G. Q., KUREWA, N. E., MAPINGURE, M. P., MUNJOMA, M. W., RUSAKANIKO, S., CHIRENJE, M. Z. & STRAY-PEDERSEN, B. 2010. Risk factors of HIV vertical transmission in a cohort of women under a PMTCT program at three peri-urban clinics in a resource-poor setting. *Journal of Perinatology*, 30, 717-723.
- HALSTEAD, J. R., ROEFS, M., ELLSON, C. D., D'ANDREA, S., CHEN, C. S., D'SANTOS, C. S. & DIVECHA, N. 2001. A novel pathway of cellular phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate synthesis is regulated by oxidative stress. *Current Biology*, 11, 386-395.

HANAHAH, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166, 557-580.

HANAKAHI, L. 2011. Effect of the Inositol Polyphosphate InsP₆ on DNA-PK-Dependent Phosphorylation. *Molecular Cancer Research*, 9, 1366-1376.

HANAKAHI, L. A., BARTLET-JONES, M., CHAPPELL, C., PAPPIN, D. & WEST, S. C. 2000. Binding of Inositol Phosphate to DNA-PK and Stimulation of Double-Strand Break Repair. *Cell*, 102, 721-729.

HAO, W., TAN, Z., PRASAD, K., REDDY, K. K., CHEN, J., PRESTWICH, G. D., FALCK, J. R., SHEARS, S. B. & LAFER, E. M. 1997. Regulation of AP-3 Function by Inositides: IDENTIFICATION OF PHOSPHATIDYLINOSITOL 3,4,5-TRISPHOSPHATE AS A POTENT LIGAND. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 6393-6398.

HARDEN, T. K. & SONDEK, J. 2006. Regulation of phospholipase C isozymes by ras superfamily GTPases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 46, 355-379.

HARDY, P., NELL, E. E., SPENCE, M., HARDY, J., GRAHAM, D. & ROSENBAUM, R. 1984. Prevalence of six sexually transmitted disease agents among pregnant inner-city adolescents and pregnancy outcome. *The Lancet*, 324, 333-337.

HEPLER, J. R., KOZASA, T., SMRCKA, A. V., SIMON, M. I., RHEE, S. G., STERNWEIS, P. C. & GILMAN, A. G. 1993. Purification from Sf9 cells and characterization of recombinant Gq alpha and G11 alpha. Activation of purified phospholipase C isozymes by G alpha subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 14367-14375.

HIDAKA, K., CAFFREY, J. J., HUA, L., ZHANG, T., FALCK, J. R., NICKEL, G. C., CARREL, L., BARNES, L. D. & SHEARS, S. B. 2002. An Adjacent Pair of Human NUDT Genes on Chromosome X Are Preferentially Expressed in Testis and Encode Two New Isoforms of Diphosphoinositol Polyphosphate Phosphohydrolase. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 32730-32738.

- HIOM, K. 2005. DNA Repair: How to PIKK a Partner. *Current Biology*, 15, R473-R475.
- HIRT, R. P. 2013. *Trichomonas vaginalis* virulence factors: an integrative overview. *Sexually transmitted infections*, 89, 439-443.
- HONIGBERG, B. M. & BRUGEROLLE, G. 1990. Structure. In: HONIGBERG, B. M. (ed.) *Trichomonads Parasitic in Humans*. New York, NY: Springer New York.
- HONIGBERG, B. M., VOLKMANN, D., ENTZEROTH, R. & SCHOLTYSECK, E. 1984. A Freeze-Fracture Electron Microscope Study of *Trichomonas vaginalis* Donné and *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller)1. *The Journal of Protozoology*, 31, 116-131.
- HUGHES, J. P., BAETEN, J. M., LINGAPPA, J. R., MAGARET, A. S., WALD, A., DE BRUYN, G., KIARIE, J., INAMBAO, M., KILEMBE, W., FARQUHAR, C., CELUM, C. & TEAM, T. P. I. P. H. H. T. S. 2012. Determinants of per-coital-act HIV-1 infectivity among african HIV-1-serodiscordant couples. *The Journal of Infectious Diseases*, 205, 358-365.
- HUSSEIN, E. M. & ATWA, M. M. 2008. Infectivity of *Trichomonas vaginalis* pseudocysts inoculated intra-vaginally in mice. *J Egypt Soc Parasitol*, 38, 749-62.
- IRVINE, R. F. & SCHELL, M. J. 2001. Back in the water: the return of the inositol phosphates. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2, 327-338.
- JACOB, F. & MONOD, J. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology*, 3, 318-356.
- JANSZ, H. S., POUWELS, P. H. & SCHIPHORST, J. 1966. Preparation of double-stranded DNA (replicative form) of bacteriophage Φ X174: A simplified method. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 123, 626-627.
- JOHNSRUD, L. 1978. Contacts between *Escherichia coli* RNA polymerase and a lac operon promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75, 5314-5318.

KAMAT, A. & CARPENTER, G. 1997. Phospholipase C- γ 1: Regulation of enzyme function and role in growth factor-dependent signal transduction. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 8, 109-117.

KISSINGER, P. 2015. *Trichomonas vaginalis*: a review of epidemiologic, clinical and treatment issues. *BMC infectious diseases*, 15, 307-307.

KISSINGER, P., SECOR, W. E., LEICHLITER, J. S., CLARK, R. A., SCHMIDT, N., CURTIN, E. & MARTIN, D. H. 2008. Early repeated infections with *Trichomonas vaginalis* among HIV-positive and HIV-negative women. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 46, 994-999.

KOGA, Y. & MORII, H. 2007. Biosynthesis of ether-type polar lipids in archaea and evolutionary considerations. *Microbiol Mol Biol Rev*, 71, 97-120.

KRIEGER, J. N., VERDON, M., SIEGEL, N. & HOLMES, K. K. 1993. Natural History of Urogenital Trichomoniasis in Men. *The Journal of Urology*, 149, 1455-1458.

LAGA, M., MANOKA, A., KIVUVU, M., MALELE, B., TULIZA, M., NZILA, N., GOEMAN, J., BEHETS, F., BATTER, V., ALARY, M., HEYWARD, W. L., RYDER, R. W. & PIOT, P. 1993. Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. *AIDS*, 7, 95-102.

