

Aus der Abteilung
für
Zelluläre Signaltransduktion
des Institutes
Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
Direktor: Prof. Dr. G.W. Mayr

**Klonierung und Sequenzierung einer neuen
A-Isoform-ähnlichen
Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase
aus Hühnererythrozyten**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von
Marcus Möller
aus Stade

Hamburg, 2001

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am 6.4.2001

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Dekan: Prof. Dr. H.-P. Leichtweiß

Referent: Prof. Dr. G.W. Mayr

Korreferent:

Meinen Eltern

1. EINLEITUNG	4
1.1. Inositol (1,4,5)P ₃ vermittelte Signaltransduktion	4
1.2. Intrazelluläre Inositol (1,4,5)P ₃ -Rezeptoren	8
1.3. Die verschiedenen Isoformen der Inositol (1,4,5)P ₃ 3-Kinase	9
1.4. Funktionelle Reste und Regulationsmechanismen der Inositol (1,4,5)P ₃ 3-Kinase sowie mögliche Folgen bei Störungen der Regulationsmechanismen	11
1.5. Inositol (1,3,4,5)P ₄ -bindende Proteine	14
1.6. Die Bedeutung der Ins(1,4,5)P ₃ 3-Kinase bei der Bildung von Ins(3,4,5,6)P ₄ und den höher phosphorylierten Inositolphosphaten	17
1.7. Zielsetzung der Arbeit	29
2. MATERIAL UND METHODEN	30
2.1. Material	30
2.1.1. Lösungen	30
2.1.2. Kulturmedien und Festagarplatten	33
2.1.3. Bakterienstämme	34
2.1.4. Plasmidvektoren	35
2.1.5. Oligonukleotide (Primer)	35
2.1.6. Enzyme	38
2.1.7. Membranen	38
2.1.8. λ-cDNS-Banken	39
2.1.9. Genomische DNS-Bank	40
2.1.10. Computerprogramme	40
2.2. Methoden	40
2.2.1. Aufreinigung von DNS aus Agarosegelen	40
2.2.2. Präparation von Plasmid-DNS aus Flüssigkulturen	41
2.2.3. Screening einer genomischen DNA-Bank (Bentom und Davis, 1977)	42
2.2.4. Präparation von λ-DNS (Lockett, 1990)	45
2.2.5. Photometrische Quantifizierung von RNA/DNA-Präparationen	45
2.2.6. Schneiden von DNS mit Restriktionsendonukleasen	46
2.2.7. Ligation von Restriktions- und PCR-Fragmenten in Plasmide	46
2.2.8. Trennung von DNS-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese	46

2.2.9.	Präparation kompetenter Zellen	47
2.2.10.	Transformation von <i>E. coli</i> (Hanahan, 1983)	47
2.2.11.	Polymerase-Kettenreaktion (Mullis & Faloona, 1987)	49
2.2.12.	Nested-PCR	50
2.2.13.	DNS-Sequenzierung	50
2.2.14.	Isolation totaler RNS aus 6 und 9 Tage alten Hühnerembryonen	51
2.2.15.	Präparation von total-RNS aus Hühnerembryonen	52
2.2.16.	Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) (Frohman et al.,1988)	54
2.2.17.	Isolierung von mRNA aus total-RNS	55
2.2.17.1.	Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) (Chenchik et al.,1995;1996)	56
2.2.18.	Adaptor-Ligation	58
2.2.19.	5'-RACE-PCR	59
2.2.20.	Northernblotanalysen von total-RNS aus 6 und 9 Tage alten Hühnerembryonen	60
3.	ERGEBNISSE	63
3.1.	Sichtung von cDNS-Banken mittels PCR	63
3.2.	Isolierung von m-RNS aus 6 und 9 Tage alten Hühnerembryonen	65
3.2.1.	RT-PCR-Kontrolle der total-RNS auf Ins(1,4,5)P ₃ 3-Kinase-Sequenz	66
3.3.	5'RACE	67
3.3.1.	cDNS-Synthese	67
3.3.2.	5'RACE-PCR	68
3.4.	Northernblotanalyse der mRNA aus 6 und 9 Tage alten Hühnerembryonen	79
3.5.	Genomische Teilsequenz der Inositol (1,4,5)P ₃ 3-Kinase	80
3.5.1.	Sichtung einer genomischen DNS-Bank nach dem Ins(1,4,5)P ₃ 3-Kinasegen	80
3.5.2.	Subklonierung, Sequenzierung und Charakterisierung der genomischen Partialsequenz der Ins(1,4,5)P ₃ 3-Kinase aus den beiden Lambdaklonen	82
4.	DISKUSSION	93
5.	ZUSAMMENFASSUNG	105
6.	ABKÜRZUNGEN	107
6.1.	Allgemeine Abkürzungen	107
6.2.	Inositolphosphate und Phosphatidylinositole	109

6.3. Ein - und Drei-Buchstaben-Code der Aminosäuren	109
7. LITERATURVERZEICHNIS	110
8. DANKSAGUNG	123
9. CURRICULUM VITAE	124

1. Einleitung

1.1. Inositol (1,4,5)P₃ vermittelte Signaltransduktion

Der Ausgangspunkt für die Bildung des sekundären Botenstoffes Inositol 1,4,5-trisphosphat (Ins(1,4,5)P₃) und die damit verbundene Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern ist die Stimulierung von Zelloberflächenrezeptoren durch eine Vielzahl von Neurotransmittern, Hormonen und Wachstumsfaktoren (siehe Tab. 1).

G-Protein gekoppelte Rezeptoren: Via PLCβ		Tyrosinkinase gekoppelte Rezeptoren: Via PLC γ
Adrenerge: α _{1α} , α _{1B} , α _{1D}	Oxytocin: OT	Epidermal growth factor receptor Platelet-derived growth factor receptor Fibroblast growth factor receptor ErbB2 T-Zellreceptor
Muscarine: M ₁ , M ₂ , M ₃	Prostanoid: FP,TP,EP ₁ ,EP ₃	
Angiotensin: AT ₁	Purinerge: P _{2U} , P _{2Y}	
Bombesin: BB ₁ , BB ₂	Tachykinin: NK ₁ ,NK ₂ ,NK ₃	
Bradykinin: B ₁ , B ₂	Vasopressin: V _{1A} , V _{1B}	
Cholezystokinin: CCK _A , CCK _B		
Endothelin: ET _A , ET _B		
Glutamate (EAA): mGlu ₁ , mGlu ₅		
HiStamine: H ₁		
5-HT: 5-HT _{2A} , 5-HT _{2B} , 5-HT _{2C}		
Leukotriene: BLT, CysLT ₁		
Melatonin: ML ₂		

Tabelle 1: Die Tabelle ist dem Übersichtsartikel von Y.Yoshida & S. Imai entnommen, Jpn. J. Pharmacol. 74, 125-137 (1997).

Intrazelluläres Ca²⁺ spielt eine bedeutsame Rolle in der Regulation der unterschiedlichsten zellulären Prozesse, wie z.B. Muskelkontraktion, Sekretion, sensorischer Perzeption, Zellproliferation, Zellwachstum und Zelldifferenzierung.

Nach der Art des Zelloberflächenrezeptors, an den der Agonist bindet, werden zwei Wege der Signalübermittlung in die Zelle unterschieden, die zur Phospholipase C (PLC)-vermittelten Hydrolyse des in der Plasmamembran lokalisierten Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphates (PtdIns(4,5)P₂) führen. Aus der Hydrolyse des PtdIns(4,5)P₂ resultiert die Bildung der beiden sekundären Botenstoffe Ins(1,4,5)P₃ und Diacylglycerol (DAG).

Der eine Oberflächenrezeptortyp besitzt sieben membranspannende Helices und ist an seiner zytosolischen Seite an ein heterotrimeres G-Protein gekoppelt, das aus einer α , β und γ -Untereinheit besteht. Die Bindung eines Agonisten (siehe Tab. 1) an diesen Rezeptor führt zum Austausch des an die α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins gebundenen GDP gegen GTP, wodurch es zur Dissoziation des G-Proteins in seine G_α und $G_{\beta\gamma}$ Untereinheit kommt. Die G_α -Untereinheit kann nun an die PLC β binden, was zur deren Aktivierung führt. Der Komplex aus G_α -Untereinheit und PLC β verliert wieder seine aktive Konformation, wenn durch die intrinsische GTPase-Aktivität die Hydrolyse des GTPs hervorgerufen wird. Darauf kommt es durch die Reassoziierung der G_α -Untereinheit mit dem $G_{\beta\gamma}$ -Komplex zur Wiederherstellung des heterotrimeren G-Proteins.

Der andere Oberflächenrezeptortyp besitzt eine zytoplasmatische Tyrosinkinasedomäne. Die Ligandenbindung an diesen Rezeptor (siehe Tab. 1) führt zur Dimerisierung zweier Rezeptormoleküle und dadurch zur gegenseitigen Autophosphorylierung an spezifischen zytoplasmatischen Tyrosinresten, die dadurch Bindungsstellen für die SH2 Domänen der PLC γ bilden und die Aktivierung derselben bewirken [Berridge M.J, 1993].

Von den Produkten der PLC-vermittelten Spaltung des PtdIns(4,5)P₂ verbleibt das fettlösliche DAG in der Plasmamembran, wo es die Proteinkinase C (PKC) aktiviert.

Das wasserlösliche Ins(1,4,5)P₃ diffundiert in das Zytoplasma und bindet dort an intrazelluläre Rezeptoren, die Ins(1,4,5)P₃-Rezeptoren, die an der Oberfläche von intrazellulären Ca²⁺ Speichern lokalisiert sind, wodurch die Freisetzung von Ca²⁺ in das Zytoplasma ausgelöst wird.

Zur Inaktivierung des Ins(1,4,5)P₃-Signals stehen zwei unterschiedliche Stoffwechselwege zur Verfügung.

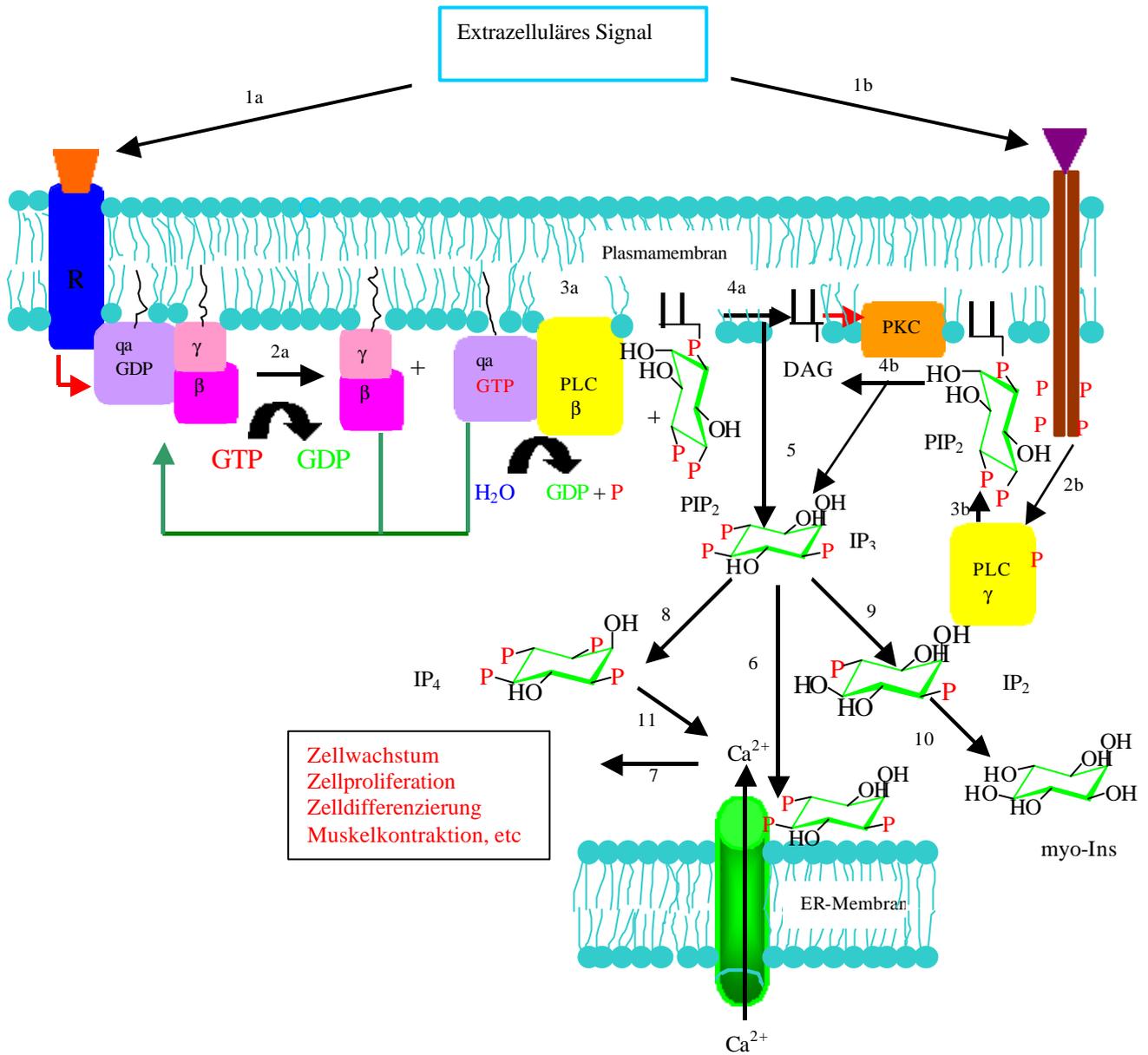
Der eine verläuft über die Dephosphorylierung des Ins(1,4,5)P₃ durch das Enzym Inositolpolyphosphat-5-phosphatase zunächst zum Ins(1,4)P₂. Anschließend erfolgen weitere sukzessive Dephosphorylierungen des Ins(1,4)P₂ an den Positionen 1 und 4, was zur Bildung von myo-Inositol führt. Das myo-Inositol kann dann wieder in die Resynthese der Phosphoinositide einfließen.

Der andere Weg führt über die Phosphorylierung des Ins(1,4,5)P₃ unter ATP-Verbrauch zum Ins(1,3,4,5)P₄ durch das Enzym Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase [Berridge M.J, Irvine R.F., 1989].

Die Bildung des $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ durch die $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase bedeutet nicht nur die Beendigung des $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Signals, sondern zugleich die Bildung eines weiteren potentiellen sekundären Botenstoffs. Allerdings wird der Einfluß von $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ auf die Ca^{2+} -Homeostase durch die Regulation von Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle [Changya L. et al., 1989; Irvine R.F., 1990; Soriano S., Banting G., 1997; Soriano S. et al., 1997] zur Zeit noch kontrovers diskutiert [Balla et al., 1991; Da Silva C.P. et al., 1994]. Im Gegensatz dazu ist die Bedeutung des $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ als ein zentrales Vorstufenmolekül für die höher phosphorylierten Inositolphosphate allgemein anerkannt [Shears S.B., 1998].

Abb.1: Schematische Darstellung des rezeptorstimulierten $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ –Signalwegs:

Die Schritte 1a - 4a zeigen die $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ Bildung über die G-Protein vermittelte Aktivierung der PLC β , die Schritte 1b - 4b zeigen den alternativen über Tyrosinkinasen vermittelten Aktivierungsweg der PLC γ . Die Schritte 5 - 10 zeigen die gemeinsame Endstrecke des $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Signals (siehe Text). Pfeil 11 deutet die potentiell verstärkende Wirkung des $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ auf die Ca^{2+} -Freisetzung an. Der vom G-Protein gekoppelten Rezeptor ausgehende rote Pfeil deutet dessen Stimulierung auf den GProtein-GDP-Komplex zum Austausch von GDP gegen GTP an, nachdem es zu einer Hormonbindung gekommen ist. Der grüne Doppelpfeil zeigt die Reassoziierung der G_α -Untereinheit, nach der Hydrolyse des GTPs, mit der $G_\beta\gamma$ Untereinheit zur inaktiven Form des GProteins an. Der vom DAG ausgehende rote Pfeil deutet dessen aktivierende Wirkung auf die PKC an. Die P symbolisieren Phosphatgruppen.



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

Als intrazelluläre Ins(1,4,5)P₃-Rezeptoren konnten glykosylierte Proteine mit Molekulargewichten zwischen 220-260 kDa aus dem Cerebellum, glatter Muskulatur und Thrombozyten aufgereinigt werden. Sie bilden einen tetrameren Ca²⁺-Kanal im Endoplasmatischen Reticulum. In Säugetieren konnten drei Ins(1,4,5)P₃-Rezeptortypen gefunden werden, die von unterschiedlichen Genen kodiert werden und als Typ 1, Typ 2 und Typ 3 bezeichnet werden. Zusätzlich konnten vom Typ 1 zwei alternative Splicevarianten identifiziert werden [Yoshida Y., Imai S., 1997].

Die Rezeptoruntereinheiten können jeweils in drei funktionelle Domänen unterteilt werden. Man unterscheidet eine N-terminale Domäne zur Ligandenbindung und eine modulatorische Domäne in der Mitte des Moleküls, welche beide im zytoplasmatischen Bereich der Untereinheit liegen, sowie eine C-terminal liegende Domäne, die den Ca²⁺-Kanal bildet. In der mittleren modulatorischen Domäne zeigen die drei Untereinheiten die geringste Identität von nur 53% zueinander, während sie in der Ligandenbindungsdomäne eine Identität von 68% und in der Ca²⁺-Kanal-Domäne eine Identität von 59% aufweisen [Yoshida Y., Imai S., 1997].

Die mittlere Domäne dient zum einen als Ziel für regulatorische Signale, die modulierend auf die durch die Ins(1,4,5)P₃-Bindung ausgelöste Ca²⁺-Freisetzung einwirken. Inzwischen wurden potentielle Bindungsstellen für unterschiedliche Modulatoren in der mittleren Domäne identifiziert, wie z.B. für ATP, Ca²⁺, Calmodulin sowie Phosphorylierungsstellen für verschiedene Proteinkinasen. Durch die mittlere Domäne wird die komplexe Regulation der Ins(1,4,5)P₃-induzierten Ca²⁺-Freisetzung ermöglicht.

Zum anderen dient die mittlere Domäne zur generellen Übermittlung des Ins(1,4,5)P₃ Bindungssignals an die Ca²⁺-Kanäle. Die geringe Identität in dieser Domäne zwischen den drei Untereinheiten macht eine differenzierte Regulation in der Ins(1,4,5)P₃ stimulierten Ca²⁺-Freisetzung möglich [Yoshida Y., Imai S., 1997].

Für die Expression der drei Untereinheiten ließ sich eine Abhängigkeit zu bestimmten Zell- und Gewebetypen nachweisen.

Subzellulär fanden sich die Ins(1,4,5)P₃-Rezeptoren vor allem am glatten Endoplasmatischen Retikulum (ER), aber auch am rauhen ER und an der äußeren Kernmembran.

Die Ligandenbindung bewirkt eine Tetramerisierung der Untereinheiten, wodurch der Ca^{2+} -Kanal gebildet wird und Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern freigesetzt werden kann. Neben der Homotetramerbildung soll auch eine Heterotetramerbildung möglich sein, die eine weitere funktionelle Diversifizierung ermöglichen könnte [Yoshida Y., Imai S., 1997].

1.3. Die verschiedenen Isoformen der Inositol (1,4,5) P_3 3-Kinase

Die Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase konnte aus Rattenhirn [Johanson R.A. et al., 1988; Lee S.Y. et al., 1990; Takazawa K. et al., 1990 a], aus Rinderhirn [Takazawa K. et al., 1989], aus glatter Muskulatur der Schweineaorta [Yamaguchi K. et al., 1988] sowie aus menschlichen Thrombozyten [Communi D. et al., 1994] aufgereinigt werden.

Inzwischen ist es gelungen, zwei unterschiedliche cDNS-Klone von Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase Isoformen aus einer humanen Hippocampus cDNS-Bank, welche als Isoform A [Takazawa K. et al., 1991 a] und B [Takazawa K. et al., 1991 b] bezeichnet werden, sowie die korrespondierenden Isoformen A aus einer Rattenhirn- [Choi K.Y. et al., 1990; Takazawa K. et al., 1990 b] und B [Thomas B. et al., 1994] aus einer Rattenleber cDNS-Bank zu isolieren und zu klonieren.

Die cDNS der Isoform A aus Mensch und Ratte sind vollständig kloniert und besitzen eine kodierende Sequenzlänge von 1383 Bp bzw. 1371 Bp, die jeweils für Proteine mit 461 bzw. 459 Aminosäuren kodieren und ein Molekulargewicht von ca. 51 kDa aufweisen.

Die Isoform B aus Mensch und Ratte muß nach neuesten, noch nicht publizierten Ergebnissen [Bertsch U. et al.] als nicht vollständig kloniert angesehen werden, obwohl dies bisher zumindest für die Isoform B der Ratte angenommen wurde [Thomas B. et al., 1994]. Die zur Zeit vorliegenden kodierenden cDNS-Sequenzen besitzen eine Länge von 1725 Bp (Mensch) bzw. 2019 Bp (Ratte) und kodieren für Proteine aus 575 bzw. 673 Aminosäuren. Das Molekulargewicht für die humane Isoform B wird mit mindestens 65 kDa [Vanweyenberg V. et al., 1995] angegeben, das der Ratte mit 75 kDa [Thomas B. et al., 1994].

Des Weiteren liegen bisher noch unveröffentlichte Ergebnisse über einen partiellen cDNS-Klon vor, der aus menschlicher Schilddrüse bzw. Placenta-RNS kloniert wurde und für eine dritte humane Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase Isoform kodieren soll, die als

C-Isoform bezeichnet wird und mindestens 67 kDa groß sein soll [Takazawa K. et al.]. Eventuell könnte es sich hierbei um das aus humanen Thrombozyten aufgereinigte Protein handeln, welches ein Molekulargewicht zwischen 69-70 kDa besitzt und weder durch spezifische Antikörper gegen die Isoform A noch durch Antikörper gegen die Isoform B immunpräzipitiert werden konnte [Communi D. et al., 1994].

Aus dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* konnte eine Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase isoliert und kloniert werden, die in drei Splicevarianten auftritt. Die katalytische Domäne der drei Splicevarianten wird von demselben Exon kodiert. Der N-terminale Bereich des Proteins hingegen wird durch unterschiedliche Exons kodiert [Clandinin et al., 1998].

Die Analyse der 5'-Enden der cDNS-Sequenzen der Isoform B aus Mensch und Ratte zeigt eine Identität von 65%. Im Vergleich hierzu weisen die 5'-Enden der Isoform A aus Mensch und Ratte eine Identität von 87% auf.

Zwischen der Isoform A aus humanem Hippocampus und Rattenhirn konnte eine Identität in der Aminosäuresequenz von 93% nachgewiesen werden, während die beiden unterschiedlichen Isoformen A und B nur im C-terminalen Bereich höhere Sequenzidentitäten aufweisen, nämlich von der Aminosäure 122-150 66%ige Identität und von 187- 462 68%ige Identität (die Numerierung der AS bezieht sich auf die A-Isoform) [Takazawa K. et al., 1991 a; Takazawa K. et al., 1990 b].

Im N-terminalen Bereich waren zwischen den Isoformen nur geringe Sequenzidentitäten festzustellen, was auch an der unterschiedlichen Größe des N-Terminus liegt .

Durch Northernblot-Untersuchungen mit jeweils spezifischen Sonden für die Isoformen A und B der Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase konnte für diese eine gewebe - und zellspezifische Expression in Mensch und Ratte nachgewiesen werden. Für die Isoform A konnte nur im Gehirn und Hoden der Ratte ein Signal bei 2 bzw. 1,8-2 kB detektiert werden, während für die Isoform B im Gehirn, Hoden, Thymus, Herz und Lunge der Ratte bei 6 kB sowie in humanen haematopoetischen Zellen und Lymphomzellen Signale gefunden werden konnten [Vanweyenberg V. et al., 1995].

1.4. Funktionelle Reste und Regulationsmechanismen der Inositol (1,4,5)P₃ 3-Kinase sowie mögliche Folgen bei Störungen der Regulationsmechanismen

Neben den divergierenden Molekülgrößen, den Unterschieden in der Nukleotid - bzw. Aminosäuresequenz sowie den verschiedenen gewebespezifischen Expressionsmustern der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase Isoformen A und B konnten auch Unterschiede in der Regulation der Enzymaktivität festgestellt werden.

Durch rekombinante Expression der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase und Deletionsmutagenese konnten inzwischen Einblicke in die funktionelle Bedeutung zweier Domänen der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase gewonnen werden. So konnte gezeigt werden, daß maximal 275 Aminosäuren am C-terminalen Ende der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase ausreichend sind, um eine funktionsfähige katalytische Domäne zu bilden.

Innerhalb dieser katalytischen Domäne konnte ein Sequenzbereich von 201 Aminosäuren von L259-R459 als mögliche Ins(1,4,5)P₃-Bindungsdomäne identifiziert werden, in dem eine Mutation von K262A in der Sequenz D₂₆₀CK₂₆₂, die in den beiden Isoformen A und B vorkommt, zu einem Verlust der Ins(1,4,5)P₃-Bindung führt.

Weiterhin konnte dargestellt werden, daß eine Verkürzung des Proteins zwischen S185 und I205 mit dem Verlust der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinaseaktivität verbunden ist [Togashi S. *et al.*, 1997]. Die Begründung für den Verlust der Kinaseaktivität durch die Deletion des Sequenzabschnittes von S185 und I205 wird durch Beobachtungen aus früheren Studien geliefert, in denen erkannt wurde, daß K197 für die ATP/Mg²⁺-Bindung notwendig ist [Communi D. *et al.*, 1993]. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß der Verlust dieser ATP/Mg²⁺-Bindungsstelle keinen Einfluß auf die Ins(1,4,5)P₃-Bindung ausübt, wodurch deutlich wird, daß die ATP/Mg²⁺-Bindungsstelle separat von der Ins(1,4,5)P₃-Bindungsstelle ist und ihre Deletion keine Veränderung der Tertiärstruktur hervorruft, die eine Ins(1,4,5)P₃-Bindung verhindern würde. Als zusätzliche ATP/Mg²⁺-Bindungsstellen wurden R317 und D414 identifiziert [Togashi S. *et al.*, 1997].

Die von der katalytischen Domäne N-terminal liegende Sequenz von S156-L189 konnte als Calmodulinbindungsdomäne identifiziert werden [Takazawa K. *et al.*, 1991]. Innerhalb dieses Sequenzbereiches stellte sich W165 als entscheidend für die Aktivierung durch Ca²⁺/Calmodulin heraus [Erneux C. *et al.*, 1993].

Deutliche Unterschiede zwischen den Isoformen der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase konnten in der Aktivierung durch Ca²⁺/CaM festgestellt werden. So führte Ca²⁺/CaM bei der

Isoform A nur zu einer Steigerung der Aktivität um das 2-2,5fache [Takazawa K. et al., 1990 b, Shin Y.S. et al., 1995], während die Isoform B eine Aktivitätssteigerung auf das 5-10fache zeigte [Takazawa K. et al., 1991 b] und die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase aus humanen Thrombozyten sogar eine 17fache Stimulierung erfuhr [Communi D. et al., 1994]. In vitro Phosphorylierungsexperimente mit den Proteinkinasen A und C (PKA und PKC) sowie mit der CaM-Kinase II zeigten folgende Ergebnisse: Die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase Isoform A erfuhr durch die Phosphorylierung mit PKA eine 1,8fache Aktivierung. Die Isoform B wurde dagegen um 45% inhibiert. Phosphorylierungen durch die PKC reduzierten die Aktivität von Isoform A und B auf ca. ein Viertel der Ausgangsaktivität [Sim S.S. et al., 1990]. Die Phosphorylierung der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A durch die CaM-Kinase II innerhalb der katalytischen Domäne (T311) bewirkt eine 8-10fache Steigerung der Enzymaktivität sowie eine 25fache Zunahme CaM-Sensitivität [Communi D. et al., 1997].

Über die funktionelle Bedeutung des N-Terminus der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase ist bisher wenig bekannt, wengleich es Vermutungen über eine eventuelle autoinhibitorische Funktion des N-Terminus der Isoform B gibt [Thomas S. et al., 1996].

Weitere sehr interessante Beobachtungen in der Regulation der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase konnten in Rattenfibroblasten gemacht werden, die mit dem Oncogen v-src transformiert worden waren, wodurch es aufgrund vermehrter Expression der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase Isoform A zu einer 6-8fachen Steigerung ihrer Aktivität kam, während die Isoform B nicht signifikant vermehrt exprimiert wurde [Johnson R.M. et al., 1989; Woodring P.J., Garrison J.C., 1996]. Die physiologische Bedeutung der gesteigerten Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase-Aktivität und der damit verbundenen Erhöhung der Ins(1,3,4,5)P₄-Spiegel scheint im direkten Zusammenhang mit Zellwachstum, Zellproliferation und Zelltransformation zu stehen. So konnte beobachtet werden, daß die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase-Aktivität im Gehirn der Ratte durch erhöhte Enzymsynthese während der Entwicklung vom Fetus zum adulten Tier um den Faktor 14 gesteigert wird [Moon K.H. et al., 1989].

Auf der anderen Seite zeigten Studien über die Wirkung von Adriamycin, einem Zytostatikum, auf stimulierte Jurkat T-Lymphozyten, daß die Verminderung der Zelldichte sowie die Abnahme der DNS-Synthese mit der Hemmung der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase-Aktivität und mit einer Aktivierung der Inositol (1,3,4,5)P₄ 5-Phosphatase und

dadurch verminderten Ins(1,3,4,5)P₄ -Spiegeln zu korrelieren scheinen [Da Silva C.P. et al., 1994].

In Experimenten mit Zellen aus Rattennieren, in denen die Inositolpolyphosphat 5-Phosphatase (Typ I) unterexpressiert wurde, kam es in diesen Zellen zu einer Konzentrationserhöhung von Ins(1,4,5)P₃ und Ins(1,3,4,5)P₄ um den Faktor 2 bzw. 4. Dieses führte zu einer 1,9fachen Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration sowie zu einer 1,7fachen Beschleunigung des Zellwachstums mit einer vermehrten DNS-Synthese. Durch die Injektion dieser Zellen in Nacktmäuse konnte an der Injektionsstelle ein Tumorwachstum induziert werden [Speed C.J. et al., 1996]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, daß einige humane myeloische Leukämieformen mit einer Verminderung der Inositolpolyphosphat 5-Phosphataseaktivität (Typ I) assoziiert sind [Nye K. et al., 1992; Mengbas K. et al., 1994]. Die Verminderung der Aktivität der Inositolpolyphosphat 5-Phosphatase bei diesen Leukämien ist jedoch nicht mit einer Abnormalität des Chromosoms 10q23.6 verbunden, auf dem sich der Genort für das Enzym befindet.

Eine weitere Inositol 5-Phosphatase, die hauptsächlich in haematopoetischen Zellen exprimiert wird und als SHIP bezeichnet wird, dephosphoryliert selektiv Ins(1,3,4,5)P₄ und das Phosphatidylinositol(3,4,5)P₃ (PtdIns(3,4,5)P₃) [Damen J.E. et al., 1996]. Letzteres ist ein Produkt der Phosphatidylinositol 3-Kinase, die durch die Stimulierung von Wachstumsfaktoren aktiviert wird und als ein wichtiges mitogenes Signal gilt. Die Abwesenheit des SHIP-Gens in „Knockout-Mäusen“ führte zu einem myeloproliferations- ähnlichen Syndrom, das auf der einen Seite mit einer Vermehrung von Granulozyten- und Makrophagenvorläufern in dem Knochenmark und der Milz assoziiert war, auf der anderen Seite zu einer Abnahme der lymphoiden und später der erythroiden Vorläuferzellen im Knochenmark führte. Weiterhin konnte in diesen Mäusen eine ausgeprägte Konsolidierung der Lungen mit Makrophageninfiltraten beobachtet werden, wodurch es zu einer deutlichen Verkürzung der Lebensdauer kam [Helgasson C.D. et al., 1998].

Die einzige bisher bekannte Erkrankung, die mit einem Gendefekt der Polyphosphat 5-Phosphatase verbunden ist, ist das X-chromosomal vererbte Lowe-Syndrom, welches mit einer Dysfunktion der proximalen Nierentubuli, einem kongenitalen Katarakt, Wachstumsstörungen und mentaler Retardierung einhergeht [Lowe C.V. et al., 1952; Attree O. et al. 1992]. Allerdings ist bei dieser Störung die Typ II Polyphosphat 5-

Phosphatase betroffen, welche hauptsächlich das Phosphatidylinositol (4,5)P₂ dephosphoryliert, und nicht Ins(1,4,5)P₃ oder Ins(1,3,4,5)P₄ [Zang X.L. *et al.*, 1995].