LAHA, D., PORTELA-TORRES, P., DESFOUGÈRES, Y. & SAIARDI, A. 2021. Inositol phosphate kinases in the eukaryote landscape. *Advances in Biological Regulation*, 79, 100782.

LAITINEN, O. H., HYTÖNEN, V. P., NORDLUND, H. R. & KULOMAA, M. S. 2006. Genetically engineered avidins and streptavidins. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63, 2992-3017.

LAUSSMANN, T., EUJEN, R., WEISSHUHN, C. M., THIEL, U. & VOGEL, G. 1996. Structures of diphospho-myo-inositol pentakisphosphate and bisdiphospho-myo-inositol tetrakisphosphate from *Dictyostelium* resolved by NMR analysis. *The Biochemical journal*, 315 (Pt 3), 715-720.

- LEE, C. H., PARK, D., WU, D., RHEE, S. G. & SIMON, M. I. 1992. Members of the Gq alpha subunit gene family activate phospholipase C beta isozymes. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 16044-16047.
- LEE, J. J., MOON, H. S., LEE, T. Y., HWANG, H. S., AHN, M.-H. & RYU, J.-S. 2012. PCR for diagnosis of male *Trichomonas vaginalis* infection with chronic prostatitis and urethritis. *The Korean journal of parasitology*, 50, 157-159.
- LEE, Y.-S., HUANG, K., QUIOCHO, F. A. & O'SHEA, E. K. 2008. Molecular basis of cyclin-CDK-CKI regulation by reversible binding of an inositol pyrophosphate. *Nature Chemical Biology*, 4, 25-32.
- LEE, Y.-S., MULUGU, S., YORK, J. D. & O'SHEA, E. K. 2007. Regulation of a Cyclin-CDK-CDK Inhibitor Complex by Inositol Pyrophosphates. *Science*, 316, 109-112.
- LEHKER, M. W. & ALDERETE, J. F. 1999. Resolution of Six Chromosomes of *Trichomonas vaginalis* and Conservation of Size and Number among Isolates. *The Journal of Parasitology*, 85, 976-979.
- LEHNMAN, I. R. 1974. DNA Ligase: Structure, Mechanism, and Function. *Science*, 186, 790-797.
- LESLIE, N. R., MCLENNAN, A. G. & SAFRANY, S. T. 2002. Cloning and characterisation of hAps1 and hAps2, human diadenosine polyphosphate-metabolising Nudix hydrolases. *BMC biochemistry*, 3, 20-20.
- LEWIS, D. 2014. Trichomoniasis. *Medicine*, 42, 369-371.
- LIN, H., FRIDY, P. C., RIBEIRO, A. A., CHOI, J. H., BARMA, D. K., VOGEL, G., FALCK, J. R., SHEARS, S. B., YORK, J. D. & MAYR, G. W. 2009. Structural analysis and detection of biological inositol pyrophosphates reveal that the family of VIP/diphosphoinositol pentakisphosphate kinases are 1/3-kinases. *The Journal of biological chemistry*, 284, 1863-1872.

LIN, H., LINDNER, K. & MAYR, G. W. 2010. Synthesis and Nonradioactive Microanalysis of Diphosphoinositol Phosphates by HPLC with Postcolumn Complexometry. *In: BARKER, C. J. (ed.) Inositol Phosphates and Lipids: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press.

LONGHESE, M. P. 2008. DNA damage response at functional and dysfunctional telomeres. *Genes & Development*, 22, 125-140.

LOPEZ, I., MAK, E. C., DING, J., HAMM, H. E. & LOMASNEY, J. W. 2001. A Novel Bifunctional Phospholipase C That Is Regulated by G α 12 and Stimulates the Ras/Mitogen-activated Protein Kinase Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 2758-2765.

LÖSER, B., NALASKOWSKI, M. M., FANICK, W., LIN, H., TANNICH, E. & MAYR, G. W. 2012. A novel *Entamoeba histolytica* inositol phosphate kinase catalyzes the formation of 5PP-Ins(1,2,3,4,6)P₅. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 181, 49-52.

LYNG, J. & CHRISTENSEN, J. 1981. A double-blind study of the value of treatment with a single dose tinidazole of partners to females with trichomoniasis. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 60, 199-201.

MA, Y. & LIEBER, M. R. 2002. Binding of Inositol Hexakisphosphate (IP₆) to Ku but Not to DNA-PKcs. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 10756-10759.

MACK, S. R. & MÜLLER, M. 1980. End products of carbohydrate metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 67, 213-216.

MAJERUS, P. W., KISSELEVA, M. V. & NORRIS, F. A. 1999. The Role of Phosphatases in Inositol Signaling Reactions. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 10669-10672.

MAJUMDER, A. L., CHATTERJEE, A., GHOSH DASTIDAR, K. & MAJEE, M. 2003. Diversification and evolution of L-myo-inositol 1-phosphate synthase 1. *FEBS Letters*, 553, 3-10.

MANN, J. R. & MCDERMOTT, S. 2011. Are Maternal Genitourinary Infection and Pre-Eclampsia Associated With ADHD in School-Aged Children? *Journal of Attention Disorders*, 15, 667-673.

MANN, J. R., MCDERMOTT, S., BARNES, T. L., HARDIN, J., BAO, H. & ZHOU, L. 2009. Trichomoniasis in Pregnancy and Mental Retardation in Children. *Annals of Epidemiology*, 19, 891-899.

MANN, J. R., MCDERMOTT, S. & GILL, T. 2010. Sexually transmitted infection is associated with increased risk of preterm birth in South Carolina women insured by Medicaid. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 23, 563-568.

MANNING, G., PLOWMAN, G. D., HUNTER, T. & SUDARSANAM, S. 2002a. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends in Biochemical Sciences*, 27, 514-520.

MANNING, G., WHYTE, D. B., MARTINEZ, R., HUNTER, T. & SUDARSANAM, S. 2002b. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science*, 298, 1912-1934.

MAYR, G. W. 1988. A novel metal-dye detection system permits picomolar-range h.p.l.c. analysis of inositol polyphosphates from non-radioactively labelled cell or tissue specimens. *Biochemical Journal*, 254, 585-591.

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*. *Carbohydrate Research*, 234, 247-262.

MCLENNAN, A. G. 2006. The Nudix hydrolase superfamily. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63, 123-143.

MEITES, E. 2013. Trichomoniasis: the "neglected" sexually transmitted disease. *Infectious disease clinics of North America*, 27, 755-764.

MENNITI, F. S., MILLER, R. N., PUTNEY, J. W. & SHEARS, S. B. 1993a. Turnover of inositol polyphosphate pyrophosphates in pancreaticoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 3850-6.

MENNITI, F. S., OLIVER, K. G., PUTNEY, J. W. & SHEARS, S. B. 1993b. Inositol phosphates and cell signaling: new views of InsP5 and InsP6. *Trends in Biochemical Sciences*, 18, 53-56.

MICHAELIS, L. M., M.L. 1913. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift*, 49, 333-369.

MICHELL, R. H. 2008. Inositol derivatives: evolution and functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 151-161.

MINKOFF, H., GRUNEBAUM, A. N., SCHWARZ, R. H., FELDMAN, J., CUMMINGS, M., CROMBLEHOLME, W., CLARK, L., PRINGLE, G. & MCCORMACK, W. M. 1984. Risk factors for prematurity and premature rupture of membranes: A prospective study of the vaginal flora in pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 150, 965-972.

MOFFATT, B. A. & STUDIER, F. W. 1987. T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. *Cell*, 49, 221-227.

MORII, H., KIYONARI, S., ISHINO, Y. & KOGA, Y. 2009. A novel biosynthetic pathway of archaetidyl-myo-inositol via archaetidyl-myo-inositol phosphate from CDP-archaeol and D-glucose 6-phosphate in methanoarchaeon *Methanothermobacter thermotrophicus* cells. *J Biol Chem*, 284, 30766-74.

MORRISON, B. H., BAUER, J. A., LUPICA, J. A., TANG, Z., SCHMIDT, H., DIDONATO, J. A. & LINDNER, D. J. 2007. Effect of Inositol Hexakisphosphate Kinase 2 on Transforming Growth Factor β -activated Kinase 1 and NF- κ B Activation. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 15349-15356.

MÜLHARDT, C. 2013. Das Werkzeug. *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

MÜLLER, M. 1990. Biochemistry of *Trichomonas vaginalis*. In: HONIGBERG, B. M. (ed.) *Trichomonads Parasitic in Humans*. New York, NY: Springer New York.

MÜLLER, M. 1993. Review Article: The hydrogenosome. *Microbiology*, 139, 2879-2889.

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. *The Biochemical journal*, 366, 549-556.

NALASKOWSKI, M. M. & MAYR, G. W. 2004. The Families of Kinases Removing the Ca²⁺ Releasing Second Messenger Ins(1,4,5)P₃. *Current Molecular Medicine*, 4, 277-290.

NOGIMORI, K., HUGHES, P. J., GLENNON, M. C., HODGSON, M. E., PUTNEY, J. W. & SHEARS, S. B. 1991. Purification of an inositol (1,3,4,5)-tetrakisphosphate 3-phosphatase activity from rat liver and the evaluation of its substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 16499-16506.

NORRIS, F. A., UNGEWICKELL, E. & MAJERUS, P. W. 1995. Inositol Hexakisphosphate Binds to Clathrin Assembly Protein 3 (AP-3/AP180) and Inhibits Clathrin Cage Assembly in Vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 214-217.

PÄHLER, A., HENDRICKSON, W. A., KOLKS, M. A., ARGARAÑA, C. E. & CANTOR, C. R. 1987. Characterization and crystallization of core streptavidin. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 13933-7.

PATTERSON, R. L., VAN ROSSUM, D. B., NIKOLAIDIS, N., GILL, D. L. & SNYDER, S. H. 2005. Phospholipase C- γ : diverse roles in receptor-mediated calcium signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, 30, 688-697.

PEREIRA-NEVES, A. & BENCHIMOL, M. 2007. Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. *Biology of the Cell*, 99, 87-101.

PEREIRA-NEVES, A., RIBEIRO, K. C. & BENCHIMOL, M. 2003. Pseudocysts in *Trichomonads* – New Insights. *Protist*, 154, 313-329.

PESESSE, X., CHOI, K., ZHANG, T. & SHEARS, S. B. 2004. Signaling by Higher Inositol Polyphosphates: SYNTHESIS OF BISDIPHOSPHOINOSITOL TETRAKISPHOSPHATE (“InsP8”) IS SELECTIVELY ACTIVATED BY HYPEROSMOTIC STRESS. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 43378-43381.

PETRIN, D., DELGATY, K., BHATT, R. & GARBER, G. 1998. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical microbiology reviews*, 11, 300-317.

POOLE, A. M. & PENNY, D. 2007. Evaluating hypotheses for the origin of eukaryotes. *BioEssays*, 29, 74-84.

PREISNER, H., KARIN, E. L., POSCHMANN, G., STÜHLER, K., PUPKO, T. & GOULD, S. B. 2016. The Cytoskeleton of Parabasalian Parasites Comprises Proteins that Share Properties Common to Intermediate Filament Proteins. *Protist*, 167, 526-543.

REBECCHI, M. J. & PENTYALA, S. N. 2000. Structure, Function, and Control of Phosphoinositide-Specific Phospholipase C. *Physiological Reviews*, 80, 1291-1335.

RENDÓN-MALDONADO, J. G., ESPINOSA-CANTELLANO, M., GONZÁLEZ-ROBLES, A. & MARTÍNEZ-PALOMO, A. 1998. *Trichomonas vaginalis*: In Vitro Phagocytosis of Lactobacilli, Vaginal Epithelial Cells, Leukocytes, and Erythrocytes. *Experimental Parasitology*, 89, 241-250.

RITCHIE, K. B., MALLORY, J. C. & PETES, T. D. 1999. Interactions of TLC1 (which encodes the RNA subunit of telomerase), TEL1, and MEC1 in regulating telomere length in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 19, 6065-6075.

ROBERT, X. & GOUET, P. 2014. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research*, 42, W320-W324.