Die oben aufgeführten Beobachtungen verdeutlichen die komplexen Regulationsmechanismen der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase sowie die Involvierung des Reaktionsproduktes Ins(1,3,4,5)P₄ in bedeutsame intrazelluläre Prozesse. Diese Erkenntnisse weisen daraufhin, daß die Ins(1,3,4,5)P₄-Bildung nicht nur die Abschaltung des Ins(1,4,5)P₃-Signals und die Verbindung zu den höher phosphorylierten Inositolen bedeutet, sondern auch die Bildung eines weiteren intrazellulären Signalmoleküls darstellt.

1.5. Inositol (1,3,4,5)P₄-bindende Proteine

Um die Bedeutung des Inositol(1,3,4,5)P₄ als weiteren intrazellulären Signalbotenstoff zu belegen, muß ein intrazelluläres Protein gefunden werden, das spezifisch dieses InsP₄-Isomer bindet und somit als dessen Rezeptor dient.

Tatsächlich konnten in den letzten Jahren verschiedene Proteine gefunden werden, die Ins(1,3,4,5)P₄ binden, allerdings ist ihre Spezifität für Ins(1,3,4,5)P₄ relativ gering, da sie das höher phosphorylierte Inositol InsP₆ mit z.T. größerer Affinität binden. Zu diesen Proteinen gehören unter anderem Synaptotagmin [Niinobe M. *et al.*, 1994; Fukuda M. *et al.*, 1995], die Clathrin „Assembly Proteine“ AP-2 [Vogelmaier S.M. *et al.*, 1992; Timerman A.P. *et al.*, 1992] und AP-3 [Norris F.A. *et al.*, 1995] sowie das Golgi Coatomer Protein [Fleischer B. *et al.*, 1994].

Des weiteren konnten zwei Ins(1,3,4,5)P₄-bindende Proteinfractionen aus Rattenhirn isoliert werden, wovon eine aus einem singulären Protein mit einem Molekulargewicht von 182 kDa besteht und einen K_d-Wert für Ins(1,3,4,5)P₄ von 4 nM aufweist, während die andere sich aus zwei Proteinen mit Molekulargewichten von 174 kDa und 84 kDa zusammensetzt, die jeweils eine Affinität von 1,5 nM für Ins(1,3,4,5)P₄ aufweisen [Theibert A.B. *et al.*, 1992; Köppler P. *et al.*, 1996].

Aus dem Nukleus von Leberzellen der Ratte konnte ein 74 kDa großes nukleäres Protein mit hoher Affinität zu Ins(1,3,4,5)P₄ (K_d 18,6 nM) isoliert werden [Reiser G. *et al.*, 1991]. Allerdings wurde dieses Protein noch nicht hinsichtlich seiner Spezifität zu PtdIns(3,4,5)P₃ untersucht, so daß zur Zeit noch keine endgültigen Aussagen über den physiologischen Bindungspartner gemacht werden können.

Die strukturelle Ähnlichkeit von $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ und $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ liegt darin begründet, daß $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ mit der Inositolkopfgruppe des $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ identisch ist. Der Unterschied zwischen den beiden Substanzen ist, daß im $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ die 1-Phosphatgruppe frei ist, während sie im $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ über Glycerol mit zwei Fettsäuren verbunden ist.

Ein weiteres $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -bindendes Protein mit einem Molekulargewicht von 42 kDa konnte aus Schweinehirn aufgereinigt [Donie F., Reiser G., 1991; Reiser et al., 1991] und kloniert werden [Stricker R. et al., 1997]. Dieses Protein besitzt eine Primärstruktur von 374 AS und wird als p42^{IP_4} bezeichnet. Es kann in einer membranassoziierten und in einer löslichen, zytosolischen Form vorliegen. Interessanterweise zeigt es annähernd gleiche Affinitäten zu $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ und zu dem in der Plasmamembran lokalisierten Phosphatidylinositol(3,4,5) P_3 ($\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$) (K_i 0,9 nM und K_i 1,6 nM).

Das p42^{IP_4} könnte somit durch seine sehr ähnliche Affinität zu $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ und $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ eine Verbindung zwischen dem Inositolphosphat - und dem Phosphatidylinositolphosphat-Signalweg darstellen.

Das p42^{IP_4} zeigt in der Proteinsequenz eine 84%ige Homologie mit dem aus Rattenhirn isolierten und klonierten 46 kDa großen Protein Centaurin- α , wobei Centaurin- α 45 Aminosäuren länger ist als p42^{IP_4} .

Centaurin- α bindet ebenfalls $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ und $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$, allerdings ist hier die Affinität zu $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ deutlich stärker als zu $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$, so daß Centaurin- α in vivo als spezifisches $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ -Rezeptorprotein betrachtet wird [Hammonds-Odie L.P. et al., 1996].

Das $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ wird durch die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI 3-Kinase) aus $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ gebildet und anschließend zu $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ dephosphoryliert. Die PI 3-Kinase wird über die Rezeptorbindung verschiedener Liganden, wie z.B. dem Nerve Groth Factor (NGF) [Ui M. et al., 1995], Platelet Derived Groth Factor (PDGF) [Wennström S. et al., 1994] und Insulin [Alessi D.R. et al., 1998] aktiviert. Sowohl $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ als auch $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ fungieren ebenfalls als sekundäre Botenstoffe, die in ruhenden Zellen nicht vorhanden sind [Stephens L.R. et al., 1993]. Ihre Funktion als in der Plasmamembran lokalisierte Signalmoleküle üben $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ und $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ durch Interaktionen mit bestimmten Proteindomänen aus, die inzwischen in einer Vielzahl von Proteinen identifiziert werden konnten und die aufgrund ihrer Homologie zu Pleckstrin als PH-Domänen bezeichnet werden.

Die PH-Domänen sind Proteinsequenzbereiche, über die Proteine entweder Bindungen zu den in der Plasmamembran lokalisierten Phosphoinositiden oder zu den jeweils korrespondierenden löslichen Inositolphosphaten eingehen können.

So konkurrieren z.B. PtdIns(4,5)P₂ und Ins(1,4,5)P₃ um die PH-Bindungsdomäne der Phospholipase C- δ_1 (PLC δ_1), wodurch es entweder zur Aktivierung bei der Bindung von PtdIns(4,5)P₂, oder zur Inaktivierung der PLC δ_1 bei der Bindung von Ins(1,4,5)P₃ kommen soll. Die Regulation der PLC δ_1 über ihre PH-Domäne könnte somit einen wirkungsvollen Rückkopplungsmechanismus darstellen, der vor einer exzessiven Hydrolyse des PtdIns(4,5)P₂ schützen würde [Cifuentes M.E. et al., 1994] .

Als Ursache der aktivierenden Wirkung auf Proteine bzw. Enzyme durch die PH-Domänen-vermittelte Bindung an die in der Plasmamembran lokalisierten Phosphatidylinositole (PtdIns) existieren verschiedene Erklärungsmodelle.

Die Bindung an die PtdIns bringt die Proteine bzw. Enzyme in die Nähe der Plasmamembran und somit in die Nachbarschaft von rezeptorgekoppelten Tyrosinkinase, durch die sie aktiviert werden können. Auch könnten die Interaktionen zwischen PtdIns und Proteinen eine Konformationsänderung der Proteine hervorrufen, wodurch der Zugang von Proteinkinase an ihre Phosphorylierungsstellen ermöglicht würde, was zur Aktivierung der Proteine führen könnte. Ein weiterer Mechanismus wäre die, durch die Bindung an die PtdIns bewirkte Co-Lokalisierung sich gegenseitig beeinflussender Proteine an die Plasmamembran.

Die strukturelle Ähnlichkeit von Ins(1,3,4,5)P₄ zu PtdIns(3,4,5)P₃ und Ins(1,4,5)P₃ zu PtdIns(4,5)P₂ führt zur Konkurrenz um die Bindung an die entsprechende PH-Domäne eines Proteins, welche einen physiologischen Regulationsmechanismus darzustellen scheint [Bottomley M.J. et al., 1998].

Das bisher einzige Protein, das zur Zeit alle Kriterien eines spezifischen Ins(1,3,4,5)P₄ Rezeptors erfüllt, ist ein 104 kDa großes Protein, welches zunächst aus Schweinethrombozyten isoliert wurde. Dieses Protein besitzt die bevorzugte Bindung des Ins(1,3,4,5)P₄ Isomers vor allen anderen InsP₄ Isomeren, Inositolphosphaten und PtdIns(3,4,5)P₃ [Cullen P.J., Dawson A.P. et al., 1995; Cullen P.J., Chung S.-K. et al., 1995]. Inzwischen gelang die Klonierung und Charakterisierung dieses Proteins aus humanem Blut, wobei sich herausstellte, daß es sich hierbei um ein GTPase-aktivierendes Protein (GAP) handelt. Es zeigt eine 60%ige Sequenzähnlichkeit zu GAP1 aus Drosophila und eine 72%ige Ähnlichkeit zu GAP1^m aus Rattenhirn und wird

daher als ein Mitglied der GAP1 und GAP1^m-Familie betrachtet. Aufgrund der beiden Eigenschaften, der spezifischen Ins(1,3,4,5)P₄-Bindung und der GTPase-aktivierenden Wirkung, wird dieses Protein als GAP^{IP4BP} bezeichnet. GAP^{IP4BP} besitzt in vitro GAP-Aktivität gegenüber Ras und Rap. Ein Hinweis, daß Ras der physiologische Reaktionspartner von GAP^{IP4BP} ist, wird durch die Inhibierung der GAP-Aktivität von GAP^{IP4BP} auf Ras in der Gegenwart von Liposomen angedeutet, die eine ähnliche Phospholipidzusammensetzung wie die Oberfläche der inneren Plasmamembran besitzen, während die GAP-Aktivität auf Rap unbeeinflusst bleibt. Die Inhibierung der GAP-Aktivität von GAP^{IP4BP} auf Ras konnte durch das Hinzufügen von Ins(1,3,4,5)P₄ und dessen Bindung an GAP^{IP4BP} wieder rückgängig gemacht werden. Hierdurch wird eine Verbindung zwischen dem durch die Phospholipase C initiierten Inositolphosphatignalweg und der über Ras laufenden mitogen-aktivierten Kaskade hergestellt [Cullen P.J, Hsuan J.J. et al., 1995]. Für die spezifische Bindung von Ins(1,3,4,5)P₄ an GAP^{IP4BP} und vermutlich auch für die Bindung an die Plasmamembran bzw. an das PtdIns(3,4,5)P₃ ist wiederum die PH/Btk-Domäne verantwortlich. So wird durch die Bindung von Ins(1,3,4,5)P₄ bzw. PtdIns(3,4,5)P₃ an die PH/Btk-Domäne des GAP^{IP4BP} wahrscheinlich eine Konformationsänderung von GAP^{IP4BP} bewirkt, die entweder zur Aktivierung oder zur Inaktivierung der GAP-Aktivität auf Ras führt [Cullen P.J., 1998] .

Durch die Entdeckung von GAP^{IP4BP} als spezifischen Ins(1,3,4,5)P₄-Rezeptor wird die Rolle des Ins(1,3,4,5)P₄ als weiteres wichtiges intrazelluläres Signalmolekül belegt, wodurch zugleich die Bedeutung der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase unterstrichen wird.

1.6. Die Bedeutung der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase bei der Bildung von Ins(3,4,5,6)P₄ und den höher phosphorylierten Inositolphosphaten

Die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase initiiert den Stoffwechselweg, der über die Bildung von Ins(1,3,4,5)P₄ und dessen anschließende Dephosphorylierung durch eine 5-Phosphatase in der Bildung von Ins(1,3,4)P₃ mündet. Das Ins(1,3,4)P₃ kann dann wieder durch die Ins(1,3,4)P₃ 6-Kinase phosphoryliert werden und stellt somit das Bindeglied zu den höher phosphorylierten Inositolphosphaten her.

Alternativ kann das $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ durch sukzessive Dephosphorylierungen zum myo-Inositol abgebaut werden und wieder in die Resynthese der Phosphoinositide einfließen.

Inzwischen konnte gezeigt werden, daß $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ zusätzlich einen potenten, spezifischen und kompetitiven Inhibitor der $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ 1-Kinase darstellt, der die Umwandlung von $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ in $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ blockiert [Tan Z. et al., 1997].

Die Bedeutung des $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ als intrazelluläres Signalmolekül liegt in der isomerspezifischen Fähigkeit, die Chloridsekretion über Ca^{2+} -abhängige Chloridkanäle zu unterbinden, ohne einen negativen Einfluß auf die durch die Phospholipase C initiierte Calciummobilisation zu haben. Hierdurch besitzt die Phospholipase C zugleich einen positiven und negativen Einfluß auf die Aktivität der Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Ionenkanäle. Initial bewirkt sie eine Stimulierung der Cl^- -Kanalaktivität durch Ca^{2+} -Mobilisation aus intrazellulären Speichern, gefolgt von einer Verminderung der Aktivität durch Erhöhung der $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ Konzentration über eine kompetitive Hemmung der $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ 1-Kinase durch $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$. Die direkte Inhibierung des Ca^{2+} -abhängigen Chloridstromes durch $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ konnte in T84 Colonepithelzellen [Xie W. et al., 1996], in klonierten Ca^{2+} -abhängigen Chloridkanälen aus Rindertrachea [Ismailov I.I et al., 1996] sowie in CFPAC-1 Zellen, einer Nebennierenkarzinomzelllinie, in der die cAMP abhängigen Chloridkanäle defekt sind [Ho M.W.Y. et al., 1997], gezeigt werden. Die wahrscheinliche physiologische Bedeutung von $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ scheint daher in der Kontrolle des transzellulären Cl^- -Stromes und der damit verbundenen Beteiligung an der Regulation von Wasser- und Elektrolythaushalt, pH-Gleichgewicht, Osmoregulation sowie kardialer Funktionen zu liegen.

Von besonderer Bedeutung ist die Erkenntnis über die Funktion von $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ in bezug auf die autosomal-rezessive Erbkrankheit Mukoviszidose, welche die häufigste angeborene Stoffwechselerkrankung Europas ist und zur Ausbildung von defekten Chloridkanälen (CFTR-Protein) in allen exokrinen Drüsen führt. Hierdurch wird die Bildung eines abnorm zähen Schleimsekretes verursacht.

Die Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Kanäle sind bei dieser Erkrankung allerdings nicht betroffen und könnten somit einen potentiellen Ansatzpunkt für eine pharmakologische Therapie darstellen, indem man die durch Phospholipase C initiierte Ca^{2+} -Freisetzung aktiviert, die Bildung oder Wirkung von $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ aber verhindert und somit die Chloridsekretion fördert. Dieses wäre entweder durch die Entwicklung eines

Ins(3,4,5,6)P₄-Antagonisten oder durch Inhibierung der 1-Phosphatase möglich, die Ins(1,3,4,5,6)P₅ zu Ins(3,4,5,6)P₄ dephosphoryliert [Shears S.B., 1998].

Die Existenz der höher phosphorylierten Inositole hielt man lange Zeit für auf pflanzliche Zellen beschränkt. Die einzigen Ausnahmen aus dem Tierreich, in denen ebenfalls höher phosphorylierte Inositole gefunden wurden, waren neben einigen Schildkrötenarten, eine luftatmende Amazonasfischart sowie die kernhaltigen Erythrozyten der Vögel. In diesen Spezien dient das Ins(1,3,4,5,6)P₅, analog dem 2,3-Bisphosphoglycerat in Säugererythrozyten, der Modulation der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins [Isaacks R.E., Harhness D.R., 1980; Mayr G.W., Dietrich W., 1987]. Inzwischen ist das Vorkommen der höher phosphorylierten Inositolphosphate InsP₅ und InsP₆ auch in zahl- reichen Säugerzellen nachgewiesen worden, und zwar in Konzentrationen, welche die übrigen Inositolphosphate zumeist übersteigen [Mayr G.W., Thieleczek R., 1991; Mc Connell F.M. et al., 1991] . Neben dem Ins(1,3,4,5,6)P₅ existieren noch weitere InsP₅ Isomere, allerdings ist offenbar nur das Ins(1,3,4,5,6)P₅ das direkte Vorläufermolekül des InsP₆, während die anderen InsP₅ Isomere nur Dephosphorylierungsprodukte des InsP₆ sind [Shears S.B., 1998].

Die genaue Bedeutung und Funktion der hochphosphorylierten Inositolphosphate ist noch nicht eindeutig geklärt. Die Idee, daß auch InsP₆ ein intrazelluläres Signalmolekül sein könnte, wird zur Zeit noch kontrovers diskutiert.

Eine wichtige Voraussetzung für die Funktion als Signalstoff, nämlich die schnelle und deutliche Änderung der intrazellulären Konzentration von InsP₆ aufgrund extrazellulärer Stimuli, konnte bisher noch nicht eindeutig gezeigt werden. Dies könnte daran liegen, daß durch extrazelluläre Agonisten weniger die totale zelluläre InsP₆-Konzentration als vielmehr die freie zytosolische Konzentration verändert wird, was durch eine Umverteilung von an zelluläre Membranen gebundenen InsP₆ in das Zytoplasma erklärt werden könnte [Shears S.B., 1998].

Eine mögliche physiologische Rolle als Signalmolekül konnte für InsP₆ in den Insulin sekretorischen β -Zellen nachgewiesen werden, in denen es nach Glukoseexposition zu einem Anstieg der InsP₆-Konzentration kam. InsP₆ inhibierte in diesen Zellen verschiedene Serin/Threonin Protein Phosphatasen, was zu einer gesteigerten Aktivität der L-Typ Ca²⁺-Kanäle und dadurch zur Insulinsekretion führte [Larson O. et al., 1997].

Andere Versuche, die zu der Klärung der physiologischen Bedeutung von InsP₆ beitragen sollten, führten zur Isolierung und Charakterisierung von einigen Proteinen, die InsP₆ bevorzugt binden. Hierzu gehören Vinculin, ein Bestandteil des Zytoskelettes von Thrombozyten [O'Rourke F. et al., 1996], und das Coatomer-Protein I (COP I), welches den Vesikelverkehr zwischen dem ER und dem Golgiapparat reguliert [Fleischer B. et al., 1994; Ali N. et al., 1995; Chaudhary A. et al., 1998]. Weitere Proteine, die InsP₆ binden, gehören in die Synaptotagmin-Familie und bilden einen Bestandteil des Vesikelkomplexes der Synapsen (Typ I) und unterstützen dort die Exozytose [Fukuda M. et al., 1995; Südhof T.C., 1995]. InsP₆ konkurriert hier um dieselbe Ligandenbindungsstelle mit PtdIns(4,5)P₂. Die Bindung von Synaptotagmin an den in der Plasmamembran lokalisierten PtdIns(4,5)P₂ könnte das Andocken von Vesikeln an der Plasmamembran ermöglichen und dadurch die Exozytose der Vesikel begünstigen. Durch die Konkurrenz mit InsP₆ könnte dieser Vorgang antagonisiert werden [Schiavo G. et al., 1996].

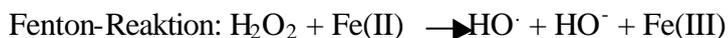
Auch könnte die Bindung von InsP₆ an die beiden Proteinen AP-2 [Vogelmaier S.M. et al., 1992; Timerman A.P. et al., 1992] und AP-3 [Norris F.A. et al., 1996; Ye W., 1995] von physiologischer Bedeutung sein. Beide Proteine fördern die Polymerisation von Clathrin als einen frühen Schritt in der Endozytose. Durch die Bindung von InsP₆ an diese Proteine wird dieser Schritt unterbunden. Dies könnte auf einen generellen Antagonismus von InsP₆ auf den Endozytose Vesikelverkehr hindeuten [Shears S.B. et al., 1996].

Trotz dieser vielfältigen Hinweise auf mögliche kurzfristige physiologische Funktionen von InsP₆ scheint dessen eigentliche Bedeutung eher in langfristigeren Prozessen zu liegen. So konnte beobachtet werden, daß das Abfallen und Steigen von zellulären InsP₆-Konzentrationen eng an bestimmte Phasen des Zellzyklus und der Zelldifferenzierung gebunden ist [Guse A.H. et al., 1993; Balla T. et al., 1994; French P.J. et al., 1991; Barker C.J. et al., 1995].

In Hinblick auf diese Tatsache ist die in zahlreichen in vitro als auch in vivo Experimenten gezeigte antineoplastische Wirkung von exogen zugeführten InsP₆ von besonderer Bedeutung, die durch die kombinierte Gabe mit Inositol noch gesteigert werden konnte [Shamsuddin A.M., 1995]. Wie InsP₆ seine antineoplastische Wirkung ausübt, kann zur Zeit noch nicht genau beantwortet werden. Eine Vermutung ist, daß exogen zugeführtes InsP₆ vorgeschaltete, rezeptoraktivierte Stoffwechselschritte

blockiert, die für die Aktivierung von malignem Wachstum notwendig sind [Shamsuddin A.M. et al., 1997]. Eine andere Vorstellung über die antiproliferative Wirkung von InsP₆ hebt dessen Fähigkeit als Chelatbildner hervor. Durch die Bildung von Chelatkomplexen ist InsP₆ in der Lage, Kationen zu binden, die wiederum zur Bildung von Metalloproteinen benötigt werden, welche in der Genregulation eine wichtige Funktion ausüben [O'Halloran T.V., 1993].

Die Eigenschaft von InsP₆ als Chelatbildner liefert noch ein weiteres Erklärungsmodell für die anticancerogene Wirkung von InsP₆ und dessen Abbauprodukte, in denen die 1,2,3-Trisphosphatkonfiguration erhalten geblieben ist. Durch die 1,2,3-Trisphosphatkonfiguration ist InsP₆ in der Lage, mit Fe³⁺ einen Chelatkomplex zu bilden, in dem alle sechs Koordinationsstellen des Eisens besetzt sind. Hierdurch wird die Fähigkeit des Eisens zur Katalyse der Hydroxyl-Radikalbildung in der Fenton-Reaktion komplett inhibiert [Hawkins P.T. et al., 1993; Phillippy B.Q., Graf E., 1997]. Durch die antioxidative Wirkung des InsP₆ kann somit eine oxidative DNS-Schädigung über eine Eisen katalysierte Fenton-Reaktion verhindert werden [Mello-Filho A.C., Meneghini R., 1991; Phillippy B.Q., Graf E., 1997; Muiras M.L. et al., 1993].



Ein weiterer Ansatzpunkt des InsP₆ in der Genregulation konnte in der Hefe aufgedeckt werden, wo gezeigt wurde, daß InsP₆ für den Transport von mRNAs aus dem Nukleus über den nukleären „pore-complex“ in das Zytoplasma notwendig ist [York J.D. et al., 1999].

Durch die Entdeckung noch weiterer höher phosphorylierter Inositolphosphate, die als Pyrophosphate über 7 oder 8 Phosphatgruppen verfügen und als Diphosphoinositol Pentakisphosphat (PP-IP₅, InsP₇) oder Bis(diphospho)inositol Tetrakisphosphat (bis-PP-IP₄, InsP₈) bezeichnet werden, stellte sich heraus, daß InsP₆ nicht den Endpunkt des Inositolphosphatstoffwechsels darstellt [Glennon M.C., Shears S.B., 1993; Stephens L. et al., 1993; Mayr G.W. et al., 1992]. Während inzwischen gezeigt werden konnte, daß die Pyrophosphatbildung des InsP₇ in Säugetierzellen durch die InsP₆-Kinase an Position 5 stattfindet [Albert C. et al., 1998], konnte bisher für InsP₈ die genaue Lokalisierung der beiden Pyrophosphatgruppen nicht geklärt werden. Mögliche Positionen für die Pyrophosphatgruppen des InsP₈ könnten die Positionen 5, 6 und 1, 5

bzw. 3, 5 sein, wie sie bereits in Dictyostelium und Polysphondylium identifiziert wurden [Laussmann T. et al., 1998; Laussmann T. et al., 1997]. Die beiden pyrophosphathaltigen Inositole InsP_7 und InsP_8 sind im Gegensatz zu ihrem Vorläufermolekül in ihrer Metabolisierung sehr dynamische Moleküle mit einem sehr schnellen Metabolismus [Glennon M.C, Shears S.B., 1993]. Die intrazelluläre Konzentration des InsP_8 kann über die Aktivierung von β_2 -adrenergen Rezeptoren und der damit verbundenen Erhöhung des cAMP-Spiegels um bis zu 70% gesteigert werden und durch die Erhöhung des cGMP-Spiegels reduziert werden [Safrany S.T., Shears S.B., 1998]. Die Synthese von InsP_7 scheint durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, z.B. durch die Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher durch Thapsigargin, reduziert zu werden [Glennon M.C, Shears S.B., 1993]. Die genaue Funktion dieser energiereichen Moleküle ist noch nicht geklärt, jedoch bestehen Hinweise, daß sie in der Lage sind, ihre Phosphatgruppen auf bestimmte Substanzen und Proteine zu übertragen und somit neben dem ATP oder Kreatinphosphat als zusätzliche, allerdings sehr selektive Energielieferanten zu dienen [Saiardi A. et al., 2000]. Weiteren Aufschluß über die möglichen Funktionen von InsP_7 und InsP_8 brachte die Aufreinigung der beiden Inositolphosphat Kinasen aus Rattenhirn, die für die Bildung der beiden hochphosphorylierten Inositolphosphate verantwortlich sind und als Inositol Hexakisphosphat Kinase (54 kDa) (InsP_6 -Kinase) bzw. Diphosphoinositol Pentakisphosphat Kinase (56 kDa) (PP- IP_5 -Kinase) bezeichnet werden. Für beide Kinasen konnte gezeigt werden, daß sie auch die reversible Reaktion zurück zu InsP_6 bzw. InsP_7 katalysieren, wobei sie eine Phosphatgruppe auf ADP übertragen und somit zur Resynthese von ATP führen [Vogelmaier S.M. et al., 1996; Huang C.F. et al., 1998].

Inzwischen konnte das InsP_6 -Kinase Protein aus Rattenhirn als Gegenstück eines bisher nicht weiter charakterisierten humanen Genproduktes (KIAA0263) identifiziert werden. Mit Hilfe der gewonnenen Sequenzinformation konnte ein Maus EST gefunden werden, der zur Klonierung einer Maus InsP_6 -Kinase führte. Die Maus InsP_6 -Kinase besteht aus 433 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 50 kDa, das dem der InsP_6 -Kinase aus der Ratte stark ähnelt. Zwischen der Maus InsP_6 -Kinase und dem humanen Genprodukt KIAA0263 konnte eine 97%ige Aminosäurehomologie ermittelt werden, worauf KIAA0263 als humane InsP_6 -Kinase bezeichnet wurde [Saiardi A. et al., 2000].

Aus einer Kaninchendünndarm cDNA-Bank wurde eine cDNA kloniert, die nach der Injektion in *Xenopus* Oozyten die Aufnahme von anorganischem Phosphat stimulierte und daher als PiUS (phosphate uptake stimulator) bezeichnet wurde [Norbis F. et al., 1997].

Es konnte gezeigt werden, daß PiUS eine hohe Ähnlichkeit mit einer innerhalb der katalytischen Domäne aller Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinasen liegenden, stark konservierten Region besitzt [Saiardi A. et al., 2000; Schell M.J. et al., 1999; Togashi S. et al. 1997]. Das PiUS Protein wurde aus dem Kaninchen [Schell M.J. et al., 1999] und dem Menschen [Saiardi A. et al., 2000] kloniert und zeigt eine 98%ige Homologie in der Aminosäuresequenz zwischen den beiden Spezies. Aufgrund seiner Inositolphosphatbindungsdomäne wurde PiUS hinsichtlich seiner katalytischen Eigenschaften auf Inositolphosphate untersucht und ebenfalls als selektive InsP₆-Kinase identifiziert [Saiardi A. et al., 2000; Schell M.J. et al., 1999]. Das humane PiUS besitzt eine 67%ige Aminosäuren-Homologie zu der bereits erwähnten humanen InsP₆-Kinase (KIAA0263). Daher wird PiUS als InsP₆-Kinase 2 und die originär aufgereinigte InsP₆-Kinase als InsP₆-Kinase 1 bezeichnet [Saiardi A. et al., 2000].

In Northernblotanalysen von verschiedenen Mausorganen konnte für die InsP₆-Kinase 1 eine starke Expression eines 5 kB großen Transkriptes im Hirn sowie eines ca. 2 kB großen Transkriptes im Hoden nachgewiesen werden, während in Herz, Lunge, Leber, Niere und Milz nur eine sehr schwache Expression gezeigt werden konnte. Die Expression der InsP₆-Kinase 2 ist ebenfalls im Hirn am stärksten. Daneben findet auch eine deutliche Expression in der Lunge statt, während in Leber, Niere und Hoden abnehmende Expressionsspiegel gefunden wurden [Saiardi A. et al., 2000].

Die besonders starke Expression der beiden InsP₆-Kinase Isoformen der Säugetiere im Gehirn deutet auf mögliche neuronale Funktionen hin, wie z.B. die Regulation der Freisetzung von Neurotransmittern über Vesikel innerhalb der Synapsen. Diese Möglichkeit wird unterstützt durch die Beobachtung, daß InsP₇, ähnlich wie InsP₆, mit hoher Affinität an Proteine bindet, die in die Vesikelbildung bzw. -freisetzung involviert sind, wie z.B. AP-2 [Vogelmaier S.M. et al., 1992], AP-3 [Ye W. et al., 1995], Synaptotagmin [Mizutani A. et al., 1997], Protein 4.1 [Sihag R.K. et al., 1994], Golgicoatomer [Fleischer B. et al., 1994] und Hefecoatomer [Ali N. et al., 1995].

Außer den beiden in Säugetieren vorkommenden InsP₆-Kinasen wurden zunächst in Datenbankanalysen des Hefegenoms zwei weitere Proteine mit auffälligen Amino-

säuren-Homologien zur InsP₆-Kinase entdeckt [Saiardi A. et al., 2000], die als KCS1 [Huang K.N., Symington L.S., 1995] und ArgRIII [Dubois E., Messenguy F., 1987] bezeichnet wurden. Bei diesen beiden Proteinen liegt der signifikante Homologiebereich zur InsP₆-Kinase ebenfalls in der 25 Aminosäuren umfassenden Sequenzregion, die auch zwischen den Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinasen und InsP₆-Kinasen konserviert ist.

KCS1 war ursprünglich als ein Hefeprotein beschrieben worden, dessen Deletion vor Abnormitäten in der mitotischen Rekombination schützte, die durch eine Mutation im Gen der Proteinkinase C und den damit verbundenen Verlust der Proteinkinase C Aktivität hervorgerufen wurde [Huang K.N., Symington L.S., 1995; Huang K.N., Symington L.S., 1994].

Für ArgRIII wurde zunächst eine Kontrollfunktion in der Transkription der Enzyme des Argininmetabolismus der Hefe angenommen [Dubois E., Messenguy F., 1987; Qiu H.F. et al., 1990]. Es zeigte sich jedoch, daß ArgRIII andere Funktionen ausüben muß, da die Kompensation der Störungen im Argininmetabolismus nicht vor dem letalen Effekt der ArgRIII Deletion schützen konnte [Dubois E., Messenguy F., 1994].

Die Entdeckung der Homologie in der Inositolphosphatbindungsstelle zwischen diesen beiden Hefeproteinen und den Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinasen sowie den InsP₆-Kinasen führte zur Vermutung, daß auch diese beiden Proteine in den Inositolphosphatstoffwechsel involviert sein könnten [Saiardi A. et al., 2000]. In Experimenten zur Überprüfung möglicher Kinaseeigenschaften auf Inositolphosphate konnte für KCS1 eine signifikante, selektive InsP₆-Kinaseaktivität nachgewiesen werden, weshalb KCS1 als Hefe InsP₆-Kinase (yIP₆K) bezeichnet wird. Für ArgRIII hingegen wurde die Fähigkeit beobachtet, sequentielle Phosphorylierungen an Inositolphosphaten durchzuführen, so daß es Ins(1,4,5)P₃ zu Ins(1,4,5,6)P₄ [Odom A.R. et al., 2000] und dieses wiederum zu höheren Inositolphosphaten phosphorylieren kann. Aufgrund dieser Eigenschaft erhielt ArgRIII die Bezeichnung Inositolphosphat Multikinase (IPMK) [Saiardi A. et al., 2000].