RODRIGUES, M. V., BORGES, N., HENRIQUES, M., LAMOSA, P., VENTURA, R., FERNANDES, C., EMPADINHAS, N., MAYCOCK, C., COSTA, M. S. D. & SANTOS, H. 2007. Bifunctional CTP:Inositol-1-Phosphate Cytidyltransferase/CDP-Inositol:Inositol-1-Phosphate Transferase, the Key Enzyme for Di-*myo*-Inositol-

Phosphate Synthesis in Several (Hyper)thermophiles. *Journal of Bacteriology*, 189, 5405-5412.

ROWLEY, J., VANDER HOORN, S., KORENRAMP, E., LOW, N., UNEMO, M., ABURADDAD, L. J., CHICO, R. M., SMOLAK, A., NEWMAN, L., GOTTLIEB, S., THWIN, S. S., BROUTET, N. & TAYLOR, M. M. 2019. Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. *Bulletin of the World Health Organization*, 97, 548-562P.

SAFRANY, S. T., INGRAM, S. W., CARTWRIGHT, J. L., FALCK, J. R., MCLENNAN, A. G., BARNES, L. D. & SHEARS, S. B. 1999. The Diadenosine Hexaphosphate Hydrolases from *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* Are Homologues of the Human Diphosphoinositol Polyphosphate Phosphohydrolase: OVERLAPPING SUBSTRATE SPECIFICITIES IN A MutT-TYPE PROTEIN. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 21735-21740.

SAIARDI, A., BHANDARI, R., RESNICK, A. C., SNOWMAN, A. M. & SNYDER, S. H. 2004. Phosphorylation of Proteins by Inositol Pyrophosphates. *Science*, 306, 2101-2105.

SAIARDI, A., CAFFREY, J. J., SNYDER, S. H. & SHEARS, S. B. 2000. Inositol polyphosphate multikinase (ArgRIII) determines nuclear mRNA export in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 468, 28-32.

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. *Current Biology*, 9, 1323-1326.

SAIARDI, A., NAGATA, E., LUO, H. R., SAWA, A., LUO, X., SNOWMAN, A. M. & SNYDER, S. H. 2001a. Mammalian inositol polyphosphate multikinase synthesizes inositol 1,4,5-trisphosphate and an inositol pyrophosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 2306-2311.

SAIARDI, A., NAGATA, E., LUO, H. R., SAWA, A., LUO, X., SNOWMAN, A. M. & SNYDER, S. H. 2001b. Mammalian inositol polyphosphate multikinase synthesizes

inositol 1,4,5-trisphosphate and an inositol pyrophosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 2306-2311.

SAIARDI, A., NAGATA, E., LUO, H. R., SNOWMAN, A. M. & SNYDER, S. H. 2001c. Identification and Characterization of a Novel Inositol Hexakisphosphate Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 39179-39185.

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

SANDERS, R. E. 1974. The Lactose Operon of Escherichia coli. In: KING, R. C. (ed.) *Bacteria, Bacteriophages, and Fungi: Volume 1*. Boston, MA: Springer US.

SASAKAWA, N., SHARIF, M. & HANLEY, M. R. 1995. Metabolism and biological activities of inositol pentakisphosphate and inositol hexakisphosphate. *Biochemical Pharmacology*, 50, 137-146.

SCHELL, M. J. 2010. Inositol trisphosphate 3-kinases: focus on immune and neuronal signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, 1755-1778.

SCHELL, M. J., LETCHER, A. J., BREARLEY, C. A., BIBER, J., MURER, H. & IRVINE, R. F. 1999. PiUS (Pi uptake stimulator) is an inositol hexakisphosphate kinase. *FEBS Letters*, 461, 169-172.

SCHLÜTER, D. 2019. Trichomonaden. In: HOF, H., SCHLÜTER, D. & DÖRRIES, R. (eds.) *Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie*. 7., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage ed.: Georg Thieme Verlag.

SCHMIDT, T. G. M. & SKERRA, A. 1993. The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Protein Engineering, Design and Selection*, 6, 109-122.

SCHMIDT, T. G. M. & SKERRA, A. 1994. One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the “Strep tag” and immobilized recombinant core streptavidin. *Journal of Chromatography A*, 676, 337-345.

SCHMIDT, T. G. M. & SKERRA, A. 2007. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nature Protocols*, 2, 1528.

SCHOLZ, P., BERGMANN, G. & MAYR, G. W. 1990. Nuclear magnetic resonance spectroscopy of myo-inositol phosphates. *Methods in inositide Research*, 65-82.

SCHOLZ, P. B., G; MAYR, GW 1990. *Nuclear magnetic resonance spectroscopy of myo-inositol phosphates*, Raven Press London.

SCHWEBKE, J. R. & BARRIENTES, F. J. 2006. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* Isolates with Resistance to Metronidazole and Tinidazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 4209-4210.

SEEDS, A. M., BASTIDAS, R. J. & YORK, J. D. 2005. Molecular definition of a novel inositol polyphosphate metabolic pathway initiated by inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 280, 27654-61.

SEEDS, A. M., FREDERICK, J. P., TSUI, M. M. K. & YORK, J. D. 2007. Roles for inositol polyphosphate kinases in the regulation of nuclear processes and developmental biology. *Advances in enzyme regulation*, 47, 10-25.

SEÑA, A. C., BACHMANN, L. H. & HOBBS, M. M. 2014. Persistent and recurrent *Trichomonas vaginalis* infections: epidemiology, treatment and management considerations. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 12, 673-685.

SEÑA, A. C., MILLER, W. C., HOBBS, M. M., SCHWEBKE, J. R., LEONE, P. A., SWYGARD, H., ATASHILI, J. & COHEN, M. S. 2007. *Trichomonas vaginalis* infection in male sexual partners: implications for diagnosis, treatment, and prevention. *Clinical Infectious Diseases*, 44, 13-22.

SHEARS, S. B. 1996. Inositol Pentakis- and Hexakisphosphate Metabolism Adds Versatility to the Actions of Inositol Polyphosphates Novel Effects on Ion Channels and Protein Traffic. In: BISWAS, B. B. & BISWAS, S. (eds.) *myo-Inositol Phosphates, Phosphoinositides, and Signal Transduction*. Boston, MA: Springer US.

SHEARS, S. B. & WANG, H. 2019. Inositol phosphate kinases: Expanding the biological significance of the universal core of the protein kinase fold. *Advances in Biological Regulation*, 71, 118-127.

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.

SHERMAN, K. J., DALING, J. R. & WEISS, N. S. 1987. Sexually Transmitted Diseases and Tubal Infertility. *Sexually Transmitted Diseases*, 14, 12-16.

SHILOH, Y. 2003. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature Reviews Cancer*, 3, 155-168.

SHORE, D. & BIANCHI, A. 2009. Telomere length regulation: coupling DNA end processing to feedback regulation of telomerase. *The EMBO Journal*, 28, 2309-2322.

SMITH, B. J. 1994. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. In: WALKER, J. M. (ed.) *Basic Protein and Peptide Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press.

STEGER, D. J., HASWELL, E. S., MILLER, A. L., WENTE, S. R. & O'SHEA, E. K. 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). *Journal of Biological Chemistry*, 268, 4009-15.

STEPHENS, L. R., HAWKINS, P. T., STANLEY, A. F., MOORE, T., POYNER, D. R., MORRIS, P. J., HANLEY, M. R., KAY, R. R. & IRVINE, R. F. 1991. myo-inositol pentakisphosphates. Structure, biological occurrence and phosphorylation to myo-inositol hexakisphosphate. *The Biochemical journal*, 275 (Pt 2), 485-499.

STEPHENS, L. R. & IRVINE, R. F. 1990. Stepwise phosphorylation of myo-inositol leading to myo-inositol hexakisphosphate in Dictyostelium. *Nature*, 346, 580-583.

STIEGLITZ, K. A., ROBERTS, M. F., LI, W. & STEC, B. 2007. Crystal structure of the tetrameric inositol 1-phosphate phosphatase (TM1415) from the hyperthermophile, *Thermotoga maritima*. *The FEBS Journal*, 274, 2461-2469.

STIEGLITZ, K. A., YANG, H., ROBERTS, M. F. & STEC, B. 2005. Reaching for Mechanistic Consensus Across Life Kingdoms: Structure and Insights into Catalysis of the myo-Inositol-1-phosphate Synthase (mIPS) from *Archaeoglobus fulgidus*. *Biochemistry*, 44, 213-224.

STOCKTON, K. P., GREATREX, B. W. & TAYLOR, D. K. 2014. Synthesis of allo- and epi-Inositol via the NHC-Catalyzed Carbocyclization of Carbohydrate-Derived Dialdehydes. *The Journal of Organic Chemistry*, 79, 5088-5096.

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

STRITZKE, C., NALASKOWSKI, M. M., FANICK, W., LIN, H. & MAYR, G. W. 2012. A Plasmodium multi-domain protein possesses multiple inositol phosphate kinase activities. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 186, 134-138.

STUDIER, F. W. 1991. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *Journal of Molecular Biology*, 219, 37-44.

SUTTON, M., STERNBERG, M., KOUMANS, E. H., MCQUILLAN, G., BERMAN, S. & MARKOWITZ, L. 2007. The Prevalence of *Trichomonas vaginalis* Infection among

Reproductive-Age Women in the United States, 2001–2004. *Clinical Infectious Diseases*, 45, 1319-1326.

TAKATA, H., KANO, Y., GUNGE, N., SHIRAHIGE, K. & MATSUURA, A. 2004. Reciprocal Association of the Budding Yeast ATM-Related Proteins Tel1 and Mec1 with Telomeres In Vivo. *Molecular Cell*, 14, 515-522.

TAKAZAWA, K., PERRET, J., DUMONT, J. E. & ERNEUX, C. 1990. Human brain inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase cDNA sequence. *Nucleic Acids Research*, 18, 7141-7141.

TAKAZAWA, K., PERRET, J., DUMONT, J. E. & ERNEUX, C. 1991a. Molecular cloning and expression of a human brain inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 174, 529-535.

TAKAZAWA, K., PERRET, J., DUMONT, J. E. & ERNEUX, C. 1991b. Molecular cloning and expression of a new putative inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase isoenzyme. *The Biochemical journal*, 278 (Pt 3), 883-886.

THOMAS, D. B. 1973. AN EPIDEMIOLOGIC STUDY OF CARCINOMA IN SITU AND SQUAMOUS DYSPLASIA OF THE UTERINE CERVIX1. *American Journal of Epidemiology*, 98, 10-28.

THOMAS, M. P., MILLS, S. J. & POTTER, B. V. L. 2016. The “Other” Inositols and Their Phosphates: Synthesis, Biology, and Medicine (with Recent Advances in myo-Inositol Chemistry). *Angewandte Chemie International Edition*, 55, 1614-1650.

THOTA, S. G. & BHANDARI, R. 2015. The emerging roles of inositol pyrophosphates in eukaryotic cell physiology. *Journal of Biosciences*, 40, 593-605.

TRINTIS, J., EPIE, N., BOSS, R. & RIEDEL, S. 2010. Neonatal *Trichomonas vaginalis* infection: a case report and review of literature. *International Journal of STD & AIDS*, 21, 606-607.

VERBSKY, J. & MAJERUS, P. W. 2005. Increased Levels of Inositol Hexakisphosphate (InsP₆) Protect HEK293 Cells from Tumor Necrosis Factor α - and Fas-induced Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 29263-29268.

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. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 31857-31862.

VICINANZA, M., D'ANGELO, G., DI CAMPLI, A. & DE MATTEIS, M. A. 2008. Membrane traffic in the secretory pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, 2833-2841.

VIIKKI, M. 2000. Gynaecological Infections as Risk Determinants of Subsequent Cervical Neoplasia. *Acta Oncologica*, 39, 71-75.

VOGLMAIER, S. M., BEMBENEK, M. E., KAPLIN, A. I., DORMÁN, G., OLSZEWSKI, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 187, 158-163.

WALOCHNIK, J. & ASPÖK, H. 2002. *Trichomonas vaginalis* – ein parasitärer Erreger einer Geschlechtskrankheit. *DENISIA*, 6, 145-161.

WANG, H., FALCK, J. R., HALL, T. M. T. & SHEARS, S. B. 2012. Structural basis for an inositol pyrophosphate kinase surmounting phosphate crowding. *Nature Chemical Biology*, 8, 111-116.