Die Identifizierung von KCS1 als yIP₆K [Saiardi A. et al., 2000] sowie die Beobachtung, daß die Deletion von KCS1 den Verlust der Proteinkinase C kompensieren [Huang K.N., Symington L.S., 1995; Huang K.N., Symington L.S., 1994] kann, deutet auf die mögliche Fähigkeit der InsP₆-Kinase hin, die Proteinkinase C Aktivität zu antagonisieren. In Hinsicht auf diese Erkenntnisse ist die Beobachtung interessant, daß InsP₆ die Proteinkinase C Aktivität zu stimulieren scheint, und somit

durch die Bildung von InsP_7 aus InsP_6 die Stimulation der Proteinkinase C beendet werden könnte [Efanov A.M. et al., 1997].

Darüber hinaus gibt die Identifizierung von ArgRIII als IPMK [Saiardi A. et al., 2000] in Verbindung mit den kürzlich gewonnenen Einsichten in den Mechanismus des mRNA Transportes aus dem Nukleus über den nukleären Pore-Komplex [York J.D. et al., 1999] Hinweise auf die mögliche Bedeutung von IPMK. Es konnte gezeigt werden, daß die Deletion dreier Hefegene, die alle in den Inositolphosphatstoffwechsel verwickelt sind, den Transport der mRNA aus dem Nukleus verhinderten. Eines der Gene ist für die Umwandlung von Inositol in höher phosphorylierte Inositole verantwortlich, und die Deletion dieses Genes führte zu einer Blockade der Phosphorylierungen auf der Stufe von InsP_3 zu InsP_4 [York J.D. et al., 1999]. Dieses Gen scheint also für ein Protein zu kodieren, das in der Lage ist, InsP_3 in InsP_4 , InsP_5 und InsP_6 umzuwandeln. Eine Fähigkeit, die der der IPMK entsprechen würde und auch erklären könnte, wie die IPMK (ArgRIII) die Kontrolle z.B. über die Transkription der Enzyme des Argininmetabolismus ausüben könnte.

Die Erkenntnisse über die katalytischen Eigenschaften und die Klonierungen der oben beschriebenen Inositolphosphatkinasen, die diese als InsP_6 -Kinasen ($\text{IP}_6\text{K1}$, $\text{IP}_6\text{K2}$, yIP_6K) sowie als IPMK identifizieren, bringen weitere Einsichten in die Evolution der Inositolphosphatsynthese mit sich. In allen diesen Inositolphosphatkinasen konnten die aus den beschriebenen $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinasen bekannte Inositolphosphatbindungsdomäne sowie Reste, die für die ATP-Bindung notwendig sind, nachgewiesen werden [Saiardi A. et al., 2000; Schell M.J. et al., 1999]. Obwohl die InsP_6 -Kinasen und die IPMK sich grundsätzlich durch ihre katalytischen Eigenschaften von den $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinasen unterscheiden, da die InsP_6 -Kinasen durch Bildung eines Pyrophosphates die Phosphorylierung eines bereits vollständig phosphorylierten myo-Inositols bewirken und die IPMK sukzessive Phosphorylierungen durchführen kann, während die $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinasen nur die Phosphorylierung der 3-Hydroxylgruppe des $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ katalysieren können, scheinen sie aufgrund der konservierten Homologien gleichen Ursprungs zu sein. Es bestehen sogar Vermutungen, daß sich die $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinasen aus den InsP_6 -Kinasen heraus entwickelt hätten. Gestützt wird diese Vermutung durch die Beobachtungen, daß InsP_6 -Kinasen sowohl in dem primitiven Eukaryonten Hefe als auch in Säugetieren vorhanden sind [Saiardi A. et al., 2000; Schell M.J. et al., 1999], während die $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-

Kinase nur aus höheren Eukaryonten isoliert und kloniert werden konnte. Auf jeden Fall ermöglicht die Identifizierung der Inositolphosphatbindungsstelle die Einteilung der Inositolphosphatkinasen in unterschiedliche Familien, nämlich in die, die über die Inositolphosphatbindungsstelle verfügen und in die, die keine entsprechende Sequenzhomologien aufweisen (siehe Tab. 2).

Tabelle 2: Einteilung der Inositolphosphatkinasen.

Inositolphosphatkinasen Familien (PxxxDxKxG)		
Ins(1,4,5)P ₃ 3-K A Ins(1,4,5)P ₃ 3-K B Ins(1,4,5)P ₃ 3-K C Ins(1,4,5)P ₃ 3-K IP ₆ K1, IP ₆ K2 IPMK, yIP ₆ K	Ins(1,4,5)P ₃ 3/6-K	Ins(1,3,4,5,6)P ₅ 2-K Ins(1,3,4)P ₃ 5/6-K

In den oben aufgeführten Situationen wird die Bedeutung des Inositolphosphatstoffwechsels und insbesondere der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase als zentrales Enzym in diesem für eine Vielzahl von zellulären Prozessen dargestellt. Durch die bedeutende Rolle der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase innerhalb des Inositolphosphatstoffwechsels kommt es durch Störungen in ihrer Bildung oder in ihrer Regulation zu den oben genannten pathologischen Konsequenzen. Zugleich zeichnen sich aber aus den inzwischen gewonnenen Erkenntnissen über den Inositolphosphatstoffwechsel auch potentielle Ansatzpunkte für ein therapeutisches Eingreifen in der Zukunft ab.

Die zentrale Rolle der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase im Inositolphosphatstoffwechsel sowie ihr zell- und gewebespezifisches Expressionsmuster in unterschiedlichen Isoformen mit zum Teil unterschiedlichen Regulationsmechanismen der Enzymaktivität (s.o.) ruft ein besonderes Interesse in dem Nachweis von weiteren Isoformen hervor.

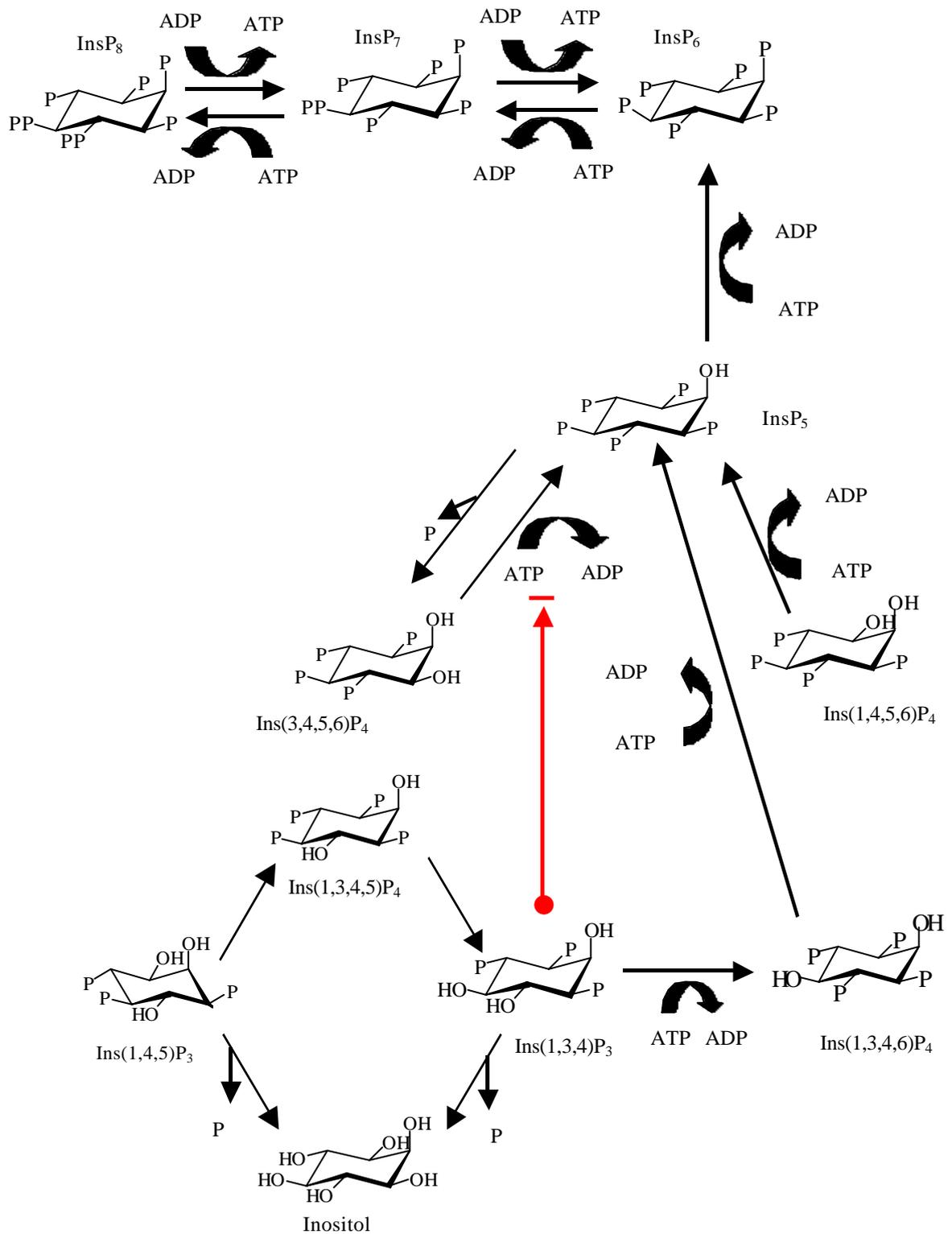


Abb. 2: Schematische Darstellung des Inositolphosphatstoffwechsels.

Die Abbildung zeigt eine vereinfachte Beschreibung der metabolischen Umwandlung der Inositolphosphate, ohne jede bekannte Zwischenstufe darzustellen. Es wurden hauptsächlich die Verbindungen aufgegriffen, für die Hinweise bestehen, daß ihr Metabolismus im Zusammenhang mit Signaltransduktionsfunktionen steht. Der senkrechte rote Pfeil ausgehend von dem Ins(1,3,4)P₃ soll dessen inhibitorische Wirkung auf die Ins(3,4,5,6)P₄ 1-Kinase andeuten.

In Vogelerythrozyten sind biochemisch zwei unterschiedliche Arten von Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinasen beschrieben worden: eine partikuläre, membrangebundene Form, die durch Ca²⁺/CaM stimulierbar ist, und eine zytosolische Form, welche Ca²⁺/CaM insensitiv ist [Morris A.J. et al., 1987], wobei ca. 84% der zellulären Enzymaktivität von der zytosolischen Form geleistet werden [Haefs M., 1994]. In Vogelerythrozyten scheint die Hauptfunktion der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase die Bildung des Ins(1,3,4,5)P₄ zu sein, das analog dem 2,3-Bisphosphoglycerat in Säugetieren als allosterischer Regulator der O₂-Affinität des Haemoglobins dient [Isaacks R.E., Harhness D.R., 1980].

Diese Arbeit soll zur Klärung der Frage beitragen, ob es sich bei der in der Arbeitsgruppe von Prof. Mayr (Ruhr-Universität Bochum und Universitäts Krankenhaus Eppendorf) aus Hühnererythrozyten isolierten und anschließend aus einer embryonalen Hühner cDNS-Bank teilklonierten, zytosolischen Form einer Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase um eine weitere neue Isoform dieses Enzyms handelt, oder ob dieses Enzym nur eine Spezies spezifische Variante der bereits bekannten Isoformen darstellt.

Die cDNS-Teilsequenz dieser Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase erstreckt sich über 1848 Bp, wovon 921 Bp im offenen Leserahmen und 927 Bp im 3' nicht-translatierten Bereich liegen. Dieses Polypeptid besitzt ein Molekulargewicht von 35 kDa und korrelierte damit annähernd mit dem durch sechs verschiedene Chromatographien angereicherten und anschließend in Renaturierungsexperimenten nachgewiesenen Enzym von 34 kDa. Das putative Translationsprodukt dieser Teilsequenz zeigt eine 71%ige Homologie zur Isoform A und nur eine 64%ige Homologie zur Isoform B aus menschlichem Hirn. Allerdings war sowohl der N-terminale Bereich dieser Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase als auch der C-terminale Bereich unvollständig, da weder ein Startcodon noch ein Poly-(A)-Schwanz ermittelt werden konnten. Durch Northernblotanalysen mit poly (A⁺)-RNS aus Hühnererythrozyten konnte jedoch ein spezifisches Signal in einer Größenordnung um 6,5 kB nachgewiesen werden, das wiederum eher dem typischen Molekulargewicht eines Transkriptes der Isoform B entsprechen würde.

Die Isolierung eines cDNS-Klons mit einer im Leserahmen liegenden Deletion von 75 Bp deutete auf das Vorhandensein von Splice-Produkten hin [Haefs M., 1994].

1.7. Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist die Klärung der genauen Identität der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase aus Hühnererythrozyten. Hierzu soll die Vervollständigung des 5'-terminalen Bereichs der DNS-Sequenz der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase aus Hühnererythrozyten erfolgen, da dieser den spezifischen Bereich der einzelnen Isoformen darstellt.

Des weiteren soll durch die Analyse genomischer Hühner-DNS die Existenz von unterschiedlichen Splice-Produkten überprüft sowie Einblicke in die Verteilung von Exon-/ Intron Grenzen gewonnen werden.

2. Material und Methoden

Allgemeine Hinweise zu Reagenzien, Lösungen und Geräten:

Alle molekularbiologischen Experimente wurden mit hochreinen Chemikalien durchgeführt. Das Ansetzen der Lösungen erfolgte mit deionisiertem Wasser, welches mit einer Umkehrosmoseanlage der Firma Seralpur hergestellt wurde. Bei Bedarf wurde das Wasser vorher oder die Lösung nach dem Ansetzen autoklaviert.

Verwendete Kunststoffmaterialien, wie Eppendorfreaktionsgefäße und Pipettenspitzen wurden ebenfalls autoklaviert.

2.1. Material

2.1.1. Lösungen

TAE (50x)	242,0 g	Tris
	57,1 ml	Essigsäure
	100,0 ml	EDTA 0,5 M pH 8,0
	ad 1000,0 ml	H ₂ O
SM	100,0 mM	NaCl
	10,0 mM	MgSO ₄ 7 H ₂ O
	50,0 mM	Tris pH 7,5
	0,2 % V	2% Gelatine
Lambda-Dilutionspuffer	10 mM	Tris pH 7,5
	10 mM	MgSO ₄
	10 mM	CaCl ₂
TE	10 mM	Tris/HCl pH 8,0
	1 mM	EDTA

Material und Methoden

20 x SSC	3,00 M	NaCl
	0,30 M	Na-Citrat
20 x SSPE	3,60 M	NaCl
	0,20 M	NaPO ₄
	0,02 M	EDTA pH 7,7
100 x Denhardtslsg:	2% (w/v)	BSA
	2% (w/v)	Ficoll
	2% (w/v)	PVP (Polyvinylpyrrolidon)
10x MOPS Puffer:	0,20 M	3-Morpholinolpropane-sulphonic acid
	0,50 M	Na-Acetat pH 7,0
	0,01 M	Na ₂ EDTA
RNS-Probenpuffer:	56,0 ml	Formamid 50% deionisiert
	20,0 ml	Formaldehyd 37%
	11,2 ml	10 x MOPS
	22,4 mg	Bromphenolblau
	11,2 ml	Ficoll 10%
	13,6 ml	DEPC-H ₂ O
Prähybridisierungslsg.	25,00 ml	Formamid (final 50%)
	12,50 ml	20x SSC
	5,00 ml	50x Denhardts-Lösung
	2,50 ml	1 M NaH ₂ PO ₄ pH 7.0 (final 50 mM)
	0,25 ml	20% SDS (final 0,1%)
	1,00 ml	10mg/ml Lachssperma-DNA (final 200 µg/ml)
	ad 50,0 ml	H ₂ O

Hybridisierungslsg.	10,0 ml	Formamid (final 50%)
	5,0 ml	20x SSC
	0,4 ml	50x Denhardts-Lösung
	0,4 ml	1M NaH ₂ PO ₄ (final 20 mM)
	0,2 ml	20% SDS (final 0,2%)
	4,0 ml	25% Dextransulfat (final 5%)
	0,4 ml	10 mg/ml Lachssperma-DNA (final 200 µg/ml)
	ad 20,0 ml	H ₂ O
Dig-Puffer I	100 mM	Tris
	150 mM	NaCl
	mit 25% HCl auf pH 7,5 einstellen	
Dig-Puffer II	0,5 g	Blocking-Reagenz, Boehringer
	100,0 ml	Dig-Puffer II
	1 h bei 50°C lösen	
Dig-Puffer III	100,0 mM	Tris
	100,0 mM	NaCl
	50,0 mM	MgCl ₂
	mit 25% HCl pH auf 9,5 einstellen	
Antikörper-Konjugat-Lsg.	40,0 ml	Dig-Puffer I
	8,0 µl	polyklonale Schaf-Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmente, konjugiert mit alkalischer Phosphatase
Farblösung	10,0 ml	Dig-Puffer III
	45,0 µl	NBT (Nitro-Tetrazolium Salz, 75 mg/ml in 70% Dimethylformamid)
	35,0 µl	BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, 50 mg/ml in Dimethylformamid)

PCR-Puffer (10x)	100,0 mM	Tris/HCl pH 8,3
	500,0 mM	KCl
	1,0 %	Gelatine

2.1.2. Kulturmedien und Festagarplatten

LB-Medium	10 g	Bacto-Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	NaCl
	ad 1 l H ₂ O pH 7,2	
Indikatorplatten	2,0 g	Bacto-Trypton
	1,0 g	Hefeextrakt
	3,0 g	Bacto-Agar
	0,5 ml	4 M NaCl
	ad 200 ml, dann autoklavieren	
	12,0 mg	IPTG
	12,0 mg	X-Gal
8,0 mg	Ampicillin	
LB-Agarplatten	10,0 g	Bacto-Trypton
	5,0 g	Hefeextrakt
	10,0 g	NaCl
	15,0 g	Bacto-Agar
	ad 1 l H ₂ O pH 7,2	
TfbII-Puffer	10,0 mM	MOPS pH 7,5
	75,0 mM	CaCl ₂
	10,0 mM	KCl
	15,0 %	Glycerin

Top-Agarose	1,0 g	Bacto Trypton
	0,5 g	NaCl
	0,7 g	Agarose
	0,1 ml	1 M MgSO ₄
	ad 100 ml H ₂ O	

Zur selektiven Anzucht von plasmidhaltigen Bakterien mit Antibiotikaresistenz wurden den Medien die entsprechenden Antibiotika beigefügt. Die Antibiotika wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

Antibiotikum	Vorratshg.-Konz. mg/ml	Endkonzentration µg/ml	Lösungsmittel, Lagerbedingung
Ampicillin	4	50-100	H ₂ O, 4°C
Kanamycin	10	30	H ₂ O, 4°C
Tetracyclin	12	12	70% Ethanol, -20°C

Tabelle 3: Antibiotika

2.1.3. Bakterienstämme

Die Amplifikation von Plasmiden wurde mit Hilfe des E.coli-Stammes XL1-Blue (Bullock et al.,1987) durchgeführt.

Zur Sichtung der genomischen DNS-Banken in dem Bakteriophagen Lambda Fix II und zur Vermehrung der Phagen wurden die E.coli-Stämme XL1-Blue MRA (P2) und XL1-Blue MRA eingesetzt. Der Vorteil des XL1-Blue MRA (P2) Stammes ist, daß in ihm nur rekombinant veränderte Lambda Fix II Phagen wachsen können. Dies liegt an den aktiven red und gam Genen, die in dem Klonierungsabschnitt des Lambda Fix II Wildtypen liegen. Werden die Gene rekombinant durch ein Insert ersetzt, kann der Phage sich im XL1-Blue MRA (P2) Stamm vermehren. So erreicht man eine Selektion von nicht rekombinant veränderten zu rekombinanten Phagen. Nach einer erfolgreichen Selektion wird der XL1-Blue MRA Stamm zur weiteren Vermehrung des rekombinanten Phagen genutzt.

2.1.4. Plasmidvektoren

Zur Subklonierung von genomischen DNS Fragmenten, die durch Restriktionsverdauung aus der genomischen Bank in dem Bakteriophagen Lambda Fix II gewonnen wurden, wurden die Plasmide pBluescript II SK+ (Stratagene, Heidelberg) und pZErOTM-2.1 (Invitrogen BV, Leek, Niederlande) eingesetzt.

2.1.5. Oligonukleotide (Primer)

Für die PCR und die Sequenzierung der Lambda Fix II gen. Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase-Klone und der Subklone in pBluescript II SK+ bzw. pZErOTM-2.1 wurden folgende Oligonukleotide eingesetzt, die von der Firma MWG-BIOTECH bezogen wurden.

Sequenzierung der Subklone:

NP 24: 5'-GAC GTT GTA AAA CGA CGG CCA CTG- 3'

RP 24: 5'-AAC AGC TAT GAC CAT GAT TAC GCC- 3'

6.1 N: 5'-GTC TGC CCA GGA CCG ACT TTT CCC- 3'

6.1 R: 5'-CAG ACA GTT CAC TTA AGA TTC TCC- 3'

9d N: 5'-GAA GCA TAT ACA TAT GTA CTG GGC- 3'

9d R: 5'-TGA TGA TAG AAA AAT GAA CTT AGG- 3'

1800 Fw: 5'-TGT TGG GCA GCA TCC AGA CCA CCG-3'

1800 Rp: 5'-ATG ACT GGT GTC AGT CAG TGA CCC-3'

Oligonukleotide zur Sequenzierung der Lambda Fix II gen. Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase-Klone:

Sequenzierung in 5'-3' Richtung:

UB 19: 5'-CAT GGA GGA AAG AAA AAG GCA TGG-3'

UB 43: 5'-ATG GTG ACA GTT GAT TTG CTG GCC-3'

UB 46: 5'-GAG TTT CAA GGC AGC TGA TAG TTG-3'

UB 48: 5'-TAC TGA CCT GTA TCA CAC AGT GCC-3'

UB 52: 5'-GTA TGT TCT CAG GAG TAT CTT TGG-3'

UB 53: 5'-AAG CGT TAG AAA TGT TGT CTT CCC-3'

UB 57: 5'-GAT CTT GAG GCA TTC AGA CAG TCC-3'

UB 63: 5'-CCT GTG AGG ATC GGT GAT GTC AGC-3'

UB 64: 5'-CCT AGC TCC AGT CTC CAT CTT TCC-3'
UB 68: 5'-AGA AGG CCA GCT GCA GCG ATT TGG-3'
UB 72: 5'-GAT TCA TTA GTC TCT GTA AAA TCC-3'
UB 73: 5'-TTT CAA CTC AGA ATG TTT ACT TCC-3'
UB 75: 5'-CTG GAA GAA GAG CTG ACT AAA GCC-3'
UB 76: 5'-CAG CAG TTA TGT TTC TGG TCA ACC-3'
UB 80: 5'-TTA TAT ATG TTC TAA GGG CTC TGG-3'
UB 81: 5'-AAC TGA ATG AAA TAG CTG CCT CTC-3'
UB 82: 5'-GCT CGG GCC AAG AGT GAC TTC AGC-3'
UB 88: 5'-CTA TAA GTT AGT GTC ATT TGG CTC-3'
UB 94: 5'-GTC ATA GCG CAG TGA CAA GAA AGG-3'
UB 97: 5'-GAT ATT CCT TGA CTT GTC TFC TGC-3'
UB 98: 5'-TCA TTC AAA TCC CCA GAT CAC TCC-3'
UB 103: 5'-TTA TTG GCA GGC TGC AAA TTC CGC-3'
UB 106: 5'-TTA ATT TTT GTG AGA GCT GAG ACC-3'
UB 111: 5'-ACA TCA CGC GCT TGT CAA GCT TGC-3'
UB 112: 5'-TAT GGC AAT AGC AGG TAG TGC TGC-3'
UB 114: 5'-ATC TCA TTC CTT TGG CTT TTG GCC-3'
UB 117: 5'-TAC TCT GCC ACT TGT TCA CAT AGC-3'
UB 122: 5'-GGA TTG GTT CTT CCA TTC TCT TCC-3'
UB 126: 5'-ACT ATT CCA ATC TTC TCC ACT TCC-3'
UB 128: 5'-TAT AGA TGA AGC TGG GAT AAA GCC-3'
UB 130: 5'-TAA GTA TAG TAA TGT TTA ATA TCC-3'
Sequenzierung vom 3'-Ende zum 5'-Ende:
UB 14: 5'-CTG TAT GTC CAG CCA GCT GCA CCC-3'
UB 42: 5'-CTG CAT AAC CCT GTC AGT GTT GGC-3'
UB 44: 5'-CAG AAC ACA CAT TAC TAA TCA GGC-3'
UB 47: 5'-AAC TGA CAC TGG CTC ATT ACA AGG-3'
UB 51: 5'-AGT TAA AAG GGA CCT TTA AGA TCC-3'
UB 56: 5'-ATC TGT ATT GCG GGT GCC ACT GCC-3'
UB 67: 5'-GAG ACC GAT GAT CAA CAG CTA GGG-3'
UB 79: 5'-TAG GTA TTT GAC TTT GCC ATG AGG-3'
UB 89: 5'-CCC TGG CAA GTT AGA ACC ACA GCC-3'

UB 91: 5'-CAT GCT TTG GGA CTA AAA CCC TGG-3'
UB 95: 5'-GAC AAA ATA TAA CCT CCA TAT GGG-3'
UB 96: 5'-TCC CCA GCG GCT CAC CTT TCC TCC-3'
UB 99: 5'-TTA ATT CTT CAT GCT ATT TCA CCC-3'
UB 100: 5'-CCC TGG TCT CAG AAG GTG CAA TGC-3'
UB 101: 5'-TTT TAA CTT GCC TTG CAA GTA AGC-3'
UB 102: 5'-CCA CTG AAC ACA TCT TGA TGT GGG-3'
UB 104: 5'-CAA GTG GCC CAA ACC TCC TTC TGG-3'
UB 105: 5'-CAA GGG AAA ACA AAA ACA AAT GCC-3'
UB 109: 5'-TTT TGT TTT CAT CTG TCT CACTGC-3'
UB 113: 5'-ATT TAT CTA AGC TGT CCA TCA CCC-3'
UB 118: 5'-TAA TGA AAGGTA CTG AGC AAC AGG-3'
UB 119: 5'-CAC AAC AAA GTC TGT AAG AGC TGC-3'
UB 121: 5'-TCT ATA TCC CTT CTG TAA CGA TCC-3'
UB 125: 5'-CCT AAC AAG GCA TCA TAC TGC AGC-3'
UB 127: 5'-GCA TGA GCT GGA AAG ACT AGT TCC-3'
UB 129: 5'-GGT GTG AAG GAA AGA CAA TGG GCC-3'
UB 131: 5'-GAA TCA AAT CTG CTG TCC TCC TGG-3'
UB 132: 5'-TTA CGC AGC TTT GGT TTC TCA CGG-3'

Primer A:

Oligonukleotide zur c-DNS-Synthese:

UB 14: 5'-CTG TAT GTC CAG CCA GCT GCA CCC-3'
UB 40: 5'-CTG AGT GAT CTC TCT AGA GAA GAA AGT TAG TTA C-3'

1. c-DNS-Synthese

UB 12: 5'-GCA TGT ATC GGG GCT TGG-3'
UB 136: 5'-TTC CAG GTA TGT CCT GAT CC-3'

2. c-DNS-Synthese

UB 142: 5'-CAT GCC TTT TTC TGG TTG G-3'

Oligonukleotide für RACE-PCR:

1. RACE-PCR

UB 135: 5'-CAC CAT GGA AGC AAG GGA CGC AGG-3'

2. RACE-PCR

UB 144: 5'-GCC AGC CGC CCT CCG GGT GCG CCG-3'

UB 138: 5'-GAG TCC TCG CCG CGC TCC AGG TGC-3'

3. RACE-PCR

UB 165: 5'-TGA AGT CAG CCG GCA GCC ACT CAC-3'

Adaptor Primer:

AP 1: 5'-CCA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC-3'

Oligonukleotide für Nested-RACE-PCR:

UB 134: 5'-GTT AAC CAT GGT TTT AAT TGT ATG CCA TGC C-3'

UB 139: 5'-GCG AGG AGG TGG ACA GCC TGC GGG-3'

UB 143: 5'-CTG CCC TGC GAC TCC TCG CTC TCC-3'

UB 166: 5'-GGC TGG GAG GGA CCC TGC TCA GAG-3'

Adaptor Primer 2:

AP 2: 5'-ACT CAC TAT AGG GCT CGA GCG GC-3'

Oligonukleotide für Kontroll-PCR:

UB 12: 5'-GCA TGT ATC GGG GCT TGG-3'

UB 40: 5'-CTG AGT GAT CTC TCT AGA GAA GAA AGT TAG TTA C-3'

UB 46: 5'-GAG TTT CAA GGC AGC TGA TAG TGG T-3'

2.1.6. Enzyme

Die Restriktionsenzyme (*Not I*, *Xba I*, *Sac I*), die benötigt wurden, um das ca. 15 kB große Insert aus dem Lambda Fix II Phagen herauszuschneiden und aus diesem weitere Fragmente zu gewinnen wurden, von den Firmen Boehringer (Mannheim), New England Biolabs (Schwalbach) und MBI-BIOTECH (Ebersberg) bezogen.

2.1.7. Membranen

Die bei der Sichtung der genomischen DNS-Bank benötigten Nitrozellulosemembranen wurden von der Firma Schleicher & Schuell (Dassel) bezogen. Für den ersten

Sichtungsdurchgang wurden Membranen mit 132 mm Durchmesser genommen, bei den späteren Vereinzelungsschritten der rekombinanten Lambdaphagen wurden Membranen mit 81 mm Durchmesser genutzt. Für die Northernblotanalysen wurden die Nylonmembranen Hybond-N+ eingesetzt.

2.1.8. λ -cDNS-Banken

	Name	Organ	Herkunft	Primer
1	gd-em-Zap	embryonal	Prof. Strätling	random+oligodT
2	gd-em-gt11	embryonal	Vennström, Stockholm	
3	Gd-li-gt10	Leber	Clontech	random+oligodT
4	gd-mu-ZAP	Muskel	Stratagene	
5	gd-br-gt10	Hirn	Clontech	random+oligodT
6	gd-ty-ZAP	T-Lymphozyten Zelllinie MSB1	Earn Shaw, Baltimore	
7	gd-li-ZAP	Leber	Stratagene	
8	gd-br-gt11	Hirn	Kilimann	

Tabelle 4: cDNS-Banken

Alle cDNS-Banken sind Aliquots von Plattenlysaten (= 2. Amplifikation) von 1 Mio. Einzelphagen der 1. Amplifikation der jeweiligen cDNS-Bank.

2.1.9. Genomische DNS-Bank

Die verwendete DNS-Bank der Firma Stratagene bestand aus genomischer Hühner DNS, die mit *Sau3AI* verdaut war und in die *XhoI* Schnittstelle des Vektor λ -Fix II inkloniert war. Die Größe der inklonierten DNS-Fragmente lag zwischen 9-22 kB. Falls die *XhoI* Schnittstelle durch die Klonierung zerstört worden war, wurde empfohlen, das Insert mit *NotI* herauszuschneiden.

2.1.10. Computerprogramme

Die DNA-Sequenzbearbeitungen wurden mit dem Programm DNA-Strider durchgeführt.

DNS-Aligments der unterschiedlichen Ins(1,4,5) P_3 3-Kinasen Isoformen wurden mit dem Programm PileUp aus dem GCG Paket der Universität Wisconsin erstellt.

Zum Korrekturlesen der DNS-Sequenzen wurde das Programm Analysis aus dem Mac Molly Paket benutzt.

Datenbankvergleiche wurden mit Blast vorgenommen.

2.2. Methoden

2.2.1. Aufreinigung von DNS aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von DNS-Fragmenten bis zu einer Größe von 6 kB aus Agarosegelen wurde das Gel-Extraktions-Kit QIAquick der Fa. QIAGEN eingesetzt. Zunächst wurde das interessierende DNS-Fragment in einem Agarosestreifen aus dem Gel herausgeschnitten und bei 50°C 10 min in dem hochkonzentriert chaotrope Salze enthaltenden QX1-Puffer gelöst. In diesem Puffer wurde die nun gelöste DNS auf eine Mikrospin-Silikasäule gegeben. In der Gegenwart der hohen Salzkonzentration und einem pH von 7,5 band die DNS bei der anschließenden Zentrifugation an die Silikasäule, während die Verunreinigungen abzentrifugiert wurden. Im Anschluß erfolgte ein Waschschrift mit einem ethanolhaltigen Puffer (PE-Puffer), wodurch Salzkontaminationen entfernt wurden. Eine weitere Zentrifugation entfernte den

restlichen PE-Puffer, dessen Ethanol nachfolgende Reaktionen negativ beeinflussen könnte. Schließlich wurde die DNS mit 10mM Tris/HCl, pH 8,5 oder Wasser eluiert.

Größere DNS-Fragmente wurden mit dem QIAEX II Gel-Extraktions-Kit aufgereinigt. Hierbei erfolgte die Aufreinigung nicht über eine Silikagel-Säule, sondern durch die direkte Zugabe von Silikapartikeln zu der DNS-haltigen, in QX1-Puffer gelösten Agarose.

2.2.2. Präparation von Plasmid-DNS aus Flüssigkulturen

Die Plasmidpräparationen wurden aus 2 ml einer 3 ml LB-Flüssigkultur durchgeführt, die mit einer Bakterienkolonie angeimpft wurde und 12 h bei 37°C und 225 UPM im Schüttelinkubator inkubiert wurden. Zur Selektion wurde das Antibiotikum hinzugegeben, wogegen durch das Plasmid eine Resistenz bestand. Zur Plasmidpräparation wurde das Plasmid Mini Kit der Firma QIAGEN eingesetzt.

Bei dem QIAGEN Kit wurden die 2 ml Flüssigkultur abzentrifugiert, so daß man ein Zellpellet erhielt. Dieses Zellpellet wurde in einem Resuspensionspuffer (0,1 mg/ml RNase A, 50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert. Anschließend wurde eine Zell-Lyse mit einem Lyse-Puffer (200mM NaOH, 1% SDS) durchgeführt. Nach vollständiger Zell-Lyse schloß sich eine 10 minütige Neutralisation auf Eis in einem Neutralisationspuffer (3.0 M KAc, pH 5,5) an. Durch die folgende 15 minütige Zentrifugation wurden grobe Zellbestandteile abzentrifugiert. Der plasmidhaltige Überstand wurde auf die vorher mit Equilibrationspuffer (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol, pH 7,0; 0,15% Triton X-100) equilibrierte QIAGEN Ionenaustauschersäule gegeben, an die die DNA gebunden wurde und nun in vier Durchgängen jeweils mit 1ml QC-Waschpuffer (1,0 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol, pH 7,0) gewaschen wurde. Nach der Waschung erfolgte die Elution mit QF-Puffer (1,25 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, 15% Ethanol, pH 8,5). Aus dem Eluat wurde durch die Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol und einer anschließenden 30 minütigen Zentrifugation bei 10.000 UPM die DNS präzipitiert. Das gewonnene DNS-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, anschließend luftgetrocknet und wieder in einem kleinen Volumen TE oder H₂O gelöst.

2.2.3. Screening einer genomischen DNA-Bank (Bentom und Davis, 1977)

Phageninfektion:

Das Ausplattieren der gen. DNS-Bank wurde wie folgt durchgeführt: Zunächst wurden 50 ml LB-Medium mit 500 µl 1M MgSO₄ (final 10 mM) und mit 500 µl 20% Maltose (final 0,2%) versetzt, da Maltose das Gen zur Bildung des Lambda-Rezeptors in den E. coli XL 1-Blue induziert. Anschließend wurde die Kultur mit einer Einzelkolonie des Bakterienstammes XL1-Blue MRA (P2) angeimpft und über Nacht bei 37⁰C und 250 UPM im Schüttelinkubator inkubiert. Die Bakterien wurden am nächsten Morgen bei 2500 UPM und 4⁰C 15 min lang abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgossen und das Bakterienpellet wieder in 5 ml autoklaviertem Seralpur-H₂O resuspendiert. Der nun zehnfach konzentrierten Bakteriensuspension wurden 50 µl 1M MgSO₄ (final 10 mM) hinzugegeben. Für die Infektion mit dem Bakteriophagen Lambda Fix II wurde die Bakteriensuspension in 200 µl Aliquots pro Infektionsansatz aufgeteilt. Der Bakteriophage wurde in Abhängigkeit vom Ausgangstiter in einer Verdünnung eingesetzt, die pro Agarplatte (Durchmesser 132 mm) eine pfu-Zahl von 3x 10⁴ ergab. Während der Infektion der Bakterien mit dem Bakteriophagen Lambda wurden diese zusammen bei 39⁰C 30 min inkubiert. Danach wurde der Infektionsansatz in 10 ml geschmolzener Top-Agarose, die auf 50⁰C temperiert war, aufgenommen und dann gleichmäßig auf eine LB-Agarplatte verteilt. Nach dem Erhärten der Top-Agarose wurden die Agarplatten zur Inkubation über Nacht in den 37⁰C Brutschrank gestellt. Am nächsten Morgen war der Bakterienrasen durch den Bakteriophagen lysiert und die Plaquebildung abgeschlossen. Vor dem Plaquelifting wurden die Agarplatten 2 h zum Auskühlen in den 4⁰C Kühlschrank gestellt, um ein späteres Festkleben der Top-Agarose an der Nitrozellulosemembran zu verhindern.

Plaquelifting:

Die sich in den Plaques befindene Lambda-DNS wurde mit Hilfe von Nitrozellulosemembranen der Firma Schleicher & Schüll abgezogen und an diesen fixiert.

Von jeder Platte wurden zwei Nitrozellulosemembranen abgezogen, die jeweils durch Einstichstellen so markiert wurden, daß später gefundene Sondersignale genau auf der Agarplatte zu lokalisieren waren. Die Membranen wurden immer 2 min auf der Agarplatte belassen, bevor sie abgezogen wurden. Nach dem Abziehen wurde die

Membran, an der sich nun Lambda-DNS befand, sofort für 7 min auf ein 3MM-Papier gelegt, das zuvor mit Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, und 0,5 M NaOH) getränkt wurde. Dabei war jetzt die Seite der Membran, die zuvor direkt auf der Agaroberfläche lag, nach oben orientiert. Anschließend wurde die Membran in gleicher Orientierung für 3 min auf ein mit Neutralisierungslösung (0,5 M Tris/HCl pH 7,5, 1,5 M NaCl, 1mM EDTA pH 8,0) getränktes 3MM-Papier überführt. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Zum Schluß wurden die Membranen noch kurz in 2x SSC (0,3 M NaCl und 0,03 M Na-Citrat) gewaschen. Sobald die Membranen trocken waren, wurden sie 2 h bei 80⁰C gebacken, um die DNS zu fixieren.

Markierung von DNS-Sonden mit DIG-UTP:

Die Herstellung der mit Digoxigenin markierten DNS-Sonden erfolgte nach der „Random Primed“ Methode (Feinberg & Vogelstein, 1983) bei der Oligonukleotide aller möglichen Sequenzkombinationen an der zu markierenden DNS hybridisieren. Das Klenow-Enzym synthetisiert unter Verwendung der 3'OH-Enden der „random“ Oligonukleotide den komplementären DNS-Strang, wobei gleichzeitig DIG-11-dUTP eingebaut wird. Diese Sondenmarkierung wurde unter Verwendung des „DIG-High Prime“ Kits der Firma Boehringer Mannheim durchgeführt, welches ein Reaktionsgemisch einsetzt, das „random“ Oligonukleotide, Klenow-Enzym, DIG-11-dUTP und ein optimiertes Reaktionspuffer-Konzentrat enthält. Die Reaktion wurde nach Firmenprotokoll durchgeführt.

Hybridisierung mit DIG markierten DNS-Sonden:

Vor der eigentlichen Hybridisierung mit der DIG markierten DNS-Sonde wurden die Membranen mit der Lambda-DNS zunächst 2 h lang bei 42°C im Hybridisierungssofen mit einer frisch angesetzten Prähybridisierungslösung prähybridisiert. Anschließend wurden die Membranen über Nacht bei 42°C mit ca. 0,05 ml/cm² Hybridisierungslösung hybridisiert. Auf 100 cm² Membran wurden ca. 60 ng Sonden-DNS eingesetzt.

Vor dem Einsatz wurde die Hybridisierungslösung 10 min bei 65° C denaturiert. Die Hybridisierungslösung konnte bis zu fünfmal wiederholt eingesetzt werden.

Nach der Hybridisierung wurden die Membranen bei 65° C in Waschlösungen (1x SSC, 0,5x SSC, 0,2x SSC und 0,1x SSC mit jeweils 1% SDS) mit abnehmender Salzkonzentration jeweils 30 min gewaschen, um sicherzustellen, daß nur die spezifisch hybridisierte Sonde ein Signal gab.

Detektion spezifisch hybridisierter Sonden:

Zur Detektion der spezifisch hybridisierten DNS-Sonden wurden die Membranen mit Fab-Fragmenten eines anti-Digoxigenin-Antikörpers inkubiert, der mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt war. Die Fab-Fragmente des anti-Digoxigenin-Antikörpers, welche von der Firma Boehringer Mannheim bezogen wurden, banden an das in der DNS-Sonde eingebaute Digoxigenin. In einer Farbreaktion wurden die beiden hinzugegebenen Farbstoffe NBT und BCIP durch die an den Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase in einen blau-violetten Farbstoff umgesetzt. So konnten die Plaques detektiert werden, die spezifisch mit der Sonde hybridisierende DNS enthielten.

Die SONDENSIGNALE auf der Membran konnten anhand der Einstichmarkierungen einer Plaque auf der Agarplatte zugeordnet werden, welche mit Hilfe einer Pipette ausgestochen und in 500 µl SM-Puffer aufgenommen wurde. Die Phagen eluierten über Nacht aus dem ausgestochenen Agarosezylinder in den SM-Puffer. Zur Kontrolle, daß sich wirklich nur positive Phagen in dem Eluat befanden, wurde von dem Phageneluat eine Verdünnung erneut mit dem E. coli Stamm XL 1 MRA inkubiert und ausplattiert, so daß nur einzelne Plaques entstanden. Von dieser Platte konnte, nach der oben beschriebenen Vorgehensweise, eine positive Plaque erneut detektiert werden und ohne Kontaminierung durch andere Lambdaphagen ausgestochen werden.

Amplifizierung Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase rekombinanter Lambdaklone durch Plattenlysate:

Die Amplifizierung rekombinanter Lambdaklone wurde in Anlehnung an Maniatis et al. 1988 durchgeführt. Zunächst wurden in einer Maltose- und MgSO₄-haltigen LB-Kultur E. coli XL 1 MRA über Nacht angezchtet und zu 10x Zellen verarbeitet. Anschließend wurden die 10x Zellen mit dem Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase rekombinanten Lambdaklonen infiziert. Der Titer der eingesetzten Phagensuspension wurde so gewählt, daß nach Infektion der XL 1 MRA Zellen und Inkubation bei 37°C über Nacht der Bakterienrasen konfluent mit Plaques lysiert war. Die Agarplatten, auf denen eine konfluente Lyse stattgefunden hatte, wurden mit 3 ml SM-Medium überschichtet und im 4° C Kühlraum auf einen Schütteltisch gestellt. Auf diese Weise wurden in 5-6 h die Lambdaphagen aus der Agarose in das SM-Medium herausgewaschen. Nach 5-6 h konnte man das nun phagenhaltige SM-Medium mit Hilfe einer Pipette abnehmen und in 2 ml Aliquots aufteilen, die mit 100 µl Chloroform versetzt wurden.

Die so gewonnene Phagensuspension wurde zur Lambda-DNS Präparation eingesetzt.

2.2.4. Präparation von λ -DNS (Lockett, 1990)

Zunächst wurden die Phagensuspensionen 10 min mit 12000 g in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 4° C zentrifugiert. Die phagenhaltigen Überstände wurden in 4 ml Aliquots zusammengefügt und anschließend durch Hinzugabe von 2,4 ml 20% PEG 6000/2,5 M NaCl präzipitiert. Der Präzipitationsansatz wurde mehrfach invertiert und über Nacht im Kühlraum bei 4°C stengelassen. Am nächsten Morgen wurden die Präzipitationsansätze mit 12000 g in einer Sorvall-Zentrifuge (SM-24 Rotor) 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit den Phagen in 250 μ l PSB-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM MgSO₄, 100 mM NaCl) resuspendiert, in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und ein Rnase- (20 μ g/ml) sowie DNase (5 μ g/ml) -Verdau 30 min bei 37°C durchgeführt. Nach dem Verdau wurde die RNase und DNase durch die Zugabe von 250 μ l TES-Puffer (0,3 M Tris/HCl pH 9,0, 100 mM EDTA, 1,25% SDS) und durch Erhitzen auf 65°C für 15 min inaktiviert. Darauf wurde der Präparationsansatz in einem Eisbad abgekühlt, mit 250 μ l 3 M KAc pH 4,8 vermischt und 5 min auf Eis stengelassen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation mit 15000 g über 1 min bei Raumtemperatur. Der DNS-haltige Überstand wurde abgenommen und die DNS mit 0,7 Vol. Isopropanol gefällt (gut mischen, 2 min bei RT stehen lassen, 1 min mit 15000 g bei RT abzentrifugieren). Der Überstand wurde wieder abgenommen und die DNS mit 300 μ l TE-Puffer resuspendiert. Mit 150 μ l 7,5 M NH₄Ac und 900 μ l 100% Ethanol wurde eine erneute DNS-Fällung durchgeführt. Das erhaltene DNS-Pellet wurde mit 70% ETOH gewaschen. Nach der Waschung wurde das Ethanol abpipettiert und das DNS-Pellet luftgetrocknet, bis auch restliches Ethanol verdunstet war. Darauf konnte die DNS in sterilem H₂O oder TE resuspendiert werden.

2.2.5. Photometrische Quantifizierung von RNA/DNA-Präparationen

Die photometrische Quantifizierung der DNS-Präparation wurde in einem Eppendorf Photometer bei der Wellenlänge 260 nm durchgeführt. Mit der gemessenen Optischen

Dichte kann die RNS/DNS Menge bestimmt werden, da 1 OD bei 260 nm 50 µg/ml DNS bzw. 40 µg/ml RNA entspricht.

Durch Bestimmung des Quotienten von 260 nm/280 nm, der zwischen 1,7-2,0 liegen sollte, kann eine Aussage über die Qualität der Präparation gemacht werden. Der Quotient gibt allerdings keine Information über Verunreinigungen der DNS mit RNS an, daher sollte zusätzlich ein Aliquot der DNS-Präparation auf einem Ethidiumbromid-Agarosegel mit einem definierten DNS-Marker analysiert werden.

2.2.6. Schneiden von DNS mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsverdau der DNS wurden anhand der vom Hersteller der Enzyme mitgelieferten Vorschriften durchgeführt.

2.2.7. Ligation von Restriktions- und PCR-Fragmenten in Plasmide

Die Ligation von doppelsträngigen DNS-Fragmenten erfolgte im 3-5fachen molaren Überschuß zu dem zuvor ebenfalls mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnittenen Plasmidvektor, der in einer Menge von 50-100 ng eingesetzt wurde. Die Ligationen wurden in 20 µl Reaktionsvolumen durchgeführt. Das Reaktionsvolumen setzte sich neben der DNS und dem Plasmidvektor aus einem 1/10 Vol. 10x Ligationspuffer (500 mM Tris pH 7,5; 50 mM DTT; 100 mM MgCl₂), 1 mM ATP sowie 1 Unit T4-DNS-Ligase zusammen. Die Inkubationszeit der Ligation betrug 3 h bei Raumtemperatur für kohäsive Enden oder über Nacht bei 14-16°C für stumpfe Enden.

2.2.8. Trennung von DNS-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese

Die Trennung der DNS-Fragmente erfolgte in horizontalen Gelelektrophoresekammern. In Abhängigkeit von der Größe der zu trennenden DNS-Fragmente wurden Gele von 0,5-2,0% Agarose eingesetzt. Die Agarose wurde entweder in TAE-Puffer (40 mM Tris; 20 mM NaAc; 1 mM EDTA) oder 0,5x TBE-Puffer (45 mM Tris-Borat, 1 mM EDTA) aufgekocht und auf ca. 60°C abgekühlt. Anschließend wurden 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hinzugegeben, vermischt und in die abgedichtete Gelkammer

ausgegossen. Zum Auspolymerisieren wurde das Gel in den Kühlraum gestellt. Die DNS-Proben wurden für die Elektrophorese mit 1/6 Vol. Auftragspuffer (50% Glycerin, 0,1% Bromphenolblau) versetzt. Die Elektrophorese wurde bei 65 Volt 90 min durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf einem UV-Durchleuchtungstisch begutachtet, fotografiert und bei Bedarf wurden die entsprechenden DNS-Banden ausgeschnitten. Das Molekulargewicht und die Größe der aufgetrennten DNS-Fragmente konnte durch den Vergleich mit den parallel laufenden DNS-Markern (ϕ X-174-RF DNA Hae III Digest od. Lambda DNA-Hind III/ ϕ X-174 DNA-Hae III Digest, Pharmacia Biotech) bestimmt werden.

2.2.9. Präparation kompetenter Zellen

Eine LB-Tetracyclin-Platte wurde am Abend des ersten Tages mit einem Dreiösenausstrich aus einem Glycerinstock der Wirtszellen (XL-1 Blue) angeimpft und über Nacht bei 37° C im Brutschrank inkubiert.

Am Abend des zweiten Tages wurde eine 3 ml LB/Tetracyclin-Kultur mit einer einzelnen Kolonie XL-1 Blue von der LB-Tetracyclin-Platte angeimpft und über Nacht bei 37° C und 250 UPM im Schüttelinkubator wachsen gelassen.

Am Morgen des dritten Tages wurde eine 50 ml LB-Kultur mit 500 μ l der 3 ml XL-1 Blue Kultur angeimpft und bei 37°C im Schüttelinkubator bis zu einer OD₅₆₀ von 0,2 gezüchtet. Nach Erreichen der OD₅₆₀ 0,2 wurden die Zellen bei 3500 UPM (Haeraeus-Zentrifuge) und 4°C 10 min abzentrifugiert. Von nun an erfolgten alle Arbeitsschritte auf Eis und in vorgekühlten Gefäßen. Die Zellen wurden in 20 ml vorgekühlten 50 mM CaCl₂ resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie wieder abzentrifugiert und in 1 ml steril filtrierten Tfb II-Puffer resuspendiert und in 100 μ l aliquotiert. Die nun kompetenten Zellen konnten entweder direkt in eine Transformation eingesetzt werden, oder mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und in der -80°C Tiefkühltruhe aufbewahrt werden.

Alle Arbeitsvorgänge wurden in der Sterilbank durchgeführt.

2.2.10. Transformation von E. coli (Hanahan, 1983)

Die bei -80°C gelagerten Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Zur Transformation wurden entweder $10\ \mu\text{l}$ eines Ligationsansatzes oder $100\ \text{ng}$ Plasmid-DNS zu $100\ \mu\text{l}$ kompetenten Zellen gegeben, $30\ \text{min}$ auf Eis inkubiert und anschließend ein $1\ \text{minütiger}$ Hitzeschock bei 42°C durchgeführt. Danach wurde der Transformationsansatz in $1\ \text{ml}$ LB-Medium aufgenommen und eine Stunde bei 37°C im Schüttelinkubator ($225\ \text{UPM}$) inkubiert.

Anschließend wurde der Transformationsansatz $5\ \text{min}$ mit $5000\ \text{UPM}$ in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 4°C abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in $200\ \mu\text{l}$ LB-Medium resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden auf eine LB-Agarplatte mit den vom Plasmid abhängigen Zusätzen ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

Bei Verwendung des Vektor pBluescript II SK +/- in der Transformation wurden die transformierten Zellen auf einer X-Gal und IPTG-haltigen LB/Ampicillin-Agarplatte ausgestrichen. Der pBluescript II SK +/- bietet durch eine Blau-Weiß-Selektion die Möglichkeit zur Unterscheidung zwischen rekombinant veränderten und nicht veränderten Plasmiden.

In Zellen, die die lacZ M15 Mutation in ihrem endogenen β -Galaktosidasegen enthielten und mit dem für die β -Galaktosidase kodierenden Plasmid (pBluescript II SK +/-) transformiert waren, wurde durch IPTG die Bildung der β -Galaktosidase induziert. Die β -Galaktosidase baut das XGal zu dem blauen Farbstoff 5-Brom-4-chlor-indigo ab, was zur Ausbildung blauer Kolonien führt. Kommt es zu einer Insertion von Fremd-DNS in die Klonierungsstelle, kann keine β -Galaktosidase mehr gebildet werden und die Kolonien bleiben weiß.

Der Selektionsmechanismus des pZErOTM-2.1 Klonierungsvektor, der von der Firma Invitrogen bezogen wurde, basiert auf der Induktion des CcdB Gens durch IPTG, welches für E. coli tödlich ist (Bernard, et al., 1994). Das CcdB-Gen kodiert für ein Protein, das die DNA-Gyrase (Topoisomerase II) der E. coli vergiftet. Dadurch wird ein Zusammenfügen der zuvor voneinander getrennten DNS-Einzelstränge zum Doppelstrang verhindert, wodurch der Zelltod hervorgerufen wird. Durch die Insertion eines Fremd-DNS-Fragmentes wird die Expression des CcdB-Gens unterbrochen. So können nur E.coli überleben, die mit einem rekombinanten Plasmid transformiert wurden. Zusätzlich kodiert der pZErO^{T.M}-2.1 für eine Kanamycinresistenz.

2.2.11. Polymerase-Kettenreaktion (Mullis & Faloona, 1987)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion handelt es sich um ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven Anreicherung von spezifischen Nukleinsäurebereichen aus einem Gemisch unterschiedlichster Nukleinsäuren. Voraussetzung ist hierbei die Kenntnis von Nukleotidsequenzen aus den Randbereichen der zu amplifizierenden Sequenz. Diese werden zur Synthese von Oligonukleotiden (Primern) herangezogen, welche strangspezifisch, d.h. komplementär zu jeweils einem der beiden DNS-Stränge sind. Mit Hilfe einer thermostabilen DNS-Polymerase, z.B. aus *Thermus aquaticus* (Taq-polymerase), erfolgt die exponentielle Vermehrung des interessierenden DNS-Bereichs. Die Reaktionen wurden in einem 50 µl Volumen in einem BIOMETRA-Thermocycler durchgeführt.

Reaktionsansatz:10x	PCR-Puffer (s.o)	
	2,5 mM	MgCl ₂
	0,5 mM	dNTPs
	100-20,0 µM	Oligonukleotide
	100-10,0 ng	DNS
	0,5 U/µl	Taq-Polymerase

PCR-Programm:

Denaturierung:	1-2	min	94°C	

Denaturierung:	1	min	94°C	
Bindung:	1	min	x°C	x Zyklen
Elongation:	1	min	72°C	

Elongation:	5	min	72°C	
Kühlung:	4°C			

In der Regel wurden die Programme mit 30 Schleifen Denaturierung-Bindung-Elongation gefahren. War zu erwarten, daß es sich bei der zu amplifizierenden Sequenz um ein längeres oder sehr seltenes Segment handelt, wurde die Zykluszahl sowie die Elongationszeit in höhere Werte optimiert.

Die Bindungstemperatur der Oligonukleotide, die von der Schmelztemperatur und diese wiederum vom GC-Gehalt der Oligonukleotide abhängt, wurde nach Angaben des Herstellers ausgewählt. In Reaktionen mit Kombinationen von Oligonukleotiden unterschiedlicher Schmelztemperaturen erfolgte eine Orientierung an der niedrigeren Schmelztemperatur.

2.2.12. Nested-PCR

Mit Hilfe der Nested-PCR können die DNS-Amplifikate der Ausgangs-PCR überprüft werden. Hierzu ist es allerdings notwendig, über weitere Sequenzinformationen innerhalb der Sequenz der Ausgangsoligonukleotide zu verfügen, aus der man ein weiteres Oligonukleotidpaar bestimmen kann. Mit diesem Oligonukleotidpaar und einer Verdünnung des isolierten Ausgangsamplifikates als „Template“ führt man eine erneute PCR durch, die bei Spezifität des Ausgangsamplifikates ein verkürztes Amplifikat ergibt.

2.2.13. DNS-Sequenzierung

Die Sequenzierungen der PCR-Fragmente, der Plasmidinsertionen und der Lambdaklone wurden mit dem ABI Typ 373A von Applied Biosystems (Foster City, USA) durchgeführt, wobei das Taq-Dye-Terminator-Reaktionskit von Applied Biosystems (Foster City, USA) mit gen- oder vektorspezifischen Primern benutzt wurde. Die endgültige Sequenz wurde durch die Sequenzierung beider Stränge der Plasmide und Lambdaklone bestimmt.

Die Sequenz der Lambdaklone wurde zum größten Teil durch direkte Sequenzierung beider Stränge mit dem ABI Dye-Terminator-Kit unter Verwendung des Master Cycler Gradienten (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt.

Zyklusparameter:	96°C	5 min	Vordenaturieren	

	96°C	50 sec	Denaturieren	
	55°C	50 sec	Bindung	35 Zyklen
	60°C	4 min	Elongation	

2.2.14. Isolation totaler RNS aus 6 und 9 Tage alten Hühnerembryonen

Diese Methode ist für gefrorene und frische Materialien geeignet.

Alle Glaswaren müssen zur RNasen Dekontamination 4 h bei 180°C gebacken und alle Lösungen mit 0,1% DEPC-H₂O angesetzt werden. Während der Arbeit mit RNS müssen immer saubere Handschuhe getragen werden.

Puffer und Lösungen zur RNS Präparation:

0,1% DEPC-H₂O: 1 ml DEPC
ad 1 l H₂O 4 Stunden rühren, dann autoklavieren

1 M Na-Citrat pH 7,0 der pH wird mit 1M Zitronensäure eingestellt
DEPC-Behandlung (0,1%), autoklavieren

1 M Na-Acetat pH 5,0 der pH wird mit Essigsäure eingestellt
DEPC-Behandlung (0,1%), autoklavieren

2 M Na-Acetat pH 5,5 der pH wird mit Essigsäure eingestellt
DEPC-Behandlung (0,1%), autoklavieren

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25/24/1

5,7 M CsCl

2,5 ml 1M Na-Acetat pH 5,0 ad 100 ml DEPC-H₂O

4 M Guanidiniumthiocyanat (DEPC-Behandlung)

20% Lauroylsarcosin (DEPC-Behandlung)

2.2.15. Präparation von total-RNS aus Hühnerembryonen

1.Tag:

Es wurden 60 Embryonen aus jeweils 6 bzw. 9 Tage lang bebrüteten Eiern präpariert. Nachdem die Embryonen von Eidotter und Eiweiß getrennt waren, wurden sie sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um RNase Aktivität zu unterbinden. Von jeder Charge wurden 3x ca. 2 g embryonales Gewebe ausgewogen, in 20 ml GCN-Lösung aufgenommen und mit der Schere zerkleinert. Anschließend wurden jeweils 2 g embryonales Gewebe mit 20 ml GCN-Lösung in ein 50 ml Falcon-Röhrchen transferiert und in diesem mit dem Ultraturax homogenisiert.

Die 20 ml Homogenisat pro Ansatz wurden in GCN gespülte SS-34 Zentrifugenröhrchen gegeben und 10 min mit 10000 UPM bei 20°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Überstände (jeweils ca. 18 ml) mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und in sterile 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Weiter wurde zu jedem 18 ml Überstand 1,8 ml Sarcosyl 20% hinzugegeben, um restliche Proteine von der RNS zu lösen. Anschließend wurden die Ansätze für 2 min in ein 65°C Wasserbad gestellt. Inzwischen wurde in sechs SW-40-Röhrchen, die zuvor autoklaviert und mit 4 M GCN-Lösung gespült worden waren, jeweils 3,5 ml 5,7 M CsCl pipettiert. Dieses CsCl-Kissen wurde vorsichtig mit jeweils 7,5 ml Homogenisat überschichtet. Danach wurden die Zentrifugenröhrchen gegeneinander austariert und in der Ultrazentrifuge 20 Stunden mit 32000 UPM bei 20°C zentrifugiert. Da nur die RNS das CsCl-Kissen durchdringen kann, wurde diese durch den Zentrifugationsschritt selektiv unter dem CsCl-Kissen angereichert.

2. Tag:

Mit einem Filzstift wurde in Höhe des CsCl-Kissens am Zentrifugenröhrchen eine Markierung gesetzt. Der Überstand wurde bis auf ca. 1 ml Rest mit einer Pipette entfernt, wobei die Pipettenspitze mehrmals gewechselt wurde, um Verunreinigungen zu verhindern.

Der Restüberstand wurde abgegossen. Anschließend wurden mit einem erhitzten Skalpell die Röhrchen an der Markierung durchgeschnitten und das RNS-Pellet über Kopf 30-60 min luftgetrocknet. Die RNS wurde nach dem Trocknen mit jeweils 2x 0,5 ml 65°C warmen DEPC-H₂O resuspendiert, in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß transferiert und zum Abkühlen kurz in ein Eisbad gestellt.

Mit der resuspendierten total-RNS wurde durch die Zugabe von 1 ml Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) eine Extraktion durchgeführt. Nach 2 minütigem Mischen und einer anschließenden Zentrifugation über 5 min mit 5000 UPM bei Raumtemperatur, wurde die obere wäßrige Phase abgenommen und in ein 12 ml Greiner-Röhrchen überführt. Die untere Phase wurde erneut mit 1 ml DEPC-H₂O vermischt und mit 5000 UPM 5 min zentrifugiert. Nach der erneuten Zentrifugation wurde wieder die obere wäßrige Phase abgenommen und mit der wäßrigen Phase aus dem vorhergehenden Zentrifugationsschritt in dem Greiner-Röhrchen zusammengeführt.

Durch die Zugabe von 1/10 Volumen 2 M NaAc pH 5,5 und 2,5 Volumen Ethanol abs. (4°C), sofortiges Mischen und Lagerung über Nacht bei -20°C wurde die RNS gefällt.

3. Tag:

Die RNS-Präzipitate wurden gemischt und gleichmäßig auf 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäße verteilt, anschließend 30 min mit 10000 g bei 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgegossen und die RNS-Pellets zunächst 10-15 min in den Eppendorfgefäßen über Kopf luftgetrocknet. Danach erfolgte die vollständige Trocknung des RNS-Pellets für 20 min in der Speed-Vac. Die RNS wurde nach der Trocknung in 100 µl 62°C warmen DEPC-H₂O resuspendiert und 10 min im Heizblock bei 65°C inkubiert. Vier Ansätze wurden zusammengeführt und die leeren Eppendorfgefäße mit insgesamt weiteren 100 µl DEPC-H₂O gespült und anschließend mit den 400 µl vereinigt. Mit den 500 µl Ansätzen wurde über Nacht eine erneute RNS-Präzipitation durchgeführt (s.o).

4. Tag:

Aus den RNS-Präzipitaten wurde jeweils ein 100 µl Aliquot abgenommen, die RNS gefällt, in H₂O resuspendiert und anschließend eine photometrische Quantifizierung durchgeführt (siehe 2.2.5).

2.2.16. Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) (Frohman et al.,1988)

In der RT-PCR wird durch eine RNS-abhängige DNS-Polymerase (Reverse Transkriptase) RNS in DNS umgeschrieben.

Die RT-PCR ist die empfindlichste Technik, um die Gegenwart oder Abwesenheit von RNS-Molekülen zu bestimmen oder um die Stärke der Genexpression zu quantifizieren. Außerdem ermöglicht die RT-PCR die Klonierung von seltenen Transkripten ohne die Notwendigkeit, eine cDNS-Bibliothek konstruieren zu müssen.

In dieser Arbeit wurde das TitanTM „One Tube“ RT-PCR System der Firma Boehringer Mannheim eingesetzt, bei dem durch die kombinierte Verwendung der Reversen Transkriptase AMV und den DNS-Polymerasen Taq/Pwo die Erststrangsynthese (Reverse Transkription) und die PCR hintereinander im gleichen Reaktionsansatz ablaufen.

RT-PCR Ansatz:	1,0 µg	RNS-Template
	2,5 µl	100 mM DTT
	1,0 µl	40 U/µl RNase-Inhibitor
	1,0 µl	10 mM dNTPs
	10 µl	5x RT-PCR Puffer
	1,0 µl	20 µM 5'Primer
	1,0 µl	20 µM 3'Primer
	1,0 µl	Enzym-Mix, dann ad 50µl DEPC-H ₂ O

RT-PCR Programm:	50°C	30 min	Reverse Transkription

	94°C	1 min	Denaturierung
	x°C	2 min	Bindung
			10 Zyklen

68°C	4 min	Verlängerung	

94°C	1 min	Denaturierung	
x°C	2 min	Bindung	25 Zyklen
68°C	4 min	Verlängerung	+ 5 sec/Zyklus

68°C	10min	Verlängerung	

2.2.17. Isolierung von mRNS aus total-RNS

Die meisten eukaryontischen mRNSs tragen an ihrem 3'-Ende einen Poly-(A)-Schwanz, der die Isolierung durch Affinitätschromatographie an Oligo (dT)-Cellulose ermöglicht.