- WENDEL, K. A. & WORKOWSKI, K. A. 2007. Trichomoniasis: Challenges to Appropriate Management. *Clinical Infectious Diseases*, 44, S123-S129.
- WESTON, T. E. & NICOL, C. S. 1963. NATURAL HISTORY OF TRICHOMONAL INFECTION IN MALES. *The British journal of venereal diseases*, 39, 251-257.
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 11904-11910.
- WILSON, M. S., JESSEN, H. J. & SAIARDI, A. 2019. The inositol hexakisphosphate kinases IP6K1 and -2 regulate human cellular phosphate homeostasis, including XPR1-mediated phosphate export. *Journal of Biological Chemistry*, 294, 11597-11608.
- WING, M. R., BOURDON, D. & HARDEN, T. K. 2003a. PLC-epsilon: a shared effector protein in Ras-, Rho-, and G alpha beta gamma-mediated signaling. *Molecular interventions*, 3, 273-80.
- WING, M. R., SNYDER, J. T., SONDEK, J. & HARDEN, T. K. 2003b. Direct Activation of Phospholipase C- ϵ by Rho. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 41253-41258.
- WOEHLE, C., KUSDIAN, G., RADINE, C., GRAUR, D., LANDAN, G. & GOULD, S. B. 2014. The parasite *Trichomonas vaginalis* expresses thousands of pseudogenes and long non-coding RNAs independently from functional neighbouring genes. *BMC Genomics*, 15, 906.
- WU, D., KATZ, A., LEE, C. H. & SIMON, M. I. 1992. Activation of phospholipase C by alpha 1-adrenergic receptors is mediated by the alpha subunits of Gq family. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 25798-802.
- WUNDENBERG, T., GRABINSKI, N., LIN, H. & MAYR, G. W. 2014. Discovery of InsP6-kinases as InsP6-dephosphorylating enzymes provides a new mechanism of cytosolic InsP6 degradation driven by the cellular ATP/ADP ratio. *Biochem J*, 462, 173-84.

WUNDENBERG, T. & MAYR GEORG, W. 2012. Synthesis and biological actions of diphosphoinositol phosphates (inositol pyrophosphates), regulators of cell homeostasis.

WUNDENBERG, T. & MAYR, G. W. 2012. Synthesis and biological actions of diphosphoinositol phosphates (inositol pyrophosphates), regulators of cell homeostasis.

WUNDENBERG, T., NALASKOWSKI, M. M., LÖSER, B., FANICK, W., HACKL, T., FÜRNKRANZ, U., REHBACH, C., LIN, H. & MAYR, G. W. 2019. A novel 6-pyrophosphorylating IP6 kinase (IP6-6K) discovered in the protozoon *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 227, 53-63.

YANCEY, P. H. 2005. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *Journal of Experimental Biology*, 208, 2819-2830.

YANG, X. & SHEARS, S. B. 2000. Multitasking in signal transduction by a promiscuous human Ins(3,4,5,6)P(4) 1-kinase/Ins(1,3,4)P(3) 5/6-kinase. *The Biochemical journal*, 351 Pt 3, 551-555.

YE, W., ALI, N., BEMBENEK, M. E., 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. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 1564-1568.

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.

YORK, S. J., ARMBRUSTER, B. N., GREENWELL, P., PETES, T. D. & YORK, J. D. 2005. Inositol Diphosphate Signaling Regulates Telomere Length. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 4264-4269.

YUH, Y.-S., LIU, J.-Y. & SHAIU, M.-F. 1997. Chromosome Number of *Trichomonas vaginalis*. *The Journal of Parasitology*, 83, 551-553.

ZHANG, X. & STUDIER, F. W. 1997. Mechanism of inhibition of bacteriophage T7 RNA polymerase by T7 lysozyme 11 Edited by M. Gottesman. *Journal of Molecular Biology*, 269, 10-27.

ZHANG, Z.-F. & BEGG, C. B. 1994. Is *Trichomonas vaginalis* a Cause of Cervical Neoplasia? Results from a Combined Analysis of 24 Studies. *International Journal of Epidemiology*, 23, 682-690.

ZUBÁČOVÁ, Z., CIMBŮREK, Z. & TACHEZY, J. 2008. Comparative analysis of trichomonad genome sizes and karyotypes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 161, 49-54.