In dieser Arbeit wurde zur Isolierung der mRNS ein Kit der Firma Pharmacia eingesetzt, welches Oligo-(dT)-Cellulose Zentrifugensäulen verwendet. Jede Säule hat eine Bindungskapazität für bis zu 25 µg m-RNS aus 1,25 mg total-RNS. Zunächst wurde die Oligo-(dT)-Cellulosesäule mit 1 ml „High-salt buffer“ (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,5 M NaCl) äquilibriert. Wenn der „High-salt buffer“ durch die Säule gelaufen war, wurden ca. 1,25 mg total-RNS, die in 1 ml 65°C warmen „Elutions buffer“ (10 mM Tris-HCl pH 7,4; 1mM EDTA) gelöst waren, mit 0,2 ml „Sample buffer“ (10 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 mM EDTA; 3,0 M NaCl) vermischt und auf die Säule gegeben. Sobald die Probe in die Säule eingesogen war, wurde die Säule in ein 12 ml Greiner-Röhrchen gestellt und mit 350 g 2 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule 2x mit 0,25 ml „High-salt buffer“ beschickt und jeweils mit 350 g 2 min zentrifugiert. Daraufhin wurden drei aufeinanderfolgende Waschungen mit jeweils 0,25 ml „Low-salt bufffer“ (10 mM Tris-HCl pH 7,4 ; 1 mM EDTA, 0,1 M NaCl) durchgeführt.

Durch diese Waschschrirte wurde die m-RNS von den übrigen RNS-Frakrionen gereinigt, die nicht an den Oligo-(dT)-Säule binden konnten.

Die m-RNS wurde in 4 Zentrifugationsschrirten bei 350 g für 2 min mit jeweils 0,25 ml „Elutions Buffer“ von der Säule eluiert.

2.2.17.1. Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) (Chenchik et al.,1995;1996)

Die „RACE“ Reaktion ist eine Methode zur Amplifizierung von cDNS-Enden ausgehend von Poly-(A)-RNS. In dieser Arbeit wurde hierzu das Marathon „cDNA-Amplification Kit“ der Firma Clontech eingesetzt, wobei nur die Amplifizierung des 5'-Endes von Interesse war. Die Poly-(A)-RNS wird zunächst mit der AMV Reversen Transkriptase mit Hilfe eines einzelnen oder einer Kombination von genspezifischen, zur mRNA komplementären Oligonukleotiden (Primern) in DNS umgeschrieben. Durch eine möglichst niedrige Schmelztemperatur der Oligonukleotide konnte eine erhöhte Spezifität der Reversen Transkription erreicht werden, da diese bei nur 42°C abläuft. Um eine sensitivere Kontrolle der cDNS-Synthese zu ermöglichen, wurde (α -³²P) markiertes dCTP in die Synthesereaktion mit eingebaut.

Die aus den 9 Tage alten Hühnerembryonen gewonnene Poly-(A)-RNS (mRNS) wurde für 3 aufeinanderfolgende „RACE-Reaktionen“ eingesetzt, wobei jeweils die vorangehende Reaktion die Sequenzinformationen für die Oligonukleotide lieferte, die in der folgenden Reaktion für die reverse Transkription und Amplifikation eingesetzt wurden.

Mitgelieferte Puffer:

5x Erst-Strang-Puffer:	250 mM	Tris (pH 8,5)
	40 mM	MgCl ₂
	150 mM	KCl
	5 mM	DTT
5x Zweit-Strang-Puffer:	500 mM	KCl
	50 mM	Ammonium Sulfat
	25 mM	MgCl ₂
	0,75 mM	β-NAD
	100 mM	Tris(pH 7,5)
	0,25 mg/ml	BSA
5x Ligations-Puffer:	250 mM	Tris-HCl (pH 7,8)
	50 mM	MgCl ₂

5 mM	DTT
5 mM	ATP
25 %	Polyethylenglykol

Erst-Strang cDNS-Synthese:

	1 µg	Poly-(A)-RNA
	1 µl	10 µM cDNS Synthese -Primer -Mix
ad	5 µl	H ₂ O

2 min bei 70°C inkubieren, auf Eis abkühlen, kurz zentrifugieren

2 µl	5x	Erst-Strang-Puffer
1 µl	10 mM	dNTP-Mix
1 µl	1µCi/µl	(α- ³² P) dCTP
1 µl	20 U/µl	AMV Reverse Transkriptase

Gesamtvolumen: 10 µl

Der Reaktionsansatz wurde gemischt, zentrifugiert und anschließend bei 42°C im Inkubationsofen eine Stunde inkubiert. Nach einer Stunde wurde die Erst-Strangsynthese durch Abkühlen auf Eis beendet. Der 10 µl Erst-Strangsyntheseansatz wurde nun komplett in die Zweit-Strangsynthese eingesetzt.

Zweit-Strangsynthese:	10,0 µl	Erst-Strangsyntheseansatz
	48,4 µl	H ₂ O steril
	16,0 µl	5x Zweit-Strangsynthesepuffer
	1,6 µl	10 mM dNTP Mix
	4,0 µl	20x Zweitstrangenzym-Cocktail

Gesamtvolumen: 80 µl

Der Reaktionsansatz wurde nun gemischt und anschließend für 1,5 Stunden bei 16°C inkubiert. Nach den 1,5 Stunden wurden noch 2 µl (10 U) T4 DNS-Polymerase für weitere 45 min bei 16°C hinzugegeben. Die Zweit-Strangsynthese wurde durch die Zugabe von 4 µl EDTA/Glykogen gestoppt. Durch eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion wurde die cDNS aufgereinigt und mit 0,5 Volumen 4 M NH₄Ac und 2,5 Volumen ETOH gefällt. Nach 20 min Zentrifugation bei 14000 UPM

wurde der Überstand abgenommen. Zur Kontrolle wurden die CPM gemessen, die noch in einer Größenordnung von 1-10% der Ausgangsradioaktivität vorliegen sollten. Darauf wurde das DNS-Pellet mit 80% Ethanol gewaschen. Nachdem der Ethanolüberstand entfernt worden war und die Radioaktivität erneut überprüft wurde, wurde das DNS-Pellet 10 min an der Luft getrocknet. Die DNS wurde in 10 µl H₂O resuspendiert und ein 2 µl Aliquot wurde auf einem 1,2% Agarose-Gel analysiert.

2.2.18. Adaptor-Ligation

In der Adaptor-Ligation werden teilweise doppelsträngige DNS-Adaptoren an die 5'-Enden der cDNS-Syntheseprodukte ligiert, die für zwei gleichorientierte Primer kodieren.

Durch die gleichgesinnte Orientierung von den Adaptoren und den Adaptorprimern fehlt zunächst eine Bindungsstelle für die Adaptorprimer. Diese wird erst durch die Verlängerung des genspezifischen Primers während der ersten „5'-RACE“ Runde an der gesuchten cDNS-Population gebildet. Durch eine Aminogruppe am doppelsträngigen 3'-Ende des Adaptors wird eine Verlängerung in 3'-Richtung der adaptorligierten cDNS und damit die Bildung einer Adaptorprimerbindungsstelle, ausgehend von der allgemeinen cDNS-Population, verhindert. Durch die Adaptorprimer in Kombination mit genspezifischen Primern wird eine spezifische Amplifikation der gesuchten cDNS-Enden in der „5'RACE“ ermöglicht.

Adaptor-Ligationsansatz:	5 µl	ds cDNS
	2 µl	10 µM cDNS-Adaptor
	2 µl	5x DNS-Ligations-Puffer
	1 µl	1U/µl T4 DNS Ligase

Gesamtvolumen: 10 µl

Der Adaptor-Ligationsansatz wurde bei 16°C über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Ligase durch Erhitzen auf 70°C für 5 min inaktiviert.

2.2.19. 5'-RACE-PCR

In der „5'-RACE“ wurde die spezifisch synthetisierte, adaptorligierte cDNS mit dem Adaptorprimer AP1 und genspezifischen Primern nach in 5'-Richtung weiterführender Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinasesequenz untersucht. Als DNS-Polymerase wurde das Enzym Pfu (2,5 U/μl) eingesetzt, welches stumpf endende Amplifikate produziert, die direkt in den Eco RV geschnittenen Vektor pZero ligiert werden konnten. Die Reaktionen wurden in einem Eppendorf-PCR-Cycler durchgeführt. Die Reaktionsvolumina betragen 20 μl.

Der Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen.

Reaktionsansatz:	2,0 μl		cDNS 1:200 verd.
	2,0 μl	10x	Pfu-PCR-Puffer
	0,5 μl	10 mM	dNTPs
	0,5 μl	10 μM	Adaptorprimer AP1
	0,5 μl	10 μM	genspez. Primer
	0,2 μl	2,5 U/μl	Pfu-Polymerase
ad	20 μl		mit H ₂ O

Die 5'-RACE-Reaktionen wurden mit folgenden Zyklusparametern durchgeführt:

Zyklus:

	2 min	94°C	Vordenaturierung	

	0,5 min	94°C	Denaturierung	
	0,5 min	x°C	Bindung	35
Zyklen	1,5 min	72°C	Verlängerung	

	5 min	72°C	Schlußverlängerung	
	auf 4°C abkühlen			

Die Bindungstemperatur richtete sich nach der Schmelztemperatur des genspezifischen Primers.

2.2.20. Northernblotanalysen von total-RNS aus 6 und 9 Tage alten Hühner-embryonen

Herstellen einer $\alpha^{32}\text{P}$ -markierten Einzelstrang-DNS-Sonde für Northernblotanalysen (Stürzel et al. 1990):

Zunächst wurde ein Plasmid (ca. 200 ng) durch einen Restriktionsverdau linearisiert, das über die DNS-Sequenz verfügte, die als Sonde eingesetzt werden sollte. Die linearisierte DNS wurde als Matrize in eine PCR-Reaktion eingesetzt, die allerdings mit nur einem genspezifischen Primer durchgeführt wurde, so daß es nur zur Amplifizierung des komplementären Einzelstranges kam. Zur Sondenmarkierung wurde neben den natürlichen Nukleotiden $\alpha^{32}\text{P}$ -markiertes dCTP (50 μCi) eingesetzt. Um die Einbaurrate des $\alpha^{32}\text{P}$ -markierten dCTP in die Sonde zu erhöhen, wurde nicht markiertes dCTP in geringerer Konzentration eingesetzt als die anderen Nukleotide (dATP, dTTP, dGTP). Alle verwendeten Stoffe mußten RNase frei sein, alle Lösungen wurden mit DEPC- H_2O angesetzt.

Reaktionsansatz:	200,0 ng	Plasmid-DNS
	200,0 μM	d(A, T, G)TP
	6,25 μM	dCTP
	50,0 μCi	$\alpha^{32}\text{P}$ dCTP
	2,0 μM	Primer
	1,5 mM	MgCl_2
	10,0 μl	10 x PCR-Puffer
	2,5 U	Taq-Polymerase
ad	100,0 μl	H_2O

Reaktionszyklus:	1 min	94°C	Vordenaturierung	

	1 min	94°C	Denaturierung	
	1 min	55°C	Bindung	40 Zyklen
	1 min	72°C	Verlängerung	

	7 min	72°C	Endverlängerung	

Nach Beendigung der PCR wurde die Sonde über NucleoSpin Extraktionssäulen der Firma Machery-Nagel aufgereinigt. Die Einbaueffizienz des $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP in die Sonde wurde durch Szintillationsmessung überprüft.

Formamid Agarose-Gel 1%:	3 g	Agarose
	216 ml	DEPC-H ₂ O
	aufkochen und abkühlen lassen auf 65°C	
	15 μl	EtBr (10mg/ml)
	30 ml	10x MOPS (65°C)
	54 ml	Formaldehyd (65°C)

Nach dem Aushärten des Gels wurde es mit den RNS-Proben und dem RNS-Längenmarker beladen und die Elektrophorese mit 120 V für ca. 4 h durchgeführt. Anschließend wurde das Gel auf einen UV-Tisch gelegt. Zur späteren Orientierung wurde ein Lineal an die Markerlane angelegt und ein Foto gemacht.

Vorbereitung und Durchführung des Northernblots:

Zunächst wurde über einen Puffertank eine Glasplatte gelegt, auf die wiederum 2 Whatmanpapiere so ausgebreitet wurden, daß sie an den Querseiten mit beiden Enden in den Puffertank hinein hingen. Danach wurde der Puffertank mit 20x SSPE gefüllt, wodurch die Whatmanpapiere durch Kapillarwirkung mit 20x SSPE getränkt wurden. Die Whatmanpapiere mußten der Glasplatte luftblasenfrei aufliegen. Nun wurde das Gel „upside down“ ebenfalls luftblasenfrei auf das Whatmanpapier gelegt und anschließend wurden die Auftragesaschen des Gels durchstochen und mit 6x SSPE aufgefüllt. Das Gel wurde nun mit der zuvor 20 min in 6x SSPE inkubierten und in Gelgröße zurechtgeschnittenen Nylonmembran bedeckt. Auch hier mußte die Bildung von Luftblasen zwischen Gel und Membran vermieden werden. Die Membran wurde anschließend mit 4 in gleicher Größe und in 2x SSPE getränkten Whatmanpapieren abgedeckt. Hierauf kam nun ein Stapel Papierhandtücher in einer Dicke von ca. 15 cm, der mit einer weiteren Glasplatte und einem zusätzlichen Gewicht von ca. 250 g beschwert wurde. Der Kapillartransfer wurde ca. 16 h durchgeführt. Nach 16 h wurde die Blotvorrichtung bis zur Membran abgebaut. Die Auftragesaschen wurden mit einem weichen Bleistift durch das Gel auf die Membran eingezeichnet. Die Membran wurde kurz in 6x SSPE geschwenkt und anschließend luftgetrocknet. Die getrocknete

Membran wurde zur Fixierung der RNS in einen „Crosslinker“ der Fa. MWG-Biotech gelegt. Das „Crosslinking“ der RNS wurde bei 0,15 mW/cm^2 durchgeführt. Das Gel wurde parallel auf einem UV-Tisch nach RNS-Resten überprüft, um die Effizienz des RNS-Transfers zu kontrollieren.

Nach dem „Crosslinking“ konnte die Prähybridisierung der Membran bei 65°C für 1 h durchgeführt werden.

Prähybridisierungslsg.:	6,25 ml	20x SSPE
	1,25 ml	100x Denhardtslsg.
	1,25 ml	10% SDS
	0,50 ml	Lachssperma-DNS 1mg/ml

Nach 1 h wurde die Sonde zur Prähybridisierungslösung hinzugegeben und die Hybridisierung für mindestens 12 h bei 65°C durchgeführt. Im Anschluß an die Hybridisierung wurde die Membran zunächst bei Raumtemperatur in 2x SSPE, 0,1% SDS gewaschen. Anschließend wurde ein 15 min Waschschrift mit 1x SSPE, 0,1% SDS durchgeführt. In Abhängigkeit von der Höhe der Radioaktivität, die während der Waschungen ständig kontrolliert wurde, konnte noch ein weiterer Waschschrift mit 0,5x SSPE, 0,1% SDS angeschlossen werden.

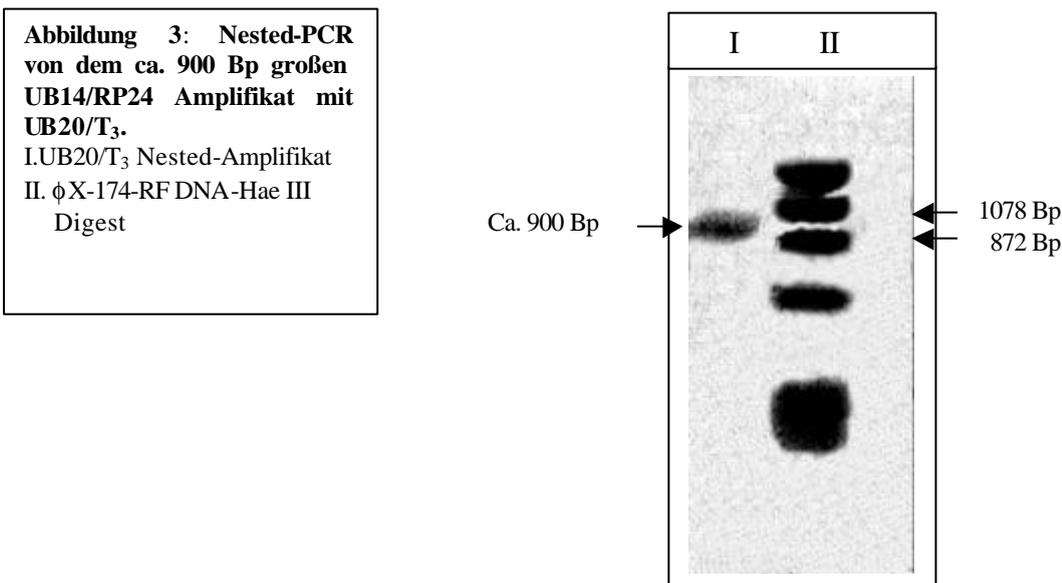
Nach den Waschungen wurde die Membran luftgetrocknet und anschließend auf einem Whatmanpapier befestigt. Zur Orientierung und späteren Größenbestimmung der RNS-Banden wurden um die Membran herum radioaktive Markierungspunkte gesetzt. In der Dunkelkammer kann die Membran nun auf einen Film aufgelegt und dann in einer Filmkassette bei -0°C exponiert werden. Die Expositionszeit erstreckte sich über einen Zeitraum von ca. 4 Wochen.

Als Positivkontrolle für die Sonde wurde parallel zum Northernblot ein Dotblot mit einer Verdünnungsreihe aus der Plasmid-DNS durchgeführt, die als Matrize für die Sondenkonstruktion diente.

3. Ergebnisse

3.1. Sichtung von cDNS-Banken mittels PCR

Als erste Versuche, die bereits ermittelte Teilsequenz der zytosolischen Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase aus Hühnerembryonen in 5'-Richtung zu vervollständigen, wurden PCR-Sichtungen von acht verschiedenen cDNS-Banken (siehe 2.1.8) aus unterschiedlichen Hühnergeweben durchgeführt. Hierbei wurden jeweils genspezifische, in 5'-Richtung orientierte Primer (UB14, UB20) aus dem bisherigen 5' terminalen Sequenzabschnitt der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase und vektorspezifische Primer in die PCR eingesetzt. Durch diese PCR-Sichtungen konnte nur aus der gd-mu-ZAP cDNS-Bank mit UB14 und dem Reverse Primer (RP24) ein ca. 900 Bp großes DNS-Amplifikat gefunden werden, das auch in der Nested-PCR mit UB20 und dem T₃-Primer ein entsprechendes Amplifikat ergab.



Das 900 Bp Amplifikat wurde in den Vektor pGEM 3z kloniert und nach Transformation in E.coli XL1-Blue amplifiziert. Das aus der Amplifikation in E. coli XL1-Blue aufgereinigte Plasmid wurde in zwei Sequenzierungsreaktionen mit dem Reverse Primer und dem Forward Primer eingesetzt. In der Analyse der erhaltenen Sequenzen ließ sich aus der Sequenzierungsreaktion mit dem Reverse Primer eine 44 Bp lange, für die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase kodierende Teilsequenz ermitteln. Allerdings endete diese noch 25 Bp vor dem zu diesem Zeitpunkt bekannten 5'-terminalen Bereich und ging dann in

eine Sequenz über, die weder Homologien zu unserer noch zu den bereits bekannten Isoformen aufwies. Auch konnte kein offenes Leseraster in dieser Sequenz gefunden werden.

Abbildung 4: Sequenz des klonierten UB20/T₃ Nested-Amplifikates aus der gd-mu-ZAP cDNS-Bank.

Der fett gedruckte Sequenzabschnitt zeigt den Bereich mit Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase-Sequenz an.

```

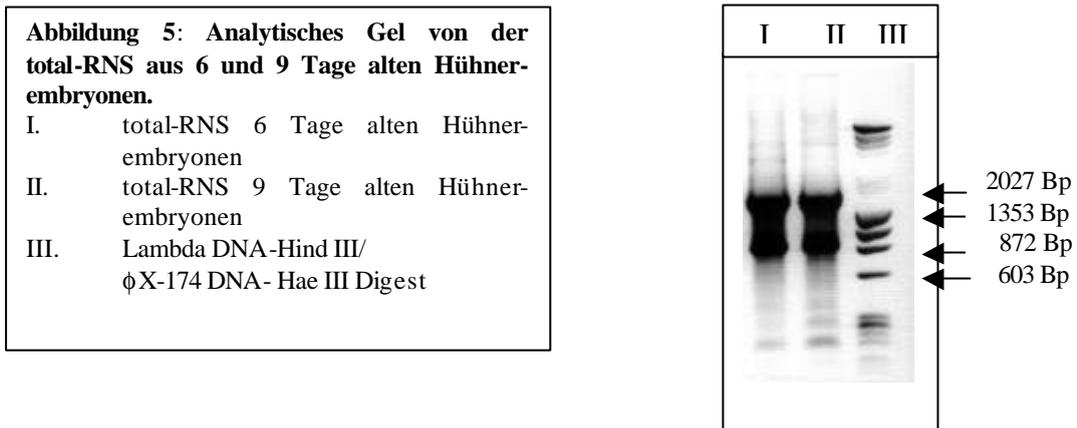
ttttttttt ttcacccgcc tttgtgatgg agcactctgc tgctgtttgt gagcagctgc 60
tctgtttccc tgccctgcctg gagcagtatc cagacagctg ccacagggat ggcaaagggtg 120
gccagagcag tgactggcctt tgtaaaaaag taacgagaca gggaaagagg ggagtgagtg 180
ggaaaatccg tgacctggaa taagttgcac tgctcactgc cagtgagtg taccaggggca 240
ctgaatgaac tatgagcctg attagtaatg tgtgttctgt ggcctaaga cgatgagact 300
gacttgttga cttggtgaaa gctgttaatt gtgacgtgat gctgaaagcc tctgggaaaag 360
gaaatattgc tgacagtggc aaacagctca tattcatgtc tcatggaaac ttaaatatgc 400
gtaagtgtag tttcagcgtc tgctctctgc atgactccgc tgcagagaga gggccagggtg 460
tggctcagca caggcctgtg gtgtgcagca tgactcttat cttttacaga cagctttctt 500
tggtatgta gagcattata tttgactatg tatgtctggt atttacaagt gtatttttcc 560
ggagatgact gcagtgtttg ttttatgctt ctacctttga cttcttacia tcagcgagag 620
caattcagtg tgcttgaagc tgtatggtag gtttatgata cgtcaggatt tcagattttg 680
cctgatttaa tattttcttt ttttgcattc cagaaaagg catggcatac aattaaacc 740
atggttaact tacca 755

```

Die Deutung dieses Sequenzabbruches war zu diesem Zeitpunkt unklar. Aufgrund der nicht weiterführenden Ergebnisse der PCR-Sichtungen von den verschiedenen cDNS-Banken entschlossen wir uns, die Strategie zu ändern und selber mRNS aus Hühnerembryonen zu gewinnen, um diese in eine „5'RACE-Reaktion“ einzusetzen.

3.2. Isolierung von m-RNS aus 6 und 9 Tage alten Hühnerembryonen

Zunächst wurde aus 6 und 9 Tage alten Hühnerembryonen, wie in 2.2.15 beschrieben, total-RNS präpariert, die auf einem Kontrollgel analysiert und anschließend photometrisch quantifiziert wurde.



Insgesamt wurden 5,63 mg total-RNS aus 6 Tage alten Hühnerembryonen und 5,15 mg aus 9 Tage alten Hühnerembryonen isoliert. Die Qualität der RNS-Präparation wurde durch die photometrische Bestimmung des Quotienten aus E:260 nm/E:280 nm beurteilt. Der Quotient lag zwischen 1,61-1,79.

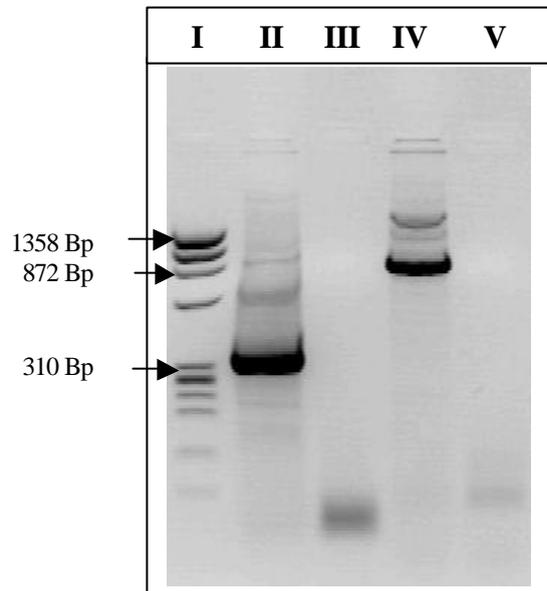
3.2.1. RT-PCR-Kontrolle der total-RNS auf Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase-Sequenz

Die total-RNS-Präparationen wurden zunächst mittels RT-PCR auf das Vorkommen von Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase-Sequenz untersucht. Hierzu wurden die genspezifischen Primerpaare (UB46/UB12 und UB46/UB40) eingesetzt, die in den bereits bekannten Sequenzabschnitten lagen. Beim Vorhandensein von Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase-Sequenz mußten diese Vorexperimente Amplifikate einer spezifischen Größe ergeben.

Die RT-PCR mit UB46/UB12 müßte ein 360 Bp großes und die mit UB46/UB40 ein 850 Bp großes Amplifikat produzieren.

Abbildung 6: Analytisches 1 % TAE-Gel der RT-PCRs.

- I. ϕ X-174-RF DNA Hae III Digest
- II. RT-PCR mit UB46/UB12 von total-RNS aus 9 Tage alten Hühnerembryonen mit spezifischer 360 Bp Bande
- III. Negativkontrolle UB46/UB12 und H₂O
- IV. RT-PCR mit UB46/UB40 von total-RNS aus 9 Tage alten Hühnerembryonen mit spezifischer 850 Bp Bande
- V. Negativkontrolle UB46/UB40 und H₂O



Nachdem durch die RT-PCR aus der total-RNS die Sequenzabschnitte der erwarteten Größe amplifiziert werden konnten und damit bewiesen war, daß sich in der total-RNS auch für Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase kodierende m-RNS befand, wurde mittels Oligo-(dt)-Cellulose-Säulen (Fa. Pharmacia, siehe 2.2.17) aus jeweils 1,25 mg total-RNS m-RNS isoliert. Die isolierte m-RNS wurde anschließend ebenfalls durch RT-PCR Kontrollen mit Primerpaaren aus bereits bekannten Sequenzabschnitten auf Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase-Sequenz hin untersucht. Nachdem sich auch hier Banden spezifischer Größe amplifizieren ließen, wurde die m-RNS aus 9 Tage alten Hühnerembryonen zur cDNS-Synthese eingesetzt.

3.3. 5'RACE

Es wurden drei sukzessive 5' RACE-Reaktionen unter Verwendung des Marathon-Kits der Fa. Clontech nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt.

3.3.1. cDNS-Synthese

Für die 5'RACE wurden zwei Chargen cDNS durch Reverse Transkription der aus 9 Tage alten Hühnerembryonen isolierten m-RNS synthetisiert.

Die erste cDNS-Synthese wurde mit einer Kombination der genspezifischen Primern UB12 und UB136 vorgenommen. Die zweite cDNS-Synthese wurde mit dem genspezifischen Primer UB142 durchgeführt (nicht dargestellt).

Bei der Synthese der cDNS durch die AMV Reverse Transkriptase erwies es sich als nützlich, Primer zu nutzen, die eine relativ niedrige Schmelztemperatur haben, da die Reverse Transkription bei nur 42°C abläuft. Durch die Annäherung der Schmelztemperatur an die Reaktionstemperatur konnte eine Erhöhung der Spezifität der Reversen Transkription erreicht werden.

1. cDNS-Synthese:

UB12: 5'-GCA TGT ATC GGG GCT TGG-3'

Schmelztemperatur: 53,5°C

UB136: 5'-TTC CAG GTA TGT CCT GAT CC-3'

Schmelztemperatur: 57,3°C

2. cDNS-Synthese:

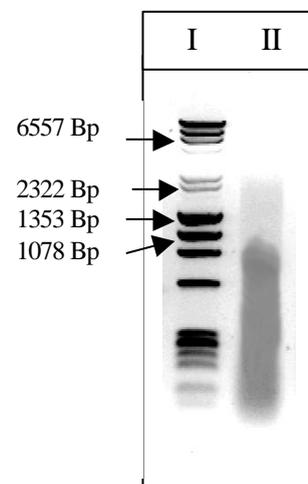
UB142: 5'-CAT GCC TTT TTC TGG TTG G-3'

Schmelztemperatur: 54,5°C

Abbildung 7: Analytisches Gel eines Aliquots der 1. cDNS-Synthese mit UB12/UB136 von m-RNS aus 9 Tage alten Hühnerembryonen.

I. Lambda DNA-Hind III/φX-174 DNA-Hae III Digest

II. cDNS-Synthese



Die cDNS wurde nach ihrer Synthese mit den für die 5'RACE notwendigen Adaptoren ligiert (siehe 2.2.18).

3.3.2. 5'RACE-PCR

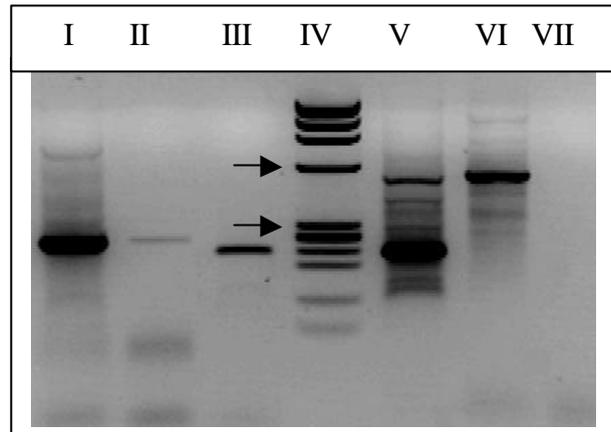
In der Tabelle sind die primären Primerpaare aufgeführt, mit denen es gelang, den 5'-Terminus der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase sukzessiv zu amplifizieren. Weiterhin werden die zur Verifizierung der primären Amplifikationsprodukte verwendeten Nested-Primer dargestellt. Die 5'RACE-PCRs wurden, wie unter 2.2.18 beschrieben, durchgeführt.

	1.RACE-PCR	1.Nested-PCR	2.RACE-PCR	2.Nested-PCR	3.RACE-PCR	3.Nested-PCR
UB135 Schmelztemp.: 67,8°C	X					
UB134 Schmelztemp.: 64,2°C		X				
UB138 Schmelztemp.: 73,0°C			X			
UB143 Schmelztemp.: 71,3°C				X		
UB165 Schmelztemp.: 67,8°C					X	
UB166 Schmelztemp.: 71,3°C						X
AP1 Schmelztemp.: 56,8°C	X		X		X	
AP2 Schmelztemp.: 59,8°C		X		X		X
cDNS aus 1. Synthese	X					
cDNS aus 2. Synthese			X		X	
Bindungstemperatur			65,3°C		68,0°C	

Tabelle 5: Darstellung der drei sukzessiven 5'RACE-Reaktionen und der dazugehörigen Nested-PCRs.

Abbildung 8: Präparatives Gel der 5'RACE mit AP1/UB135 von 1. cDNS, sowie PCR Kontrollen der Primer UB46, UB132, UB19 und UB135.