10 Anhang

```

TvIP6K-1 1 -----ME
TvIP6K-2 1 -----MQ
TvIP6K-3 1 -----MM
TvIP6K-4 1 -----MSLEGMTNQ-----PGPIN
TvIPK-1 1 -----
TvIPK-2 1 -----MT
HsIP6K-2 1 MSPAFRAMDVEPRAGVLEPFVHVQVGGHSCVLRFNETTLCKPLVPREHQFYETLPAEMR

TvIP6K-1 3 SNS-----DSFSS--DLDPLNTQG GGHGQLCKIKNLD-----
TvIP6K-2 3 CDKPSV-----RNEKKD---EVMTLNTQG GGHGQLLVTKNSH-----
TvIP6K-3 3 SDKPQV-----STNSD---EIMTLNTQG GGHGQLLAAKNSR-----
TvIP6K-4 15 D-----KTVLHMDSRNGSEIKRKRFGHETQN-FSPNEG-----
TvIPK-1 1 -----MCEIE---FTGALPGQAG GGHGKIMQCYDKK-----
TvIPK-2 3 S-----RMTLHIDHSQGQLLRSKI FGHDCVI-IPFREG-----
HsIP6K-2 61 KFTPQYKGVSVSRFEEDDRNLCLIAAYPLKGDHGLVDIVDNDSDCEPKSKLLRWTNKKHH

TvIP6K-1 34 -----HGIDCVAKPLFE-HENNFYTIM-----TKTPLAD
TvIP6K-2 37 -----LGIDCVAKPLFK-HENHFYRVM-----SKTPLVE
TvIP6K-3 37 -----LGIDCVAKPLFK-HENHFYRVM-----SKTPLVD
TvIP6K-4 47 -----YFAKIADK-QEVIMYDLFYNKCKGIVKPYLLPK
TvIPK-1 28 -----SSTHCIAPVDQ-READAYNIL-----QKTFLEP
TvIPK-2 35 -----YIAKCKLIRELKFYKTYVGSLSHNILEPELIPS
HsIP6K-2 121 VLETEKTPKDWVRQHRKEEKMKSHKLEEEFEWLRK-SEVLYYTVVE-----KKNWNISS

TvIP6K-1 62 CLPR--F-----FGNTQIDCHEYLLIEDLTAGMTSPCTADLKLK
TvIP6K-2 65 CLPR--Y-----CGKTEYNGEYLLIEDLTSGMTSPCTADLKLK
TvIP6K-3 65 CLPQ--Y-----CGKTVYNGSEYLLIEDLTAGMTSPCTADLKLK
TvIP6K-4 79 CIGTGYFNEGNTALKSGDPIEVMFTSKMTSEPRDGHAPAMIFQADLTHGYEKPCLVDFKIG
TvIPK-1 56 YVPR--Y-----FGIHNVDCKDWIVIEDLTYGFTSPCVADLKVQ
TvIPK-2 68 VEGI--VDDNNVHLSSSD--EVDLEVKRDIEINHKS EYLMMHDIADGYSRPAVLDVKLK
HsIP6K-2 172 QIKH--YNPWSM--KCH--QQQLQRMKENAKHRNQYKFI LLENLTSRYEVPCLVDLKM

TvIP6K-1 99 TRSFEIGVSES KVRKQMONMSKSTTPKYAVRIDVSMRKGDNL-----VNH-WDRNFGK
TvIP6K-2 102 TRSFEIGVPES KQKQLQNMSSKSTTPKYAVRIDVSLRKGDNV-----VKR-WDRNYGK
TvIP6K-3 102 TRSFEIGVPES KRLKQLQNMSSRSTSPKYAVRIDVSLRKNQSI-----VKR-WDRNYGK
TvIP6K-4 139 LRSWRVGS SQKSTRRRNKLYTEPTRTLKYHIRAAMWYGSSEKQYQHDLCYVERNFGF
TvIPK-1 93 TRHYDFYSSQAKIDYLVGKQVGSTTNSHGVRVIGINLRKDKQD-----IYV-QDKKQGL
TvIPK-2 125 TRTWALGASKIKRERMKKKCS CPTSSSEL CVRVR AAMWYSRTPDKWPVEENINCVKREWGN
HsIP6K-2 225 TRQHGDDASEEKAANQIRKCOQSTSAVIGVRVCGMQVYQAGSG-----QLMFMNKYHGR

TvIP6K-1 152 KAPIQS FIDTMNKFIPVNR--KQEFLDKVEDVI TKLTQTKEIYPGSRLYS ASLLIVYDGD
TvIP6K-2 155 KASLNSFIKSMHKFIPANK--KEEFVAKVENVINKLSIAKEMYPGSRLYS ASLLIVYDSD
TvIP6K-3 155 KASLNSLIDTLNKFIPVNR--REEFIKAVENVINKLSIAKEMYPGSRLYS ASLLIVYDSD
TvIP6K-4 199 FCTKEELDVMHEFFKY PQI-PTYRKKLEELATAF-QKFHDTIGLRIVS GSVVIVYDAA
TvIPK-1 146 KNTAEQFVQSLHTLLEPGL--KDIFHKRLTQIRDAFVEMQKQYPGFRIYSSILIVYDGD
TvIPK-2 185 CSCSKSEFLDFLKFHYYPNQI-PIFVEKLNKLR TSM-AKMREQFGARMYS SSVIVYDDED
HsIP6K-2 279 KLSVQGFKEALFQFFHNGRYLRRELLGPVLRKLRTEIKAVLERQESYRFYS SSVIVYDGD

TvIP6K-1 210 Q-D-----LPIRVALDFAIAYS DITQCSGK
TvIP6K-2 213 NNN-----TPMKVALDFAIAYCDITKSGGKL
TvIP6K-3 213 SPN-----SPMRVVLDFAIAYCDITKSGGKL
TvIP6K-4 257 HP-----EKFDLRFDFAIKGFYHIEEIAKKF
TvIPK-1 204 AKEY-----TENNVKIMLDFLAIFVYDITKREGADY
TvIPK-2 243 DP-----SKFDCRLDFAIKTYLDITKAAKES
HsIP6K-2 339 ERPEVVLDSDAEDLEDLSEESADESAGAYAYKPIGASSVDVVRMDFAITTCRILYGEDTV-

TvIP6K-1 236 D--SEEFEDNTILGLRNIHLLDTPTELEKRQI-
TvIP6K-2 240 D--NREFDDNTLLGLRNI VHI FTNPNEIEERSN-
TvIP6K-3 240 D--AREFDDNTLLGLRNI VHI FNPSPNEIEERTNL
TvIP6K-4 283 GEPLDACE DYVVEGLRNL SNELGKLLLEQ-----
TvIPK-1 234 N--NHEFDDGVLLGLN HNVFTK-----
TvIPK-2 269 NESVDECEDSVLPALNSH TSMIESLV-----
HsIP6K-2 398 V--HEGQDAGYIFGLQSLIDIVTEISEESGE---

```

Abbildung 74: Sequenzalignment der hsIP6K2 mit 6 prädierten IPKs aus *Trichomonas vaginalis*

aus Wundenberg T. et al. 2019. A novel 6-pyrophosphorylating IP6 kinase (IP6-6K) discovered in the protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical*

Parasitology, 227, 54, Fig. 1: Fig. 1. *T. vaginalis* IPKs containing the PDKG signature motif. Amino acid sequences of four *T. vaginalis* IP6Ks, two additional *T. vaginalis* IPKs and human inositol hexakisphosphate kinase isoform 2 were aligned using the Clustal Omega program [24] (TvIP6K1: XM_001323215/TVAG_410270; TvIP6K2: XM_001312735/TVAG_175750; TvIP6K3: XM_001302263/TVAG_574700; TvIP6K4: XM_001305422/TVAG_344490; TvIPK1: XM_001583627/TVAG_476200; TvIPK2: XM_001294230/TVAG_586240; HsIP6K2: AAH65533).