- I. Kontroll-PCR UB46/UB132
 - II. Leerkontrolle UB46/UB132
 - III. Leerkontrolle UB19/UB135
 - IV. ϕ X-174-RF DNA Hae III Digest
- Die Pfeile kennzeichnen die 603 Bp und die 281/271 Bp Bande.
- V. Kontroll-PCR UB19/UB135
 - VI. 1. 5'RACE UB135/API
 - VII. Leerkontrolle UB135/API



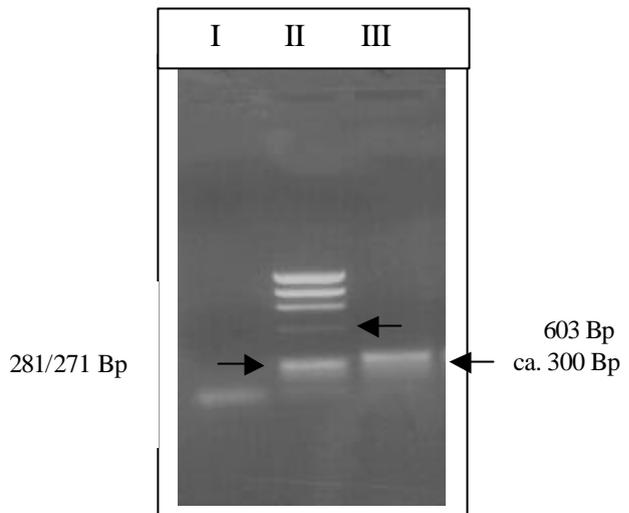
Die Kontroll-PCR mit UB46/UB132 von der 1. cDNS (Lane I) zeigt eine massive Bande in der erwarteten Größe von 268 Bp. Die in der Leerkontrolle (PCR mit UB46/UB132 ohne Template, Lane II) zu sehende diskrete Bande in gleicher Größe ist auf eine Kontamination beim Auftragen der Proben zurückzuführen.

Die Kontroll-PCR UB19/UB135 (Lane V) zeigt eine massive Bande in der erwarteten Größe bei 220 Bp sowie mehrere Artefaktbanden. In der entsprechenden Leerkontrolle ist ebenfalls eine starke Bande bei 220 Bp zu beobachten, so daß hier von einer Kontamination der Primer mit Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase-DNS ausgegangen werden muß.

Die 5'RACE-PCR mit UB135/API zeigte eine deutliche Bande im Bereich von ca. 600 Bp. In der Leerkontrolle war keine Bande zu beobachten, was darauf hinwies, daß es sich hierbei um ein spezifisches Amplifikat von Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase-Sequenz handelte, welches zusätzliche Informationen über den 5'-terminalen Bereich der Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase liefern müßte, da UB135 nur ca. 250 Bp vom bisherigen 5'-Ende entfernt lag. Zur Überprüfung dieses Amplifikates wurde die Bande ausgeschnitten, die DNS aufgereinigt und in eine Nested-PCR mit UB134/AP2 eingesetzt. Da UB134 ca. 180 Bp weiter 5'-terminal von UB135 liegt und der AP2 Primer 12 Bp weiter innen vom AP1 Primer lokalisiert ist, mußte das zu erwartende Nested-Amplifikat um 192 Bp verkürzt sein.

Abbildung 9: Präparatives Gel der Nested-PCR mit UB134/AP2 vom ca. 600 Bp Amplifikat aus der 5'RACE mit UB135/AP1.

- I. Leerkontrolle UB134/AP2
- II. ϕ X-174-RF DNA Hae III Digest
- III. Nested-PCR UB134/AP2



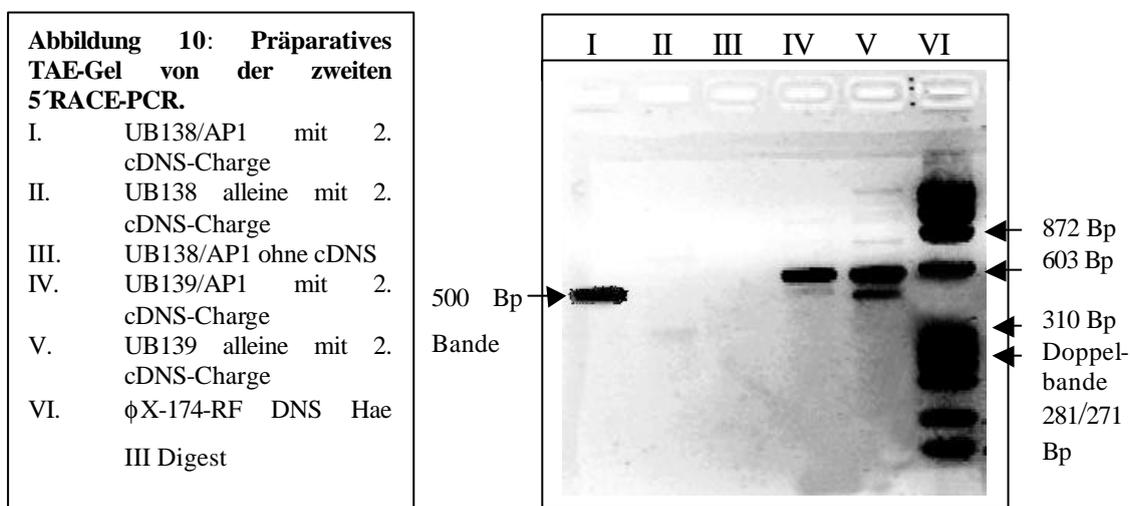
Die mit UB134/AP2 amplifizierte ca. 300 Bp große Bande entsprach in etwa dem zu erwartenden Nested-Amplifikat. Daher wurde die Bande ausgeschnitten, die DNS aufgereinigt und in den Eco RV geschnittenen Vektor pZero 2.1 stumpf inkliniert. Anschließend wurden E. coli XL1-Blue Zellen mit den Vektoren transformiert, auf eine IPTG/Kanamycin-haltige LB-Agarplatte ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Von den gewachsenen Kolonien wurden Kontroll-PCRs zum Nachweis der rekombinant veränderten Plasmide durchgeführt. Aus Kolonien mit positiv rekombinanten Klonen wurden Übernachtskulturen zur Plasmidpräparation angesetzt und anschließend die isolierten Plasmide sequenziert.

In dem als K8 bezeichneten Klon konnte eindeutig Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase Sequenz nachgewiesen werden, die noch 36 Bp der Ausgangssequenz aufwies, dann eine Deletion von 30 Bp im Vergleich zu dem λ -Klon LC13 zeigte und anschließend im offenen Leserahmen 235 Bp neue Sequenz lieferte. Da in diesem neuen Sequenzabschnitt noch kein Startcodon zu identifizieren war, mußte die Sequenz 5'terminal noch weiterführen. Allerdings konnten in dieser cDNS-Charge durch die 5'RACE keine längeren Amplifikate gefunden werden, die weiterführende Sequenzinformation hätten liefern können. Daher wurden von der neu gewonnenen Sequenz ausgehend die weiter 5'terminal liegenden Primer UB142 zur erneuten cDNS-Synthese (s.o.) sowie die Primer UB138 und UB139 zur 2. 5'RACE-PCR und UB143 zur Nested-PCR konstruiert.

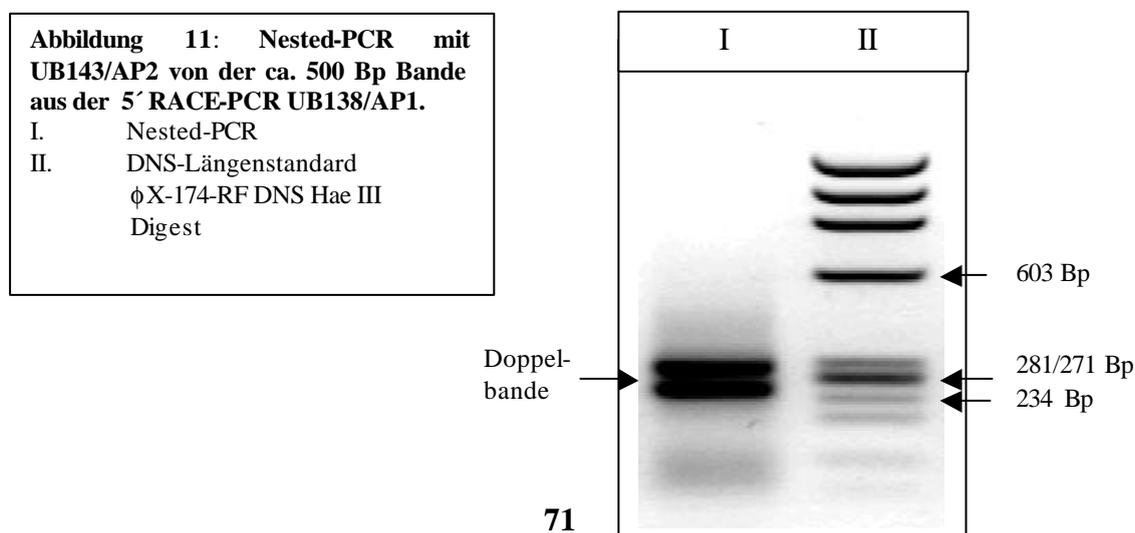
In der 5'RACE-PCR mit dem Primerpaar UB138/AP1 ließ sich eine ca. 500 Bp Bande

amplifizieren. Aufgrund der parallel durchgeführten Kontroll-PCRs, die keine Amplifikate in dieser Größenordnung zeigten, konnte davon ausgegangen werden, daß es sich bei der 500 Bp Bande um ein spezifisches Amplifikat handelte. Zur Verifizierung dieses Amplifikates wurde die 500 Bp Bande aus dem Gel ausgeschnitten, die DNS aufgereinigt und in eine Nested-PCR mit dem Primerpaar UB143/AP2 als Template eingesetzt.

Die in der 5'RACE-PCR mit dem Primerpaar UB139/AP1 amplifizierte ca. 600 Bp große Bande wurde nicht weiter verifiziert, da auch in den Kontroll-PCRs Banden in entsprechender Größe amplifiziert wurden, was auf eine unspezifische Bandenbildung hindeutet.



In der Nested-PCR von der ca. 500 Bp großen Bande (5'RACE UB138/AP1) mit dem Primerpaar UB143/AP2 ließ sich eine Doppelbande im Bereich von ca. 280 Bp und 240 Bp amplifizieren. Die Banden wurden separat ausgeschnitten und zur Sequenzierung in den Eco RV geschnittenen Vektor pZero 2.1 einkloniert.



Bei der Sequenzierung der beiden klonierten Banden wurde ersichtlich, daß die ca. 240 Bp große Bande aus dem pZ300-3 Klon noch 28 Bp der bereits bekannten Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase-Sequenz beinhaltet und sich darüber hinaus über weitere neue 218 Bp erstreckte, die einen offenen Leserahmen zeigten. Die klonierte 280 Bp Bande erwies sich nach Sequenzrecherchen in der Datenbank als Cyclin B.

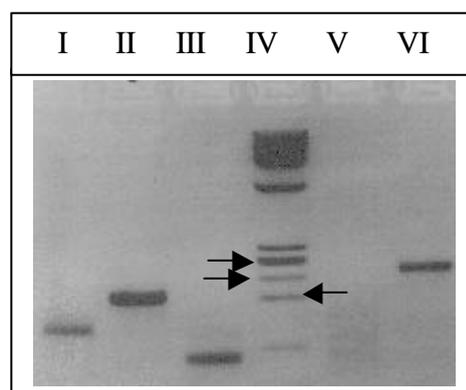
Ein Startcodon konnte jedoch auch in diesem neuen Sequenzabschnitt nicht gefunden werden. Aus diesem Grund wurden nochmals weiter 5'terminal gelegene Primer (UB165 und UB166) für eine weitere 5'RACE bzw. Nested-PCR konstruiert.

In der 5'RACE mit dem Primerpaar UB165/AP1 wurde ein DNS-Schmier bis ca. 1000 Bp amplifiziert, ohne jedoch separate Banden zu zeigen (nicht dargestellt). Daher wurde direkt ein Aliquot aus dem 5'RACE-PCR Ansatz entnommen, 1:200 verdünnt und in die Nested-PCR mit dem Primerpaar UB166/AP2 eingesetzt.

In der Nested-PCR konnte wiederum nur ein DNS-Schmier amplifiziert werden, der sich allerdings nur noch in dem Bereich zwischen 100 und 600 Bp erstreckte. Dieser Bereich wurde aus dem Gel ausgeschnitten, die DNS aufgereinigt und komplett in den Eco RV geschnittenen pZero 2.1 inkloniert sowie in E.coli XL1-Blue transformiert. Von den gewachsenen Kolonien wurden PCR Kontrollen mit dem Primerpaar UB166/AP2 nach positiv rekombinanten Plasmiden durchgeführt. Die PCR Kontrollen wurden auf einem 4% TAE-Gel analysiert.

Abbildung 12: Analytisches 4% TAE Gel der PCR Kontrollen .
 II. Klon FL37 ca. 190 Bp Bande
 IV. X-174-RF DNS Hae III DIGEST
 VI. Klon FL05 ca. 260 Bp Bande

Die Pfeile kennzeichnen von oben nach unten die 281/271 Bp, 234 Bp und die 194 Bp Bande.



Von den beiden Klonen FL37 und FL05 wurden Übernachtskulturen zur Plasmidamplifikation angelegt, aus denen die Plasmide präpariert und anschließend sequenziert wurden. Beide Klone führten die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase-Sequenz im offenen Leserahmen fort, wobei der Klon FL37 100 Bp und der Klon FL05 143 Bp zusätzliche

Sequenz lieferten. In beiden Klonen konnte bei 133 Bp ein im offenen Leserahmen liegendes Startcodon identifiziert werden.

Durch die beiden Klone FL37 und FL05 konnte die Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase-Partialsequenz an ihrem 5' terminalen Ende vervollständigt werden.

Die durch das Zusammenfügen aller überlappender cDNS-Fragmente erhaltene Gesamt-cDNS weist eine Länge von 2418 Bp (siehe Abb.) auf, wovon 1356 Bp Protein kodierende Sequenz sind, 930 Bp im 3' nichttranslatierten Bereich und 132 Bp im 5' nicht- translatierten Bereich liegen.

Im 3'nichttranslatierten Bereich konnte weder ein Poly-(A)-Schwanz noch ein Polyadenylierungssignal identifiziert werden, so daß davon auszugehen ist, daß die Sequenz am 3'-Ende noch unvollständig ist.

Abbildung 13: cDNS-Sequenz der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase mit dem durch drei sukzessiven 5'RACE-Reaktionen vervollständigten 5'-terminalen Bereich. Der vervollständigte 5'-terminale Bereich wurde fett und die Ausgangssequenz dünn gedruckt. Der grau unterlegte Bereich von 1215-1290 Bp stellt den Deletionsbereich im LC13 Klon dar. Am Übergang vom fett zum dünn Gedruckten (594 Bp) ist der Bereich lokalisiert, in dem der LC13 Klon zusätzlich über 27 Bp verfügt. Die cDNS-Synthesepriemer sind blau, die 5'RACE Primer grün und die Nested-Primer gelb unterlegt.

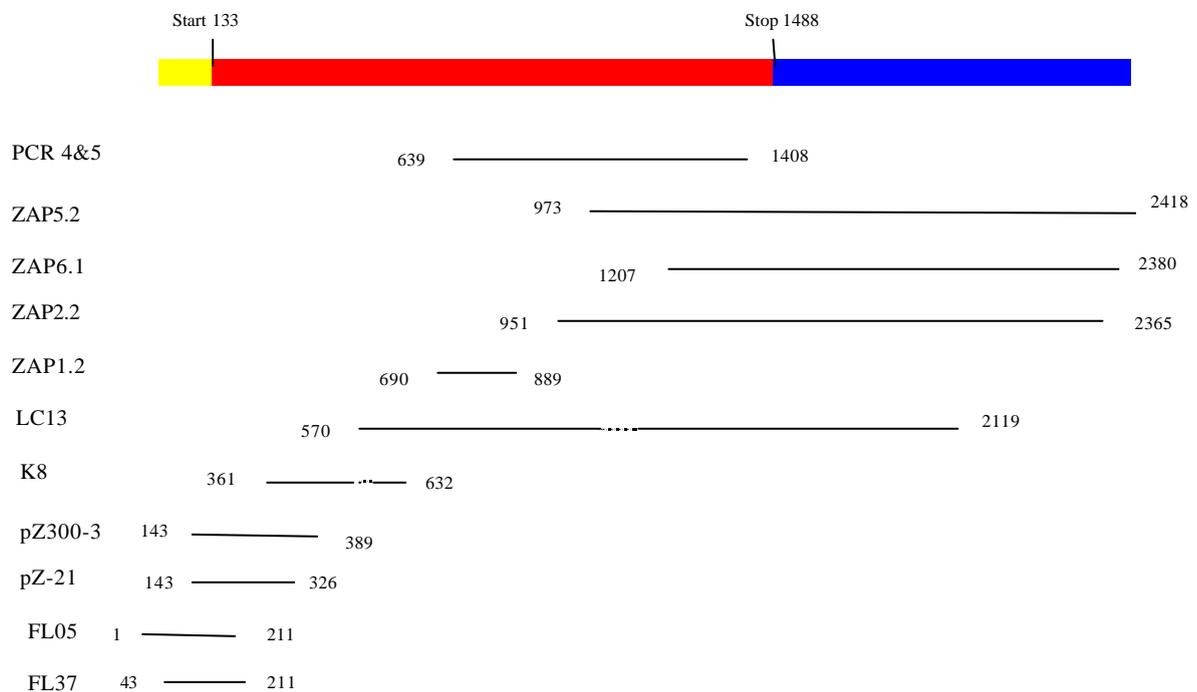
GGTCCACGTTAATAAAGAAATGAAAGGAGGTCGACGAAGGTACTCGTTAGACCTCCAATT	60
TTTTTTTTTTTTTTTTTCAATGTCAAGAACAATGGTCCAATAAAATGATGTCTCTAGGAAT	120
Start	
TCCTTCGACGTGTACGTGCGGACGACCATGGGGACCGGGGAGTCGTTCCGCGGGAGGA	180
CCGGGGCGAGACTCGTCCCAGGGAGGGTCCGAGGCACTCACCGACGGCCGACTGAAGTTT	240
UB166	UB165
TTGGTCTCTCGCAGACGTTACTTTGGTTGGTCTTTTTACGTCGACGGGCTGGGCCGCTTC	300
GCCCCGACGGCCGGGGGGTTGCCGCACGACGGCGGGCAGTAGGGCGCGGAGTGGCAGTGG	360
CGGCTCCTCTCGCTCCTCAGCGTCCCCTCGGGGTTCCGCGGGGGCCGCGTGGCCCTCCC	420
UB143	
CCGACCGACTCCTGCCTGTGCGAGCGACGTGGACGTCAGGGCGTCCGACAGGTGGAGGAG	480
CGAGAGGAGGTGCCCGAGGAGCAGGGAGGACCTCCTGAGCCTCCTGCTGCACGACTCGC	540
TGCCTCACGGCCTCGGTCCCCTAGCACCTGGACCTCGCGCCGCTCCTGAGGTTGGTCTTT	600
UB138	UB142
TTCCGTACCGTATGTTAATTTTGGTACCAATTGAATGGTCACTAATCGGGGAAGTTC	660
UB134	
GCGATGAGTACCCACGTGACCGACCTGTATGTCCCTCAAAGTTCGTCGACTATCACCA	720
TTCTAAGAGTTTGCGAAGAGTCTCTTACTTTTTCTCACAAAACCTCGCTAACTACTTTCTG	780
GGTGATGCTAGGACCGAGGAACGAAGGTACCACACCACTTTCTCTACCTCTCTGGATG	840
UB135	
TAAGTCGACCTACTAAACGAATGACTAAAACCTTCCCGGCACACACTACCTGACATTCTAC	900
CCCTAGTCCTGTATGGACCTTCTTCTCGACTGATTTCCGGCACTCTTTGGTTTCGACGCA	960
UB136	
TTTCTGTACATGTTCTTTTACTAACTTCACCTAGGAGAACGAGGATGTGACTCCTCTTA	1020
CGGGTTCGTACGACAGTGGTTCGGGGCTATGTACGTCACCTCCCTTTGTTAGTTCGAGATCA	1080
UB12	
CGGTTGGACCCGAAATCCTAACTTCCCTAATTTCTTTCGTCTACCTTGACGTTGTGTTTG	1140
AAGTTTTGATGCTTCTGTGTCTCGTTCAAGAGGTCCAAAAACACCTTAAGTAACTCCCG	1200
TTGTGTTGATAAGACTTTTTTATGGAGTTTCGCAGACGTCCTTTAAGTATAGTAAGAACTT	1260
AGGAGTCTGAAGAAGTTCGCTGTACTCCAGCAACCTTCAAGTGATGAAAAACATGTACTA	1320
CCGTACCCCTTACGGTTACACACCGACTAACTAAAACCTTCTGGTGGGAAGAGGGACTA	1380
CCCGTCTGCGACCTAGTATCCTAGGGGACCGTTCTTCCGTTGTCCCTCCTACCTATGAAC	1440
Stop	
AACCCTGACCTGTTAAACTAAGCGTAGAACCTTTCGTAGTGACTTTCTACTCAACTTTCA	1500
CCGTGTTTTGAATGTCCCAGCAAAACATTGATTGAAAGAAAGAGATGACTCTAGTGAGTCT	1560
TCCTTTGATGAAATTGATCGAGGGAAGTTTGAGGACTCCAGTAGTGTGCGGTGTCCCCTT	1620
TATATAGGTCTTGGGTCGTCGATCAATAGCTTTACTGAAACGTAAGTTCGGGAGACACTTG	1680
ATTTATTGATTGAGGTCTAACCCAGACATAACCGCGTTCGGATTACATTCTGACCAGGAGTC	1740
TCTTAGTTCAGAGGTATGAGTCCCTTAGTGTGGTCTACTCAGTTCTCCAGACATAACCAT	1800
TTGGGTCCTTCTAAGACTAAAGACCATTTGACTACCCTGAAGGTCTAATGGAGAGTCACT	1860
AGCTCTCGTTAACGAACCCCTTAAAGTCCCTCCTCATTTGTTAAAAAGTCCCTTGACCTATC	1920
AAAACCTTTGGTTCGTCCTTACAAAAAAGGAAAAACGGGATTAAGGTTTCAAGAAGACGAGGA	1980
CACATGAGATATCCAACCTGATTGTTGTCGACGACGGAATACAATATCCACATGGGTTCC	2040
ACCTTTAACCACTATTAGTCTTCTTAGGACCTCGCTTCACTCTGTGTCGTCAAACATCACCG	2100
ACATACACCATTTGGCAACAACATAATCAGGAGGAGTAGGGGTGGAGATCGGAGTTAAGTGA	2160
AGACAGGTTCTCGTCGGAAACGAAAAAATACATCGGAGACTGGTCTAATGTCGATCAGGT	2220
CCCTCTCTCATCGTCGGACAACAGAGGCCTTTGTAAAGCTGAAAGTCTGACCCACCCGAC	2280
AACCTTTTACGGATCGAACCGTCAAACAGAGAACCTGGACTTGATGTCGACACTTTT	2340
AGTCACTATTGTGAGATCGTGAGTCTGACCCCTTGATTCCCCCAAAAGTTCGGTACGAGT	2400
AAAAATTGTATTTTGGGC	2418

Die Gegenüberstellung aller cDNS-Fragmente zeigte auf, daß die Sequenz des λ -Klons LC13, welche den bisherigen 5'-Terminus der Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase-Partialsequenz dargestellt hatte, an ihrem 5'-Ende über 27 zusätzliche Basenpaare verfügte, die in den 5'RACE-Produkten nicht vorhanden waren. Der LC13 Klon fiel schon in der bereits bekannten Sequenz durch eine im Leserahmen liegende Deletion von 72 Bp auf, die für 24 Aminosäuren der katalytischen Domäne kodieren, was ein „alternatives Splicing“ andeuten könnte.

Ob es sich bei den zusätzlichen 27 Bp tatsächlich um ein für 9 AS kodierendes Miniexon handelt, sollte durch die Analyse der genomischen Partialsequenz der Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase in diesem Bereich verifiziert werden.

Abbildung 14: Gegenüberstellung aller cDNS-Klone.

Die Abb. zeigt die von Michael Haefs isolierten fünf λ -Zap-Klone und die originalen PCR-Produkte sowie die in dieser Arbeit durch 5'RACE produzierten cDNS-Klone. Die unterbrochene Linienführung in der Darstellung des LC13 Klons verdeutlicht die 75 Bp Deletion. Die unterbrochene Linienführung in der Darstellung des K8 Klons deutet die an dieser Stelle im Vergleich zum LC13 Klon fehlenden 27 Bp an.



Das Translationsprodukt der 1356 Bp kodierenden Sequenz besteht demnach aus 452 Aminosäuren und besitzt ein errechnetes Molekulargewicht von 51,104 Da.

Das errechnete Molekulargewicht der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase von 51,104 Da korreliert gut mit den noch nicht publizierten Ergebnissen eines von W. Fanick und Dr. U. Bertsch durchgeführten Westernblot. In einer über eine Calmodulin-Bindungssäule aufgereinigten Proteinfraction aus Hühnererythrozyten konnten sie mit einem gegen die katalytische Domäne der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase gerichteten Antikörper ein Signal bei ca. 52 kDa zeigen.

Abbildung 15: Peptidsequenz der Ins (1,4,5)P₃ 3-Kinase aus Hühnerembryonen.

Das DSE-(PEST)-Motiv ist **gelb**, die CaM-Bindungsdomäne **grün** und die katalytische Domäne **blau** unterlegt. Innerhalb der katalytischen Domäne ist der Sequenzbereich **rot** unterstrichen, der als Ins(1,4,5)P₃-Bindungsstelle fungiert. In dem Bindungsstellenbereich sind die AS, die bei Mutationen zu einer drastischen Zunahme des Km-Wertes für Ins(1,4,5)P₃ oder zu einer Abnahme der V_{max} führen, durch fette rote Buchstaben gekennzeichnet (Dr. U. Bertsch et al., 2000).

MHACWYPLAPSARRPPGPALSRVPPSLREWLPADDFKNQRASAMKPTRKMQLPDPAKRGCR	60
PPNGVLPPVIPRLTVTAESEESQSPKAPPAHPEGGWLRDSSLHLQSRRLSTSSLSST	120
GSSSLLLEDSEDDVLSDTTECRSQGIVHLERGEDSNQKKAWHTIKTMVNLPVISPFKKRYSW	180
VQLAGHTGSFKAADSGKILKRFSENEKECFERLMKDPLRSCVPCFHGVVERDGETYIQLD	240
DLLTDFEGPCVMDCKMGIRTYLEEEELTKAREKPKLRKDMYKKMIEVDPLAPTAEENAQHA	300
VTKPRYMQWRETISSANLGFRIEIGIKKADGTCNTNFKTTKTQEQVLQVFVEFIEGNTTI	360
LKKYLKRLQEIHIILESSDFFKRHEVVGSLLFVHDGSGNANVWLIDFGKTTLLPDGQTL	420
DHRIPWQEGNREDGYLLGLDNLIRILESITER	452

Die Gegenüberstellung aller verfügbaren Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase Primärstrukturen zeigte eine Identität zwischen der Aminosäuresequenz der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase aus Hühnererythrozyten zu den bereits bekannten Isoformen A, B und C aus Ratte und Mensch in einer Höhe von 65, 57 bzw. 54%.

Konzentriert man sich beim Vergleich der Isoformen auf die C-terminal liegende katalytische Domäne, die bereits in allen Isoformen vollständig sequenziert ist, da die Isoformen B und C noch nicht in Vollänge vorliegen, erreicht man sogar einen Identitätsgrad von 75% zu Isoform A, 68% zu Isoform B und 64% zu Isoform C.

Ergebnisse

```
RnB: MERGSPASPRCGSPTPMEIDKRTAPSLEHFGTSLTLATKVAASAASAGPHPGHDSVLMEADCELGAMRPWEAHLERRGQF : 80
HsC: ~~~~~~NSAESQAEFWTDGQTEPAAAGLVETERPKQKT : 34

RnB: LGRETGSAPPIRTHIREPPGRVERVHVSVGQGSWTPEVIKRPEEGTVDAQSSELSNPRWSRLPGDPGSVGPKEKGSRI : 160
HsB: ~~~~~~MGKGYLPCGMPGSGEPEVGRPEETTQVSVQSAESSDSLWSRLPRALASVGPPEARSGA : 59
HsC: EPDRSSLRTHLEWSWSELETTCLWTETGTDGLWTDPHRSDLQFQPEEA-SPWTQPGVHGWPWTELETHGSQLTQPERVKSWA : 113

Ce1: ~~~~~~MHTQPQSYQAPEQTHMRIENRRIEAGKGGTNLL : 33
RnB: PGI RGPQQTLD SMREGSSALG LLLGGSQAAPG SMDVETGISCGRMLPELPPGVEVTNLKEPQCLPGDRMGMPES SIVWP : 240
HsB: PVGGGRWQLSDRVEGGSPTLGLLGGSPSAQPGTGNVEAGIPSGRMLPELPCWDAADLKEPQCPPGDRVGVQPGNSRVWQ : 139
HsA: ~~~~~~MTLPGGP TGMARPGGARPCSPGLERAPRRSVGE : 33
RnA: ~~~~~~MTLPGHP TGMARPRGAGPCSPGLERAPRRSVGE : 33
HsC: DNLWTHQNSSSLQTHPEGACPSKEPSADGSWKELYTDGSR TQDIEGPWTEPYTDGSQKKQDTEAARKQPGTGGFQIQD : 193
Gg1: ~~~~~~MHACWYPLAPSARRPPGALSRVPPSLRE : 29

Ce2: ~~~~~~MTLTFE : 6
Ce3: ~~~~~~MLEAIYAKIMGVGTSRHRKQGCWSWGSSNSEKRMKRPKPKLPSKLRKISGNQRRRRDDTFVWVEE--IPTPS : 73
Ce1: LIIESRVD TLSINLPTLYSLLFTNITILMSAPQHRLRAA---HITKIAS-IDLCSLEEDHEDLVLE-ESGHHPSDI : 108
RnB: SAVEEAPLIWTCDTGIQLKGTWRS--QGDHAHPSQEKSPDQKD---KACSPNIPAPIPAVIITDMGAQ-EDGGLEEIQ : 313
HsB: GTMEKAGLAWTRGTGVQSEGTWESQRQSDALPSPELLPQDQDKPFLRKACSPSN---IPAVIITDMGTQ-EDGALEETQ : 215
HsA: LRLLFEARCAAVAAAAAAGEPRARGAKRRGGQVPNG-LPRAAPAVVIPQLTVTAEEDVPPTSP-GPPER-ERDCLPAAG : 110
RnA: LRLLFEARCAAVAAAAAAGEPRARGAKRRGGQVPNG-LPRAAPAVVIPQLTVTSEE-DVAPASP-GPPDR-EGNWLPAAG : 109
HsC: TDGSWTQPSDGTAPGTDCLLGPEDEGPEPEGLLTHLYSHL-K-CSP--LCPVPLIIT--PETPE----PEAQ : 263
Gg1: WLPADFKNQRASAMKPTRKMQLPDPAPKR-GCRPPNGVLP-----FVIPRLTVTAESEESQGSKAPPAPHEGGWLR-TD : 102

Ce2: KLAELMLMDTDKYSPQKSRLFKRMAANIISCFYPYPTTRPASPQCLPKPSPESCEHRAFCDAFGKLVQVSVETMAITALPM : 86
Ce3: VCDHRDTMNSEASSSPSAPTQERLMOIISCFYPYPTTRPASPQCLPKPSPESCEHRAFCDAFGKLVQVSVETMAITALPM : 153
Ce1: QNEKPNRPYSTLIRKRSQKVFVRFPKLDLWHSRYHEASFDLGRRLGIGRRTQSCCEDV--CDEEVS VETMAITALPM : 186
RnB: GS PRGPLPLR-KLSSSSASSTGFSSSYEDSEEDISSDP---ERTLDPNSAFLHTLDQKPRVSKS-WRKIKNM-VQWSPF : 387
HsB: GS PRGNLPLR-KLSSSSASSTGFSSSYEDSEEDISSDP---ERTLDPNSAFLHTLDQKPRVSKS-WRKIKNM-VHWSPF : 289
HsA: SHL--QQPR-RLSTSSVSSTGSSSLLSEDDLLSDS---ESR---SRGNVQLEAGEDVQKNHWQKIRTM-VN-LPV : 178
RnA: -SHL--QQPR-RLSTSSVSSTGSSSLLSEDDLLSDS---ESR---SRGNVQLETSSEVQKSHWQKIRTM-VN-LPV : 176
HsC: PVGPP---SRVEGSGSGFSSA-SS--FDESEDDVVAGGSGAS---DP-----EDRSGKPKWKKLKTIV-LKYSPPF : 322
Gg2: ~~~~~~NRRENHGKKAWHHTIKTM-VN-LPV : 24
Gg1: SSLH--IQSR-RLSTSSVSSTGSSSLLSEDDVLSDT---ECR---SQGIVHLERGEISNQKKAWHHTIKTM-VN-LPV : 170

Ce : DVWLKERLKKWVQLSGHEGSTVPA TPHTLYKKQCANCGEGRAYKNISKDFALDGF TPKY YDELEKNEEHFIEIEDLLQOF : 266
RnB: VMSFKKKY-PWQLAGHAGSFKAAA-NGRILKKHCESE-EQRCLDRLMADV-LRPFVPA YHGDVVKDGERV NQMDLLADF : 463
HsB: VMSFKKKY-PWQLAGHAGSFKAAA-NGRILKKHCESE-EQRCLDRLMADV-LRPFVPA YHGDVVKDGERV NQMDLLADF : 365
HsA: ISPFKKRY-AWVQLAGHTGSFKAAAGTSLILKRCESE-ERYCLA RLMDADA-LRGCVPAFHGVVERDGESVQLQD LLDGF : 255
RnA: MSPFKKRY-SWVQLAGHTGSFKAAAGTSLILKRSESE-EHYCLVRLMADV-LRGCVPAFHGVVERDGESVQLQD LLDGF : 253
HsC: VVSFRKHY-PWVQLSGHAGNFQ-AGEDGRILKRFCQC-EQRSLEOLMKDF-LRPFVPA YHGMVLQDGT NQMDLLADF : 398
Gg2: ISPFKKRY-SWVQLAGHTGSFKAA-DSGKILKRFS EN-EKECFERLMKDF-LRSCVPCFHGVVERDGETTYIQLD LLDLTF : 100
Gg1: ISPFKKRY-SWVQLAGHTGSFKAA-DSGKILKRFS EN-EKECFERLMKDF-LRSCVPCFHGVVERDGETTYIQLD LLDLTF : 246

Ce : HDPFKTAIMDIKIGTRTFLESEVSN TKK---RADLYEKMVAIDNDEPTEEEKCGAITKLYMQFRERESSTAQLGFRI : 242
RnB: DSP---CVMDCMGIRTYLEELTKARKKPSLRKDMYQKMI EVDPEAPTEEEKAQRAVTKPRYMOWRETISSTATLGFRI : 540
HsB: DSP---CVMDCMGIRTYLEELTKARKKPSLRKDMYQKMI EVDPEAPTEEEKAQRAVTKPRYMOWRETISSTATLGFRI : 442
HsA: DGP---CVLDCKMGVRTYLEELTKARERPKLRKDMYKMLAVDPEAPTEEEHAQRAVTKPRYMOWREGISSSTLGFRI : 332
RnA: DGP---CVLDCKMGVRTYLEELTKARERPKLRKDMYKMLAVDPEAPTEEEHAQRAVTKPRYMOWREGISSSTLGFRI : 330
HsC: EGP---SVMDCMGSRTYLEELVKARERPRPKDMYKMI EVDVDPGAPTEEEHAQRAVTKPRYMOWRETISSTATLGFRI : 475
Gg2: EGP---CVMDCMGIRTYLEELTKAREKPKLRKDMYKMI EVDLAPTAENACHAVTKPRYMOWRETISSSANLGFRI : 177
Gg1: EGP---CVMDCMGIRTYLEELTKAREKPKLRKDMYKMI EVDLAPTAENACHAVTKPRYMOWRETISSSANLGFRI : 323

Ce : EAAKRLGAL EKNFKKVRTVEDVTTTFMDFFGTQRSRVRQQLIERLKS MRKALIEHSSFFNSHEVVGSSILIVFD-TEKVG : 321
RnB: EGIKKEDGSVNRDFKKTKTREQVTEAFREFTKGNQN-ILIA YRDLKAI RETLEVSPFFK CHEVIGSSLLFIHDKKEQAK : 619
HsB: EGIKKEDGTVNRDFKKTKTREQVTEAFREFTKGNHN-ILIA YRDLKAI RTTLEVSPFFK CHEVIGSSLLFIHDKKEQAK : 521
HsA: EGIKKADGSCSTDFKTTTRSREQVLRVFEFVQGDDE-ILRRYLNRLQQIRD TLEVSEFFRHEVIGSSLLFVHDHCHRA G : 411
RnA: EGIKKADGSCSTDFKTTTRSREQVTRVFEFVQGDDE-ILRRYLNRLQQIRD TLEISDFFRHEVIGSSLLFVHDHCHRA G : 409
HsC: EGIKKADGTCNTNFKKTQALEQVTKVLEDFVGDHVD-ILQKYVACLEELREALETSPPFKTHEVVGSSLLFVHDHTGLAK : 554
Gg2: EGIKKADGTCNTNFKKTQEQVLQVFEFIEGNTT-IL-----VVGSSLLFVHDGSGNAN : 232
Gg1: EGIKKADGTCNTNFKKTQEQVLQVFEFIEGNTT-ILKKYLKRLQELHLLLESSDFEKRHEVVGSSLLFVHDGSGNAN : 402

Ce : CVMIDFAKSSPVENGR TINHRTTWIPGNNEEDGYLIGIDNLVKILLEELPEYGEHPDDQLMVTEEV IATMKNTKS : 394
RnB: VVMIDFGKTTPLPEGQTLQHDVPWQEGNREDGYLSGLNLDILTEMSSQSSPLT~~~~~ : 673
HsB: VVMIDFGKTTPLPEGQTLQHDVPWQEGNREDGYLSGLNLDILTEMSSQAPLA~~~~~ : 575
HsA: VWLIDFGKTTPLPDGQILDHRRPWEEGNREDGYLLGLDNLIGILASLAE~~~~~ : 461
RnA: VWLIDFGKTTPLPDGQILDHRRPWEEGNREDGYLLGLDNLIGILANLAE~~~~~ : 459
HsC: VVMIDFGKTTVALPDHQTLSHRLPWAEGNREDGYLWGLDNMICLLQGLAQSS~~~~~ : 604
Gg2: VWLIDFGKTTLLPDGQTLDHRI PWQEGNREDGYLLGLDNLIRILESTIT~~~~~ : 282
Gg1: VWLIDFGKTTLLPDGQTLDHRI PWQEGNREDGYLLGLDNLIRILESTIT~~~~~ : 452
```

Abbildung 16: Gegenüberstellung der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinasen Isoformen. Die Peptidsequenzen aller klonierten Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinasen Isoformen von *Caenorhabditis elegans* (Ce-1 bis -3, Clandinin et al. 1998), der Ratte (Rn-A, Choi et al., 1990 und Rn-B(Thomas et al., 1994), des Menschen (Hs-A (Takazawa et al., 1991a); Hs-B (Takazawa et al., 1991b, VanWeyenberg et al., 1995) und Hs-C (Takazawa et al., unveröffentlicht, GenBank accession no. D38169) werden mit der Consensussequenz der Hühner Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase (Gg-1, GenBank accession no. AJ012219) und dem abweichenden Hühner cDNS-Klon LC13 (Gg-2, GenBank accession no. U41445) verglichen. Hierzu wurde das Programm Pileup and Lineup (GCG program package, University of Wisconsin) verwendet. Zur Optimierung der Gegenüberstellung wurden Lücken () eingefügt. Durch das Hervorheben von Sequenzbereichen mit gelb, grün und türkis wird die Zunahme von konservierten Aminosäuren an der entsprechenden Position angedeutet. Vom N- zum C-Terminus sind das DSE-(PEST)-Motiv, die CaM-Bindungsdomäne sowie die katalytische Domäne eingerahmt. Die dicken Pfeilköpfe deuten die Intronpositionen des Ins(1,4,5)P₃ 3-Gens von *C. elegans* und Huhn an. Die dünnen Pfeile sollen die putativen Intronpositionen des alternativen Spliceproduktes LC13 des Hühnergenoms markieren.

3.4. Northernblotanalyse der mRNS aus 6 und 9 Tage alten Hühnerembryonen

Durch die Northernblotanalyse der total-RNS aus den 6 und 9 Tage alten Hühnerembryonen mit einer α -P³²-markierten Einzelstrang DNS-Sonde (siehe Mat), die gegen die N-terminale Region (Bp 361-632) Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase gerichtet war, konnte ein Signal bei 6,3 kB detektiert werden. Dieses Ergebnis bestätigt die früheren Northernblotanalysen, die mit mRNS aus Hühnererythrozyten durchgeführt wurden und die ebenfalls ein Hauptsignal bei 6,3 kB, neben schwächeren Signalen bei 2,8 und 2,1 kB, lieferten (Ergebnisse nicht dargestellt).

3.5. Genomische Teilsequenz der Inositol (1,4,5) P_3 3-Kinase

3.5.1. Sichtung einer genomischen DNS-Bank nach dem Ins(1,4,5) P_3 3-Kinasegen

Zur Analyse der partiellen Genstruktur der Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase sollte das Gen aus einer genomischen Hühner-DNS-Bank der Fa. Stratagene isoliert werden (siehe 2.1.9).

Die Isolierung des Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase-Gens wurde durch Plaque-Hybridisierung mit einer digoxygeninmarkierten DNS-Sonde durchgeführt. Zur Sondenkonstruktion wurde ein 465 Bp langes DNS-Fragment durch einen BspE I/ Sph I Verdau des Subklones (pGem 3z IP3K) gewonnen, welches das 5'-Ende des λ -Klons LC13 darstellt. Dieses DNS-Fragment wurde unter Verwendung des „DIG-High Prime-Kits“ der Firma Boehringer Mannheim mit Digoxygenin markiert.

Insgesamt wurden ca. 300.000 rekombinante Phagen der genomischen Hühner-DNS-Bank analysiert, wobei jeweils ca. 30.000 pfu pro Platte ausplattiert und nach dem Transfer auf den Nitrozellulosefilter mit der digoxygeninmarkierten Sonde hybridisiert wurden. Hierdurch konnten zwei Signale detektiert werden, die auch auf dem Duplikatfilter vorhanden waren. Durch zwei sukzessive Vereinzelungsschritte und jeweils erneuter Hybridisierung mit der digoxygeninmarkierten Sonde konnten zwei positiv rekombinante Phagen als Einzelklone isoliert werden.

Abbildung 17: Die Abbildung zeigt exemplarisch einen Primärfilter mit positiven Sondersignal.

Auf dem Filter sind ca. 30.000 pfu ausplattiert. Der Pfeil zeigt auf das positive Sondersignal.

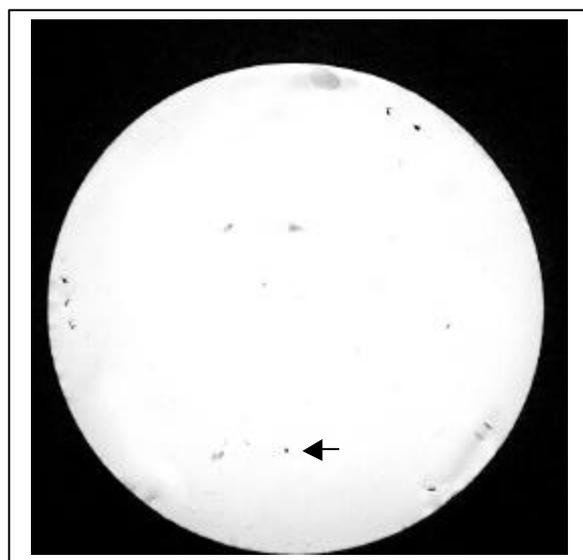
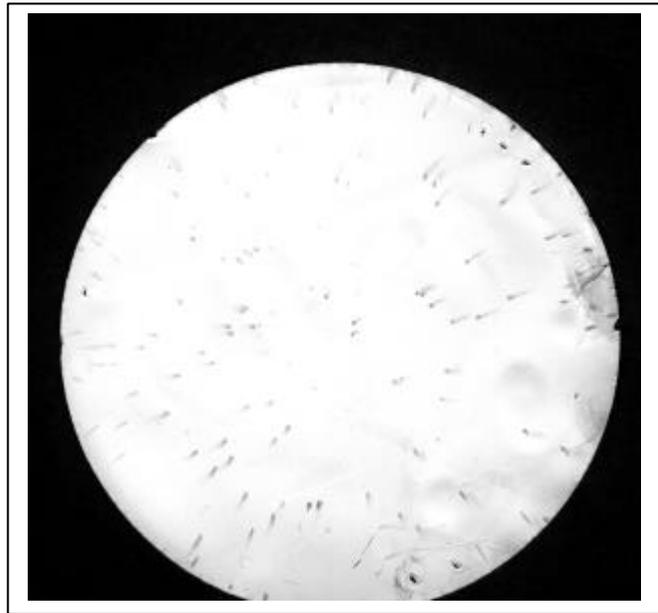


Abbildung 18: Tertiärfilter nach drei sukzessiven Vereinzlungsschritten.

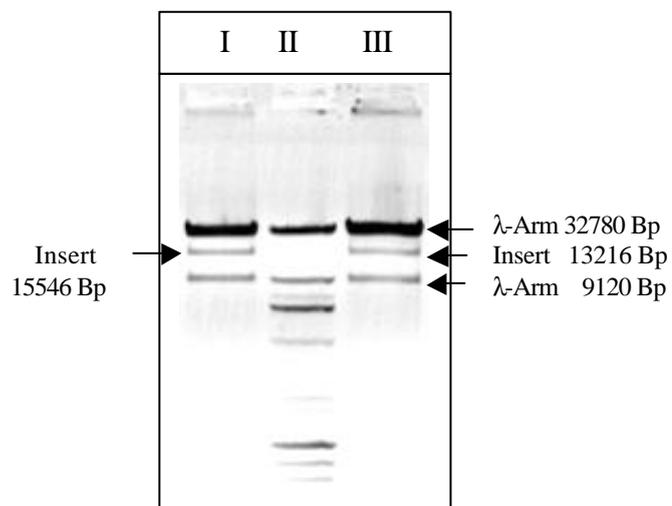
Auf diesem Filter sind nur noch pfu mit positivem Sondersignal vorhanden.



Nach der Isolierung der beiden positiv rekombinanten Phagen wurden diese jeweils durch Plattenlysate amplifiziert und anschließend wurde die DNS präpariert. Die genomischen Inserts konnten durch einen NotI Verdau aus der Klonierungsstelle des Lambda Fix II Phagen herausgeschnitten und somit von der λ -DNS getrennt werden. Nach dem Verdau wurden die DNS-Fragmente auf ein 1% TAE Agarose-Gel mit dem DNS-Längenstandard λ -DNA-Hind III/ ϕ X-174 DNA-Hae III Digest aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Vom Gel ließ sich für das Insert aus dem Klon II eine Länge von ca. 13000 Bp und für das Insert aus Klon IV eine Länge von ca. 15000 Bp abschätzen.

Abbildung 19: Analytisches 1% TAE-Gel zur Darstellung der genomischen Inserts.

I. Klon IV 15546 Bp Insert
II. DNS-Längenstandard λ -DNA-Hind III/ ϕ X-174 DNA-Hae III Digest
III. Klon II 13216 Bp Insert

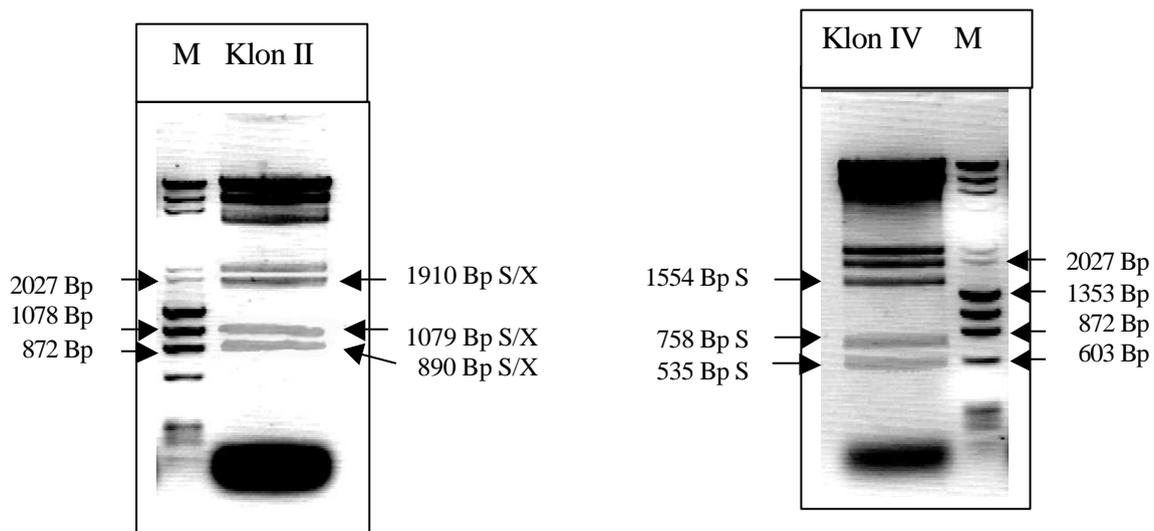


3.5.2. Subklonierung, Sequenzierung und Charakterisierung der genomischen Partiaalsequenz der Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase aus den beiden Lambdaklonen

Zur Charakterisierung der Inserts in den λ -Klonen II und IV und um kleinere DNS-Fragmente zur Subklonierung zu gewinnen, wurden mit den Klonen weitere Verdaue durchgeführt. Klon II wurde mit einer Kombination aus den Restriktionsenzymen SacI / XbaI und Klon IV nur mit SacI verdaut. Die Restriktionsverdaue wurden auf ein präparatives 1% TAE-Agarose-Gel aufgetragen und die Restriktionsfragmente elektrophoretisch aufgetrennt.

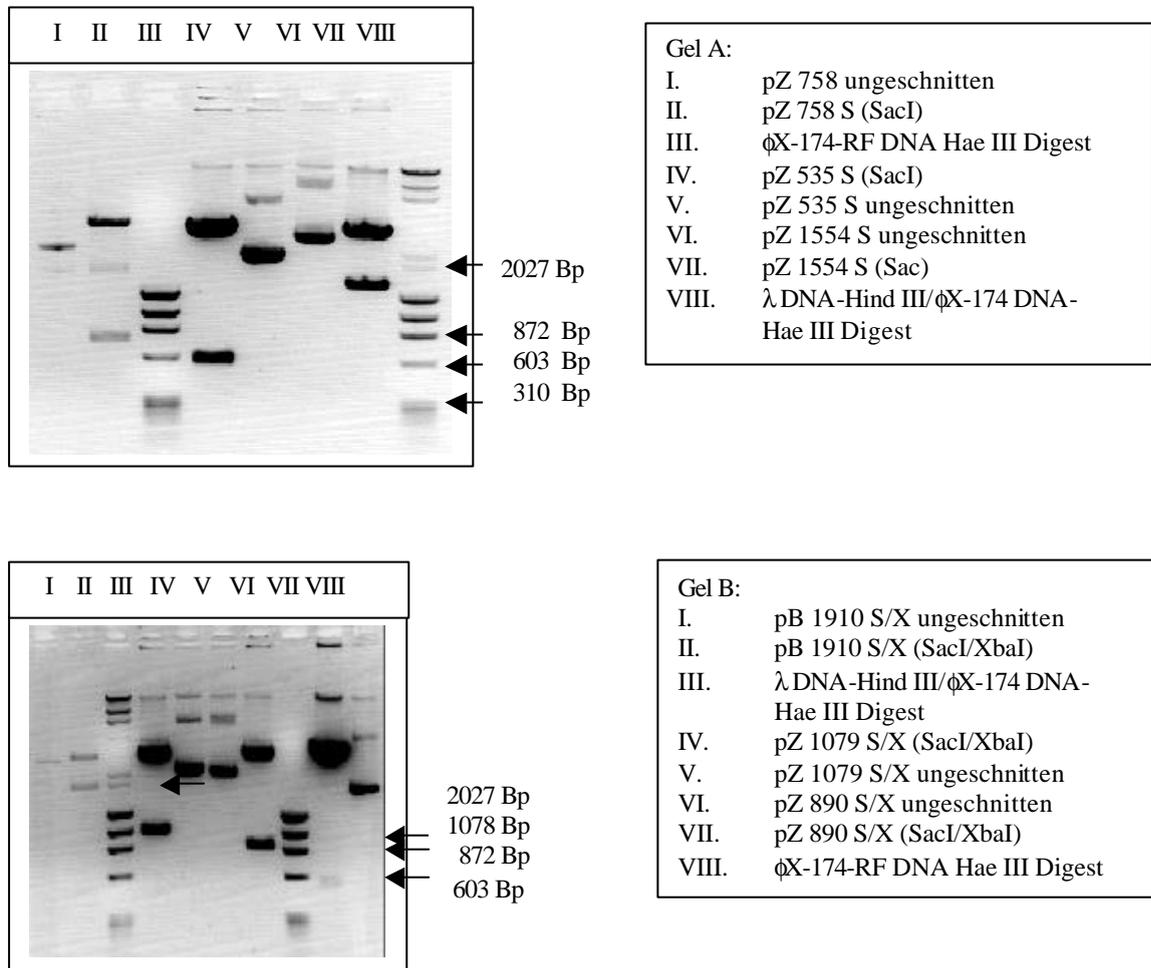
Abbildung 20: Präparative Gele der Restriktionsverdaue von den I-Klonen II mit SacI/XbaI und IV mit SacI.

M. DNS-Längenstandard λ -DNA-Hind III/ ϕ X-174 DNA-Hae III Digest



Aus dem Restriktionsverdau des Klons II mit SacI/XbaI konnten das ca. 1910 Bp große Fragment in den pBluescript SK +/- und die ca. 1079 und 890 Bp großen Fragmente in pZErOtm-2.1 einkloniert werden. Die 535, 758 und 1554 Bp großen Fragmente des SacI-Verdaus des Klon IV wurden ebenfalls in pZErOtm-2.1 einkloniert. Die Subklone wurden zur Plasmidamplifikation in den E.coli XL1-Blue transformiert. Aus Übernachtskulturen der Transformationen wurden die Plasmide präpariert und mit den entsprechenden Restriktionsenzymen die Inserts in Aliquoten der Plasmidpräparationen nachgewiesen.

Abbildung 21: Analytische Gele zur Darstellung der subklonierten gen. DNS-Fragmente



Die gewonnenen Subklone wurden zunächst mit den vektorspezifischen M 13 Forward/Reverse Primern ansequenziert. Anschließend wurde mit internen Primern, die aus der neu erhaltenen Sequenz bestimmt worden waren, die definitive doppelsträngige Sequenz und die genaue Größe des Inserts bestimmt.

Die erhaltenen Sequenzen wurden durch Computeranalyse mit dem Programm „DNA-Strider“ auf Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase-Sequenz untersucht und mit der Datenbank des NCBI über den Blast-Server abgeglichen. In beiden Fällen konnten keine Homologien zu Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase-Sequenzen festgestellt werden. Allerdings fanden sich in dem Subklon pZ 890 S/X (Fragment aus dem Lambdaklon II) CR1-Repeats und eine GATA-Box als Bindungsstelle für erythrozytäre Transkriptionsfaktoren. Das ließ die

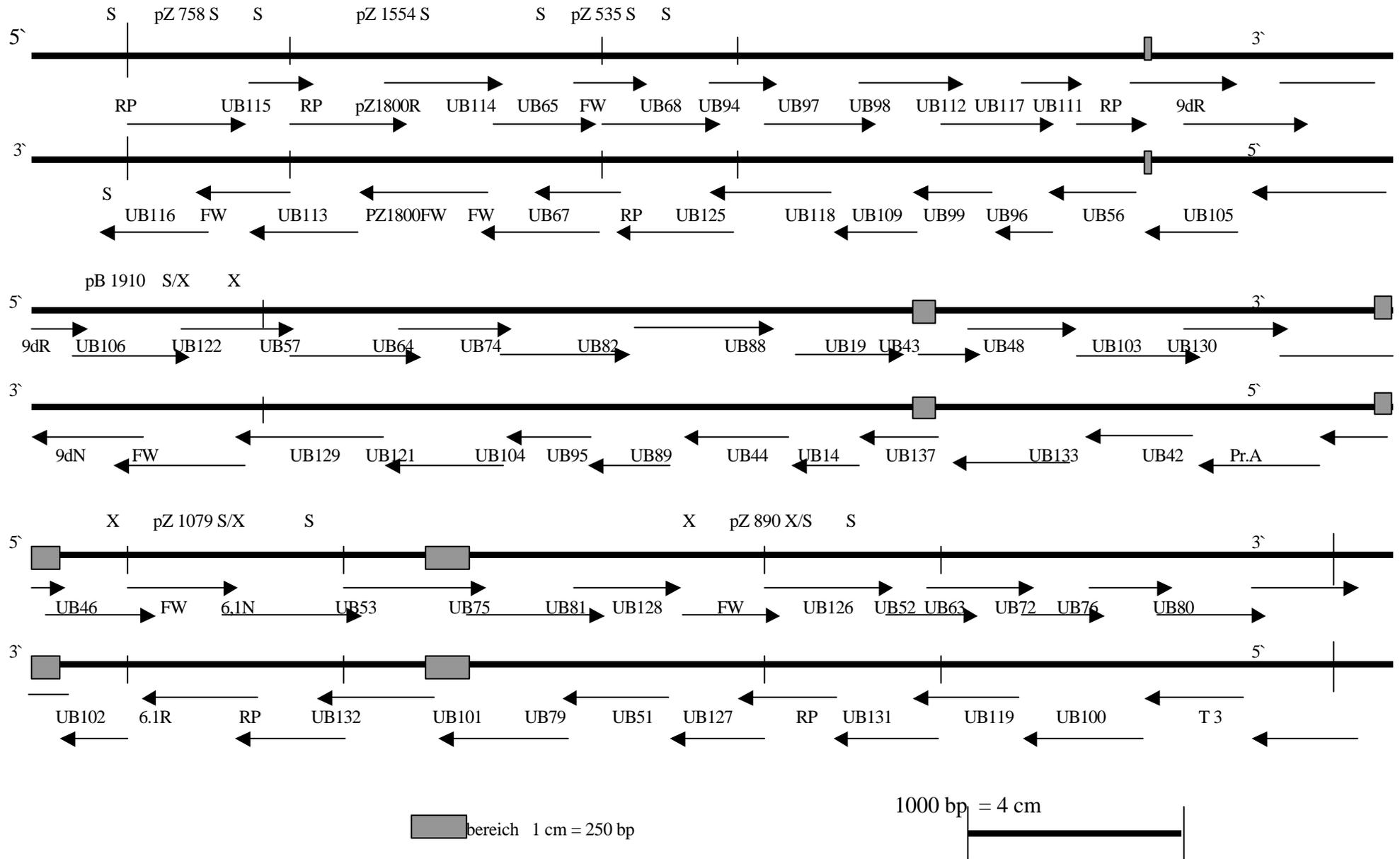
Vermutung zu, daß wahrscheinlich die Subklone in intronischen Sequenzbereichen des Gens liegen würden.

Zur Bestimmung der definitiven doppelsträngigen DNS-Sequenz der λ -Klone sowie zur Lokalisationsbestimmung der Subklone innerhalb der beiden λ -Klone II/IV und der Lage der Subklone zueinander wurde eine „Primer walking Strategie“ angewendet. Hierbei wurden die genomischen Klone sukzessiv mit Oligonukleotiden direkt sequenziert. Die Sequenzierung startete zum einen aus dem die Inserts flankierenden λ -DNS Bereich mit dem T3 und T7 Primer sowie mit Oligonukleotiden, die aus den subklonierten und bereits sequenzierten Bereichen starteten.

Abbildung 22: Sequenzierungsschema der genomischen Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase Klone.

Die Pfeile deuten das „Primer Walking“ zur sukzessiven Sequenzierung der λ -Klone an. Die bereits klonierten Subklone sind mit ihren Schnittstellen für XbaI/SacI in die Gesamtsequenz eingeordnet. Die Exonbereiche sind durch die eingefügten Kästchen dargestellt.

Schema zur Sequenzierung der 18499 bp großen gen. Partialsequenz der Ins1,4,5-trisphosphat 3-Kinase in den I - Klonen II / IV



Die auf diese Weise erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms „PileUp“ gegeneinander auf Überlappungsbereiche abgeglichen und anschließend zur Gesamtsequenz zusammengefügt.

Die Gesamtsequenz der beiden überlappenden λ -Klone erstreckt sich über 18.499 Bp, in der sich vier Exonbereiche identifizieren ließen, die 27, 96, 213 und 204 Basenpaare groß sind.

Abbildung 23: Aus den I-Klonen II und IV zusammengesetzte gen. Partialsequenz der Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase.