Substrate D/m()InsP _x	1st product D/m()InsP _{x+1}	V _{max} ¹ /V _{in} ST mU/mg	SD	K _M μM	SD	V _{max} /K _M min ⁻¹ *(mg/l) ⁻¹
1,3,4,6,	→ 1,3,4,5,6	59.290	5.569	0,14	0,08	423,5
1,2,4,5,6	→ 1,2,3,4,5,6	46.393	696	0,12	0,05	386,6
1,2,4,5	→ 1,2,3,4,5	36.051	3.342	0,23	0,10	156,7
1,4,5	→ 1,4,5,6	6.610	709	0,50	0,30	13,22
2,4,5,6	→ 2,3,4,5,6	5.240	70	1,10	0,60	4,764
2,4,5	→ 2,3,4,5	5.027	155	3,00	1,40	1,676
1,2,3,4,6	→ 1,2,3,4,5,6	3.607	726	0,42	0,25	8,587
1,4,6	→ 1,4,5,6	3.145	901	0,55	0,32	5,718
2,3,5,6	→ 2,3,4,5,6	1.639	10	3,50	1,50	0,468
1,4,5	→ 1,3,4,5	1.308		1,00	0,58	1,308
2,4,5	→ 2,4,5,6	500	6	2,00		0,250
1,3,4,5	→ 1,3,4,5,6	401	19	0,70	0,29	0,573
3,4,6,	→ 3,4,5,6	383	7,7	1,10		0,348
1,4,5,6	→ 1,3,4,5,6	273	19	5,00	2,00	0,055
2,3,4,5	→ 2,3,4,5,6	94	3,8	1,10	0,40	0,085
1,2,5,6	→ 1,2,4,5,6	< 60				
1,3,5,6	→ 1,3,4,5,6	59		1,10	0,60	0,054
1,2,3,4,5	→ 1,2,3,4,5,6	54		2,00	1,60	0,027
1,3,4,5	→ 3PP-1,4,5	50		< 0,70		0,071
2,3,5	→ 2,3,5,6	46	2,6			
1,2,3,5,6	→ 1,2,3,4,5,6	17,5		2,10	1,10	0,008
1,2,3,6	→ 1,2,3,5,6	17,4				
1,3,5	→ 1,3,5,6	12,9		0,80		0,016
2,3,4,5,6	→ 1,2,3,4,5,6	8,2		< 0,20		0,041
1,2,3,4,5,6	→ 3PP-1,2,4,5,6	7,9	1,3	> 5,00		0,002
1,3,4	→ 1,3,4,6	6,0		2,00		0,003
3PP-1,4,5	→ 3PP-1,4,5,6	45,0		< 0,20		0,225
1,2,5	→ 1,2,5,6	< 4,0				
1,3,4,5,6	→ 6PP-1,3,4,5	3,6	0,6	> 2,00		0,002
4,5	→ 3,4,5 > 4,5,6	2,3				
1,4	→ 1,3,4	1,9				
1,2,3,4	→ 1,2,3,4,6	0,6				
1,2,3,5	→ 1,2,3,5,6	0,5				
3,4,5,6	→ n.d.	0,2				
1,2,6	→ n.d.	0				

Abbildung 75: Substratumsetzung der TvIPMK – Spezifische Aktivität und katalytische Effizienz

11 Danksagung

Sehr geehrter Herr Professor Mayr, ich danke Ihnen für die Überlassung des Themas, die stete Unterstützung bei der Durchführung sämtlicher Teile dieser Doktorarbeit, insbesondere auch das Vertrauen und die Freiheiten, die Sie mir bei der Durchführung der Experimente und dem Einbringen meiner Ideen geschenkt haben. Außerdem danke ich Ihnen für die anregenden Diskussionen, Ihr ehrliches und konstruktives Feedback und die ausgezeichnete Betreuung aller Aspekte dieser Arbeit.

Sehr geehrter Herr Professor Itzen, ich danke Ihnen für Ihre Unterstützung und die Möglichkeit auch nach der Emeritierung von Prof. Mayr ergänzende Versuche durchzuführen.

Außerdem möchte ich allen Mitarbeitern der AG Mayr danken, insbesondere Marcus Nalaskowski, Hongying Lin, Werner Fanick, Christoph Rehbach, Nina Nelson und Helge Kiesbye.

Lieber Marcus, ich danke dir für die Betreuung meiner Arbeit, insbesondere für die Unterstützung bei den Klonierungsarbeiten, für die vielen wichtigen Hinweise, die du mir immer wieder im Laufe der Doktorarbeit gegeben hast und die wichtigen Diskussionen über das Thema.

Liebe Hongying, ich wünsche, du wärest noch unter uns. Ich danke dir für deine Arbeit und für deine Unterstützung, insbesondere was die Durchführung der HPLC Analytik angeht.

Lieber Werner, vielen Dank für die Unterstützung bei der Durchführung der optischen Tests. Deine langjährige Erfahrung und die vielen kleinen Hinweise, die du mir gegeben hast, waren sehr wertvoll.

Liebe Nina, vielen Dank für die Unterstützung bei der Durchführung der Aufreinigung der Proteine.

Lieber Christoph, vielen Dank für die zahlreichen Diskussionen, die wir im Zusammenhang mit den Experimenten geführt haben.

Lieber Helge, vielen Dank für die Unterstützung in allen IT Belangen und dafür, dass du immer ein offenes Ohr für mich hattest.

Allen jetzigen und ehemaligen Institutsmitarbeitern danke ich für die gute Zusammenarbeit und freundliche Arbeitsatmosphäre. Das Team des Instituts und die gemeinsamen Erlebnisse haben diese Zeit zu etwas besonderem gemacht, woran ich mich gerne zurück erinnere.

An meine Eltern. Ich danke euch dafür, dass ihr immer an mich geglaubt habt, die bedingungslose Unterstützung und die Freiheiten und Möglichkeiten, die ihr mir geschenkt habt.

An meine Schwester. Ich danke dir für deine kritischen Worte, die meinen Blick auf das Wesentliche gelenkt haben. Du gibst mir immer wieder sehr wertvolle lebensnahen Ratschläge aus deinem Blickwinkel, die mir immer wieder weitergeholfen haben.

12 Lebenslauf

Lebenslauf aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten.

13 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Hannover, der

Unterschrift:

Sabine Roth