Innerhalb dieser Partialsequenz von 18.499 Bp sind die vier Exons durch **fettgedruckte Buchstaben** gekennzeichnet: I. 4892-4918 Bp, II. 9969-10064 Bp, III. 11924-12136 Bp, IV. 13821-14027 Bp

GAGCTCAAT	AACCCTCACT	AAAGGGAGTC	GACTCGATCA	ACTCAGTTCT	ATCTTGGTCC	60
TCCATGACTA	AACTAGACTG	TGGTTTACAG	ATATATGTCA	AGGCAATTTG	AGTTTCCCTT	120
GTTGAAGGTT	GTTTTTGTCTG	ATGCCCTGG	AAAGCTCTTT	TCTGCTATCT	CACTGGAATG	180
TCTTATTTCT	GTCGGAAAT	AAAGCCATTT	ATTTGTGTTC	AATCCAGTAG	ACATGGATAC	240
CAACTGGCTG	TCCTTGTGTT	CTCTGTTTCT	TATAGGAAAA	AATGAATTAT	AGTGCAGTAG	300
TCTTCCATAA	TTAGAGTGTT	AGGATTCATG	TATATCACTC	ATTTCCCAT	AAGCAGAATC	360
TCAAAGGTGT	GTGGGGTACA	GCTTCTGTGG	CCCATGTGTG	GGGACATACA	GTAGCATGGT	420
AACATCACAG	GATGCGTTCA	CTAAACCAAG	CTGTTAGGGT	AAAGAAGGGA	GAAGTCTTTG	480
ACCAGTTAT	AGAAGGCAAA	TCATFACTAT	CAGACCAACT	GCAAAATGT	GGCCAATGTG	540
TTTAGCATTG	AATGAGAAAT	TTTAATAAAA	GATGTCCATT	TTTTTCTCTT	TGTTCAAAC	600
AGAGTTTGT	CTGTGGATAG	TGAATTATTG	AGGTGATAAA	CTGGTGGTGA	GCCTAGGCTG	660
GACGTGCAGG	CTAGAGCTGT	GTGTCTAAGT	TAGCCTGCAT	CACCATAGCA	AATGGGATGA	720
AATGTGTGCT	CAGCCTCCTC	CTCAAGTGCC	TGGAGCTCAG	TCAGGGCAGA	TTAGCTTCTT	780
GAAGTTACTT	CCTGGCTTCT	TGCCCAAATG	CAGTCTGTCT	TGATGTTATA	CAGAAACCAT	840
ACCTGATTGG	CACTTGTAGT	ACCTTGGGAT	TTGAGGTTGT	ACACGGTTCA	CAAAGCACAG	900
TTTTCTATGC	CTTGACAAAT	TGTGAATATG	TTTTAAGCTG	GATGTCTTGG	TCTGTGTATA	960
AAGATGTGTG	GATAAGTTTG	GGTTTAATAT	ATTCCAAACA	GGATGAATAT	TTGGGAGCTG	1020
ATAGTTGTGA	CCTCTCTAAT	AGGCTCTTTT	TTCTTTTTTA	ATCTAAAGAG	TGTGGTTTTT	1080
CTAGATGTCC	TTGTCTCATG	ACTGGTGTCA	GTCAGTGACC	CATGACTAGC	AGAGGAGTAA	1140
TGGAGGATGG	TCACAGAATT	CTCAAGTTGT	CTAACTGGCA	TAGAAGGCTT	CTGAGGAATT	1200
AAGTGCAGT	TGTTTTGGAG	GTTAAGAAAG	ATTTCTTTCC	TTCTGCCACA	CCATCTGCCA	1260
AAGTGATATT	TGATTTACCA	CAGAATTATT	CTGGGTGATG	GACAGCTTAG	ATAAATTTC	1320
AATGTCTGCG	CTCTGAAAGC	AAATCAACTT	TCTTATAGCG	AGGCAATTTT	CATGFACTTC	1380
TTTAATAACA	TTTTTGTTC	CGGCAAGACT	GATGTTCTGA	CAGAACATCT	CTCATTCAGT	1440
TTCCGCCAGC	AGGGAGAGGT	GGCAGAACTC	GTCCTTATTG	GAGAACCAGT	GTCTTTCAGA	1500
GCAAAGCACA	AACTGTGGAG	GTGGAGATAA	TGGCCGTGGT	AATCTCATCC	CTCAGAACAG	1560
CAAATGTTTA	CTTTTTTATTA	TTTCGGTTAA	TGATATTGCC	CCTTAAAAAT	AGGCTTCTAC	1620
AGAGTGCCTG	TGATAAAGTA	AACAAAACCC	ATCTCATTTCC	TTTGGCTTTT	GGCCTGGGAG	1680
TGACACACAG	ACAGTAGATA	TCTTAGTTAA	TGAACAGAAG	CAAAATACAA	TTGCTATGGA	1740
GTAGTGCAGT	GACTGTGGCT	CTTGGTGTCTG	TTTGCAGAA	GGCAAGCAGT	GCTTTCACGT	1800
TGTTGCGCTG	CTTTCTGATT	TGAAGGGCCT	CTCCTGGATT	TAGAGGCAGA	ATCCAGCTGC	1860
AAAGTGGGTT	GCGTTTAAAT	TTGCACTCTG	TGTAATTCGG	TGGTCTGGAT	GCTGCCCAAC	1920
AAATCTCTT	GCTTTCACTT	TTTCCTTTAG	TCCAGCGATA	ACAAATCTCA	AACAACTTA	1980
CCAAGTATCC	TCCAGGGTAG	CAAGCCAAAG	AACATATGCA	TCTCACTGCA	TAACGCATGG	2040
TGAGGCGTGA	CTGAGGAAAA	AATGCAGGAA	CCTGAGGCTT	CTGTCTTGCA	GCTTTGTTTC	2100
TGCTTATTGC	ATTAAGTGT	TCTCATGACT	CTGAAGAATT	AGCTCAGCCC	ATCTTGCCCTG	2160
TGGTACAAAC	AGGAAATGAA	AACCTTGAC	TGGAGGATA	CACCTGCCAA	GCGCTGCTTT	2220
GAGCAGCTGT	GGCCATTACC	CATGGTTGAG	TGCAAAAACCG	GAAGTGTC	AGGCTACGTA	2280
CGGGCTGAGC	ATTGCTTTTC	AGAGCTCTGG	AGGCTGGATG	GTGAAAGAAG	CAGAGATGAA	2340
GGTGATGTCA	CACTTTGCCT	GGCAGCCTGT	CTAGAAGTGC	TAATCAGGAA	GTCGCTCATG	2400
CAGCATGCCAA	ACTGCCGCTC	TCCTTGAGGA	GTGTGTATT	TCCCTAGCTG	TTGATCATCG	2460
GTCTCCAGC	TCCAGTTGGC	ATTCAGATGC	TGCAGGAAGC	TCTGCTGTGT	GAGAAGAGC	2520
ACGTGTTCTG	TCCTTGTGGG	CTGTGCTGAC	TAAAGTGGGT	ACGAGGGTGG	TCAAGTTCC	2580
CGAGGAGTTT	GGTGTGTAGA	GATTGCTCTG	TAATTTCCCT	AAGCAGTGTA	ACGGCATCCT	2640
AGATTATGTT	CCTGAAGTGT	CAGTGTAACA	GCATCTTAGA	TTATGTTCTT	GAAGTGTGAG	2700
TTGACAGCAT	TTGAAGTAAT	ATGGCTGCC	TGACAGAAGG	CCAGCTGCAG	CGATTTGGAC	2760
AAATTGTGAG	TTGATGTTGG	TTTGCATCGT	GCCTCTGACA	GTCTGAAGAA	TGGATGATGC	2820
TGATGCTTAT	CAGCTCAGGG	CGCGGACTTT	TCCAAGTAAG	CACTCAGAGC	TCTGGACCCT	2880
GAGCTGGGCA	AGCTGTGGTG	CACGTTACCA	CTCAGCAGTG	TTTTGTTTTC	AGACCTAAAT	2940
ACCCATCTGT	CTGGTGTATGA	ATGTTTGCAT	CTGGGAGTGC	TGTGCGGAGT	AATGTTTATT	3000
GTGTGCGTCA	GAAACCTGGT	CATAGCGCAG	TGACAAGAAA	GGGTGAACCA	TGGTAAATTC	3060
AGGGCTAAGT	CATCTGCTGT	AAAAGCCTAA	CCCCATCTTG	GGAGCTAAAT	CAAGTCTGTC	3120

Ergebnisse

ACTCAGTTTT	AATGGTTTTGT	GTGAGTGTFT	GCTTATACCT	TCCTGTCTGG	ACTTGCTTAG	3180
GAAGCATTCT	TCTGTGGG	TTGCTCTTTC	ACCTCCCACC	CATTGAGATC	TTTGTCTTGA	3240
TTGGTGATT	ATGTCTGATT	CAGACAAGTG	GGTAGCAGAC	TTGGCAGCAA	GAACCTCCTC	3300
AGTTTGAGGA	TTCAGAAAAC	CTTTAATAAG	GGGAAAAGC	ACAGAAAATA	GCTGTGCAAC	3360
ATCTACACCA	AGTGTACAT	ATGGTAGAAC	TGGCTTTATT	GTTTGGGGAC	TTTTTTTTTAG	3420
TTATGGGCAA	ATCTTGCAAA	TCTTAATTCC	CTGCGCAGAG	TTTGTGTGCG	TACCGAAGTC	3480
CTGTGTCTT	CCAACAAATA	AGGAAAAATT	ACAGATATTC	CTTGACTTGT	CTGCTGCAGT	3540
ATGATGCCTT	GTTAGGTCTT	CTGATTTTTT	TTCTTCAAAT	ACTGCCTGAT	CCCAAGCCTA	3600
GGAGTTTTTA	TGGTCTGGAC	GATAACAACA	AGTTATGAAA	TTCTGATAGA	CTGCAGTGAA	3660
AAGCTTTTGC	TAAATGCTTT	AGATATTTTC	AAGTGTGCAT	GTCTGTATAT	AGTATTTAAA	3720
AAAAACACA	CACAACAAGG	ATAGTTATTA	ATTGCTTACA	TTAGGCATAG	AAGCATTAT	3780
TGCTTCAGGA	TCTGAGTGTG	ACCAAGTCAG	CTGCCTGCCT	CTTTAGGTCT	GCAAATACAA	3840
CTATATAAAG	CCTTGAACTG	AAAGAAATCA	AAACCAGGAT	CCCTCAGGAG	ACAAGTTCTG	3900
CAGCTATACT	GATCTCCTGT	TGCTCAGTAG	CTTTCATTAC	TTATGCTTTT	TTTAGATAAG	3960
TTATCATTCA	AATCCCACAGA	TCACCTCCATG	AAATGAAACT	GTATGGTTGG	CTGTCCCAGA	4020
GCCTCCCACT	TGAAGCAGCG	AAGTCCCTCA	ACTTTCGATG	TTGGCAGCTG	TGAAGCTGCA	4080
CCTGGGGCAG	CCTGTCTGGAC	CTGTGGGGGA	TTATGCTGAT	GACGACTTGT	CTTGGTAGAA	4140
TATTGTGATT	CATTGTAAAA	GTGTAATCCT	CTTTAGGTTG	TTATTATAGA	ACTGTAGTTA	4200
TTGATTACAT	TCTCACAGGA	AGCATGTCTG	AGTAAAGGGT	AATTAAGTAG	ACTAGTAATT	4260
GTCTTGATTG	TTGTCCACTC	AGTGATTTCA	TAAAGAAGCA	TTTTATGGCA	ATAGCAGGTA	4320
GTGCTGCAGT	GTCAGCAGATG	AAAAACAAAC	CTTTTTCAGG	TTAGCTTTAG	TTTATTGAAA	4380
TAATACGGCT	AGTAGCATTG	GACCTATTCC	AAGCCCTTTG	TATACAAGCT	GCTCCAATGT	4440
ACCAGGTGAA	AGCCACTGCA	AATAGTGGCA	AACAGTACTG	AAAACAAAAT	GGAATATATT	4500
AATTTCCCTT	TCCAAATTGA	ATGAAATAGT	TGGGTGAAAT	AGCATGAAGA	ATTAAGCAAA	4560
CAAAACAAAC	TAGCTTTTGA	GCAAACTTCA	CTTTTAATAA	ACTAAGGGGA	GTAGAACAGT	4620
AAAGGATTTT	GTAGATTATT	AACTCGGTTT	TAAAACTTT	AGAACCCTAT	GTTTTTAAGT	4680
AAATATGTAT	GCTTACGTAA	GTGAAGCAGT	CTCTGAAACA	CACCTTTGCTC	AGAGGGAACA	4740
GATCTTCAAC	AGGAGCTTTT	TGCGGGACTA	CTCTGCCACT	TGTTACATA	GCTACTTCTG	4800
AGAGCTCTGT	GTAGTCTGAC	TGACTTTTGT	ATGATTTGTT	ATGTGACTCA	GAGTAATAGG	4860
GTCCTAGCAT	GTGACCCAGG	AAGAAAGAAG	TAAACAGAAGA	GAAAATCATG	GAGGAAAGGT	4920
GAGCCGCTGG	GGATGAATAA	TATGGTACAC	AGGGAACTCA	GAAGTACAT	CCTGCTTAGC	4980
AGCACTTCT	TTCGGCCTAG	GACCCACTAT	GCAGAAGAAG	GTTTCAGCTG	ATGCATTCTC	5040
AGGTGTGCT	TTCCAGTCA	CTGCTGTTAT	GTTTACTCTG	TCCTGTAAGA	GGCCAGCAC	5100
CATCAATTAC	ATCACGCGCT	TGTCAAGCTT	GCTGGTFTGC	GCTGAGTTGG	CTGGGACTGC	5160
CAGGCAACGT	ATTGCTTAGT	GCTTTTTGTGA	TTTGGGTGCG	TGATCTTAG	AGAATTATTT	5220
TGAAATGTGT	AGCAACCTTC	TGATGGTTAT	AGTTTTTTAT	ATTCCTTCGA	AGTGCCTGTG	5280
GATGATCCT	TTGCCGTAGG	GGTGTGGTG	GGACTGAG	TAGGCAGTGG	CACCCGCAAT	5340
ACAGATCGCA	TTTCAGCCCC	CATGTCCACG	AGCTGCAGAA	TTTAGCTTAA	ATGATGCGAA	5400
GACTTTAAGA	GAATGGTGGA	TGATGATAAC	TGACGATTAA	GTAATCTGTC	TTTATAGCCT	5460
TTTAAGAAAA	ATTATAATGA	AATTTCTCAC	TATCTTTTTG	TTTCTTGCTG	TCATAATAGC	5520
TCTTTGTAGG	CTTCCGTAGG	CTTTGTACCA	GAGCAGAGAA	AAAAGGCAGC	AGGCTCTTAG	5580
ATAAAGAAAC	TACTGAAATT	GTCCTGGAAA	AAGGTTGCAG	AGGTTGTTGT	TAAGTACTGT	5640
ATAGCAGAAT	TGCCATGAAA	ATCTACCAGC	TCAGGCAAGA	AACTGCTACT	CTGCCCTGCT	5700
GATGATAGAA	AAATGAACTT	AGGGGCCCTA	TTAATTTGTT	ATTTAGTTT	ACTTCTGTTC	5760
TTTAACCTC	CTTCCATTTCA	AATAACGTGC	GAAATTTATT	AGAGCTGTTG	GATTATTATT	5820
TTTTTTAAAT	CTTCCCTTCC	CTCTACCCCC	CATCCCTATT	AGTTTAGATA	TAATTTGGTGT	5880
TTATAAAATG	TATTTGTTTT	AATTAGGACT	CTGTTCTGCA	AATTCCTCTT	TACACTGCCT	5940
GCTTGCTCTG	TCAGTGCTTG	CCTCAGGGTA	GTTACATGTG	GGGTAGCTGT	TGGCAGAAGT	6000
GAGGCATTTG	TTTTTGTTTT	CCCTTGAAGT	AAGAGGAAGA	TTTTATTTTT	CCATCAAACA	6060
GGTTCAAGTC	TCTGTACCTT	GTAGCCTCAG	GTCAGAATAG	ATCTGTCCCT	GGGATATTTG	6120
GTATAAACTC	AGTGAGACTT	GAGTTGTTCT	ATATAGCCCT	TAAAACAGCA	TCAAACAACA	6180
ACAACAATAA	AAAACCCTAT	ACAGATAAAG	GAATACTCTC	AGCAGACTCC	ATTTACCTGT	6240
TCAGTGAGCT	TAGCTATTTA	GATGTTATAG	CCCTTCTCCT	GAAATAGTGG	GAGGTTTCAG	6300
GAAAGCAGAT	TAATTTTTGT	GAGAGCTGAG	ACCTGATCCA	AAACCCCTCA	GAGCAAAATGA	6360
GCCTGCTCCC	AGTAAGTGTA	GTGAGTTTTG	CTCAGCCGTA	TCCTACTGGT	ATATTGCGGT	6420
AGAATCATGA	TGGCTGTGCT	TCTGCATAGT	AGTAATGTAT	GAAGCTGTGC	TCTCATCATG	6480
ACAAGAGACC	TGGAGGAAGC	TGTGCCCTCA	GGAATCAGTG	GCTCCGAGTT	GCTGTTTATC	6540
TTTGATTTTT	AATGGGATAG	CTGAGATGGC	AACAGTGAAC	TCTGTCTAGG	GTTGCATGGT	6600
CTGAAAACCT	TCATCTGCCC	AGTACATATG	TATATGCTTC	AGTGTGTGTC	TTCAAATTCA	6660
GTGATTCAAA	AGAGCAGTCC	AGGTAACAGT	GCAGATCGAT	GTCTGGCACC	AAGACACAGT	6720
CCTTTGAATG	CCTTGTGGCT	TTGTTACTAT	GTTTGTGTG	GGGATTGGTT	CTTCCATTCT	6780
CTTCCACAGC	GTTTTTGCTC	TTTTTGCTAC	CTAGCTGCTG	TTGTAGTGGC	ACAGCCCTGT	6840
ACATGCTCCT	TACAGAAATA	CTAGCTGTTG	TCCTCTCAA	GCAGCCACACA	TCTTTTATTG	6900
CAGCATCTTT	TATGGTTATA	TATGTGTGTG	TGTGTACACG	TATATGGATG	TGTTAGTTAC	6960
AGTTACACTG	GAGTAACTTA	TATGCTGAAT	CTAAGAATAT	TAACATTTCA	CACCTTTGCC	7020
TTTCAGAAATG	CTTTTTTCTT	ATTGGAAAAC	TCTTAAAGTAC	ATTGATCTTG	AGGCATTACG	7080
ACAGTCTTGG	TACAGAGATC	TAAATTTTCC	CTGTACATAT	GTAAGTAGCA	TAGGACACTG	7140
AATGGGAATC	TAGAAGAAAC	GAGGCCTGGA	GAAATCCAGC	CAAAGTAGAA	GATCAAGGAG	7200

Ergebnisse

AACTGAACAG	AAACGTAGAA	GAAAGGGGG	TGAGGGACAT	AAGGATGGCA	AATACACATG	7260
GGTAATGGCA	CCAGTCTTAG	CTGCTATTGC	AGCATGAGGC	AGTGATTTGA	AAAACACTTA	7320
TCACTAACAA	AGAGGAAGAT	CTTGCTTTAG	AAATAGATGT	GAGAAAGATT	CCTCCTACAG	7380
CAGGCATACG	AAGTTTTTCAT	CTTCCCACTC	ACGCCACTGC	TCCAACAGCC	TGCAGCCCTG	7440
TTTGCATCCT	GCAGTTTGCA	TCCTCAGTTG	AGTGGGGTTG	GAGACTGAAA	GTTGCAGTAG	7500
GAAAAAGTAC	ACTTGCTGAA	CCTCTGCCCC	GGACAGCTTG	CCCCACCGAT	ACGGGGCTGA	7560
AAGTGATCTT	TTCCACCTA	GCTCCAGTCT	CCATCTTTCC	TTGTCTTAGG	GGAAAAAGGG	7620
TTGTGAGTAG	ATATAAAATA	AATAATAAAA	TAAAAAATTG	TCAGCACTTC	TTATTGTGTG	7680
AATGCCTCAT	ACATATTCAT	CCCAGGCAGC	TATAACCTAA	GCAGTCAAAT	TTCTCTTTGA	7740
GCTGAAGTTG	AATTTGGCCC	ATTGTCTTTT	CTTCACACCC	ACATCACAAA	TAAAAGCTGC	7800
AGCTTTTGGAG	GGGTGGGTGG	GAGGGAGGAG	GTGGGAAAGC	CACTAGAGTG	TGGTGTGCA	7860
CTGACAGCTG	ACATGCAATC	CTTGGAACC	TGTGCTTCTC	ATCACTTCTG	GATATAGCAG	7920
TATGACACAT	CATTGGGAGA	CATGATACAG	TATGTTAGGA	GTGGGACATC	ATGATGAGCA	7980
TAGGATCGTT	ACAGAAGGGA	TATAGAACAC	TGCTGACTTC	TGGTGTGTTG	GCCAGCAATA	8040
CAAACCTGAA	ACTGGCTTGG	AATCTTGAAG	AACTTCAGTT	TAGGCAGAAG	TTACGTTTCC	8100
AGGGATTATT	TCAACTCAGA	ATGTTTACTT	CCAGTTGTTC	TGTGAATAAC	TTTGGGCCCT	8160
AATGCTCTCAT	ACAGAAAACG	GAGGAAAACA	GAAAGGCTTT	TCCTGTCTGC	TAAATAGCCT	8220
ACGCAGAAAT	CATTTTTAAT	CTCTTCTGCT	TGAATAACAA	TATTTACATT	GCTCTTTCTT	8280
CCAGAAGGAG	GTTTTGGCCA	CTTGACAGGTG	CCATACAAGT	ATCTCTCATT	CTCAGTACAC	8340
TGCAGTTAGC	CCTATGCTAG	AGCGCTGCTG	CTGCTTAGCA	GTGCACGGTA	GCAATCTGGA	8400
ATGATTTAAG	GCAAAATAATA	TACCGTATGA	TACCGTAGGG	CGGTATAAAC	CTGCAGTAGG	8460
GATTTATTAA	ACTGTAACCT	AGCTGGAGCC	GGTGACATCT	GTGGAGTTTC	AGCTAGTACA	8520
TCCGAGTCTT	CGTGGTTCTC	TAACATCCAC	AACTTTCTTT	GAATGCTTCC	TCTTGTCTAGC	8580
GCAGTATGTT	TACGAAAGTA	TTACTGCTGT	ATGGGAAACT	TGGCTCGGGC	CAAGAGTGAC	8640
TTTCACTTGA	ACTGCTTTC	AAACCAAGAT	AAGTTAAATA	GGAAAGCAGT	CTTATTTTCAG	8700
AAAAAGTGT	CCCGTATGGA	GGTTATATTT	TGTCAGTTCA	AGTTGCAGCT	TAACCTGAAA	8760
CTTCCCTGAG	GAAAAATAAA	TCCCAAAAAG	AAATACTGCT	TGCATCTGTG	AGTTTATACA	8820
TCCTCCTGGT	ATGTTGGTAA	GCAGCCACCC	AATTTTGGCC	CCACACAATG	ACCCATACTG	8880
CTATAACTGA	ACAAATCTGG	GCGGGGCGGC	CAGGTCAAAG	CACGATCTGG	AGAGCTACGC	8940
TTTGCCTGTG	TTTCATTACT	TGCAATTTTA	CTTTGTGCTT	TGCACTTCTG	TTCTGTTGTG	9000
CATAGCCACT	ACATGCTCTT	GCAAGCTCCA	GTTTTTTTTCT	CCAGCATGGT	GTAATGCCGT	9060
AGTGGTGGAA	GAAATGAGCC	TACCATCCTT	GTTTGTGGCG	CACTTTAGGA	TTCTCAGCA	9120
TGTAATGTGC	TTGCTAGTAG	CTGTGGTTT	TAACCTGCCA	GGGTTTTAGT	CCCAAAGCAT	9180
GAGACCCTAT	TTTGTCTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTCATCC	CCTTTGTGAT	9240
GGAGCACTCT	GCTGCTGTTT	GTGAGCAGCT	GCTCTGTTTC	CCTGCCTGCC	TGGAGCAGTA	9300
TCCAGACAGC	TGCCACAGGG	ATGGCAAAGG	TGGCCAGAGC	AGTGACTGGG	TTTGTAAAAA	9360
AGTAACGAGA	GCCGAAAAGA	GGGGAGTGAG	TGGGAAAATC	CGTGACCTGG	AATAAGTTGC	9420
ACTGCTCACT	GCCAGTGAGT	GCTACAGGGG	CACTGAATGA	ACTATGAGCC	TGATTAGTAA	9480
TGTGTGTTCT	GTGCGCCTAA	GACGATGAGA	CTGACTTGTT	GACTTGGTGA	AAGCTGTTAA	9540
TTGTGACGTG	ATGCTGAAA	CCTCTGGGAA	AGGAAATATT	GCTGACAGTG	GCAAACAGCT	9600
CATATTCATG	TCTCATGGA	ACTTAAATAT	GCGTAAGTGT	AGTTTCAGCG	TCTGCTCTCT	9660
GCATGACTCC	GCTGCAGAGA	GAGGGCCAGG	TGTGGCTCAG	CACAGGCCTG	TGGTGTGCAG	9720
CATGACTCTT	ATCTTTTACA	GACAGCTTTC	TGTGGATGTT	TAGAGCATT	TATTTGACTA	9780
TGTATGTCTG	TTATTTTACA	AGTGTATTTT	TCCGGAGATG	ACTGCAGTGT	TTGTTTTATG	9840
CTTCTACCTT	TGACTCTTA	CAAATCAGCG	GCGAGCAATT	CAGTGTGCTT	GAAGCTGTAT	9900
GGTAGGTTTA	TGATACGTCA	GGATTTCAGA	TTTTGCCTGA	TTTAAATATT	CTTTTTTTTG	9960
CATTCCAGAA	AAAGGCATGG	CATACAATTA	AAACCATGGT	TAACCTACCA	GTGATTAGCC	10020
CCTTCAAGAA	ACGCTACTCA	TGGGTGCAGC	TGGCTGGACA	TACAGGTTGG	ATGAGTATCT	10080
TCAACGTGGG	GCCTCTGGA	ATGTGGTGTG	GGATCATTTT	TACCGACTGG	GTAGCCAATA	10140
TGTTACTCCT	GCTAGCTGAA	ACATTAATGT	CCTTGCATTT	ATGCACCGCA	GCCTTGACAA	10200
GGACAGGTTT	TCTGGTACCA	ACCCAAACT	CTTGGCATGA	ACATAAGCCC	TTGAGAGGAA	10260
AGCAAATATG	GTGACAGTTG	ATTTGGTGGC	CACGTGTTTT	CGTAGTGAGG	ATTGTTGTTA	10320
TTCACTATAT	GCATGCAATG	CGTATATCAA	CTCAATCAGC	TAATTCTGAT	TTTGTGTCAG	10380
TAAAAAGTTAG	TCGGTGTGCT	CCTGATATAG	GATTAATGTC	ATTGATAAGC	TTACAACAAA	10440
CAAACAAGCA	AAACAACAG	AAAAAAAAAA	CACCAGTAAG	GAGAAGTCAT	CAGGTTTGCT	10500
TCTGTTACGC	TTCATTTAAT	TCTTATGCAG	CCCTTGTTC	CTATGTGCTA	GTGTGGGGTT	10560
TATTAGTACA	ACGCTGGGCA	GGCACCTACG	CTGCATCGTG	CTTTAATGCA	GTACTCAAAC	10620
CAGCTCTTTG	TATGTTAATG	CCTTAAATGTA	GTGCCCTTCA	GGGCTGTGCA	GAGAGATTTA	10680
TTTAGTCCTA	GAAATGGAGT	AGCTGCATTT	GCCTAGTGGT	GTACTGACCT	GTATCACACA	10740
GTGCCAAGAT	GACTTTGTCT	TACTGTAGTT	TCTATCACAG	TGTGTCTGGG	TCTGGGCTTG	10800
GCTTGATCTG	TGTGGAGTGT	TGCATTGAAT	GTGTGTGTA	TCATAACCCT	TCTGAGTGTCT	10860
TTGTGAGGTT	GGAAGAAAG	GGTTGAGAGG	TTACCAAAGA	TAATTAGGAG	AGATACCGTT	10920
TCTGTTTGCT	TTTGATAGTT	TTCTGTGGTT	GCATTTAGTC	CATCATTTTT	GCAGCTGTTC	10980
TTCTATGATA	TGACAAGTTT	CTTCTGAACT	AAAACCTGTG	CCATCGTCAC	CCTAGCCCTT	11040
GTAAATGAGCC	AGTGTCAAGT	CCACAATTC	TCAGCAACGA	ACCAGTTTGT	AATGGCTGAA	11100
AGATCCCGCT	TAGTAAAAAG	TACAGTGCTA	GCGACAGGTT	TAACGAGGCT	CCTACTTTGG	11160
GGCCTATTTT	CTGTTGTGAA	GATTAATAA	AGAGTACTTG	TGAATGAAGC	ATGTACTTTT	11220
CTCAGATGTT	ATTGGCAGGC	TGCAAATTC	GCAGCTGGAG	TGTAATGACT	GCTTATCTTG	11280
GCTTATGCAC	ACTCTTTCAT	TTGTACTGGA	TACCGTTCAG	ACCCGTGGCT	GTGAAAAACA	11340

Ergebnisse

TTGTGCTGCA	GGCTGTACCT	GCAGATTAGC	AGGGCTCCCC	GGGGCAGGCA	CAGTACCTAG	11400
GTGTGCGTGC	ATGTGCAGTC	ACAGACTGTG	CATGTAGAAA	GGGCAGTACT	TGGCTTCGTG	11460
GTCACCTGATG	GACTGCGCTG	CTTTGGGATG	TACGCACTCA	GCAGGTATAC	CTTATGTGAG	11520
GATTAAGGAT	AAAGCCAACA	CTGACAGGGT	TATGCAGCTT	TAAAAGAGCC	CATCAGAGCA	11580
TTAAGGAAGT	ATGGCTTGTG	GTTTCTTCTT	GTACGTTTTA	GTAAGTATAG	TAATGTTTTAA	11640
TATCCTAACA	AAGAGTTTAG	TATGGATAAA	AAAAATGGTC	TGGAGCAGCT	GCATTCCTTA	11700
AAGCTATAAA	TTC CGATGTG	GGAATGTATC	CAAATGGATT	TTTGCTGCCA	ACAACTGTTT	11760
GCTCTGGGTG	TTTATTTTTT	ATGAGAGGCA	TGTTAGCTTT	TCTTGTTCCG	GGAAAATCTG	11820
TCTGGTGTC	TGCTGCTGAG	GTAGATGAGG	CTGGAGTAGT	GGGGGAAGGT	GCTTTTTCCCT	11880
TTTGCAAGTC	AGGCTTTTCA	GCATGTGTTT	GATTTTCTTT	<u>TTAGGGAGTT</u>	<u>TCAAGGCAGC</u>	11940
<u>TGATAGTGGT</u>	<u>AAGATTCTCA</u>	<u>AACGCTTCTC</u>	<u>AGAGAAATGAA</u>	<u>AAAGAGTGTT</u>	<u>TTGAGCGATT</u>	12000
<u>GATGAAAGAC</u>	<u>CCACTACGAT</u>	<u>CCTGCGTCCC</u>	<u>TTGCTTCCAT</u>	<u>GGTGTGGTGG</u>	<u>AAAGAGATGG</u>	12060
<u>AGAGACCTAC</u>	<u>ATTCAGCTGG</u>	<u>ATGATTTGCT</u>	<u>TACTGATTTT</u>	<u>GAAGGGCCGT</u>	<u>GTGTGATGGA</u>	12120
<u>CTGTAAAGATG</u>	<u>GGGATCAGGT</u>	GAGACATGAA	AGAGAAATGTG	TTTTCTAACC	TAAATGCATT	12180
TGCAGGAGGC	AAGGGGGGGG	ATAATGTGGT	CATGCTATGT	GTTGGAGGAG	CTTGGTAACA	12240
GTTCTGGAGC	CTTGGGATT	GGTCTAGACA	ACCTGTGTGTT	GGTTTGACGG	TTGCCCTGGG	12300
CAGCCTAAGG	AGGCTGTGTC	CCCTTGGTGC	CTGCTTGTC	ATGGGTTCTG	GAAACTGAAT	12360
GATCTATAGA	CTAAACGTGA	CCCACATCAA	GATGTGTTCA	GTGGTGATT	GGGACAAAGT	12420
TTCTCTGCAA	TGGCCTGAAA	AAACATGGAG	AAAAAGTTAC	ATGATTCACT	CTCTGCCAGT	12480
TCATTTAAAT	TTTGCTATG	CAGTAGATCA	AAAAAACCC	CTATGAAGTG	TAAAATCTCT	12540
GTCTCCAAAC	GTGAATGACT	GAAAACCAAT	ACAAAAGCCC	ATTTCTAAGG	CTGGAATGAG	12600
TCTTCAGTGA	TATTGATCTT	CTCTGTGGAG	AAATGTTGAC	TGCTGCCCA	GGACCGACTT	12660
TTCCCCACTG	ACATCTAGGT	GATGTTATCA	CCTTGTCTT	CAGATTCTCA	CTTTGTTTTT	12720
TTTTTCCATT	TTCCTTGCT	TGTGTATGAT	TTAGGAGGAA	ACCTCAAATA	AGTTATCTAA	12780
GCATAACAGA	TAGACAGAGA	ATCTGTTGAA	GGCCTCAAGT	AACAATACAG	AGAGGTAGAA	12840
ACTGTAATAG	TAATCTTTTT	GGTGCCAACT	CAGATGCTTG	ATTAATAATA	TAAATGAAAT	12900
ATGCCATTGA	TGGGAGTGAA	ACAAGCCTTT	TCACATAGAT	GGAGAATCTT	AAGTGAAGTG	12960
TCTGCTAAAT	CAGAGTAGAA	ATTTGTTGTT	TTGGTATCCC	CAGAAGCAAG	AGAAGAAGGA	13020
TTGGCAGCAG	TACATGTTGT	GTTACAGTA	GTTGACGCTC	AGGTAATGAG	TGACAGCATC	13080
TCTTAAACAA	TAGTCCAGCT	TATTTTACAA	TGTGTTAAG	AATGATTAAG	CATGTATGCT	13140
CCAGGCACCT	GACAAAGTGC	AATCTTGTGG	AGAGGGGCAA	GTTTTAGGGT	CCAGTGGAAT	13200
GCAGAGAACA	TGGATAGTGC	CTTTTTAGTG	GCTGCCAAGA	TTGAGTGATA	AGAGCAAAGC	13260
GTAGAAGTGT	TGTCTTCCCT	TTCTTAGTTA	CTTCTTTTGG	TTTGGAGCTA	CAGTTCTCA	13320
GATAACATGC	TCGAGCTCAT	TATTGTTTGA	AGAGCGTTTA	TGCTTTTTAC	TCTCTAAAAC	13380
ATTATGTA	AACTCATTTG	TTTTTTTTGAG	GCCTGAAAAA	ATGCATAACT	GAAGTTTTTTT	13440
CTCAAGGGAA	TAAGCTTCA	TAAGACCTCA	GCAAGCCCTT	TTGCTTTTGA	TTTCAATGCA	13500
AGTGATCTCT	CTTAACTGTC	CTCTGAATAT	ACAGTTGTAT	GTCAATGGCTG	AATAGGAATT	13560
CAGCTTTCTC	ACATTCCTGC	AAGCAGGACA	TAAGAATAAC	ATGTAATGTT	AAGGTAAAGG	13620
TATGGTTAGA	ACAAGAAGTG	AATGAGACAA	ATCTTGATTC	CTGATATAGT	TTCATAAAT	13680
AAGCATGTGT	GGCATTAGT	TCGTGCTTGG	CTTTTGGCAC	GTGCAAAACT	GAGGTAAATGA	13740
TAATACTTTT	CTGGCTAACT	GAAATTGCAA	AAATAAAGTT	GGGAAGTCCT	TGCAGCTTTG	13800
TTGGGATGTG	ATGTCTTTGC	<u>AGGACATACC</u>	<u>TGGAAGAAGA</u>	<u>GCTGACTAAA</u>	<u>GCCCCGTGAGA</u>	13860
<u>AACCAAAGCT</u>	<u>CGCTAAAGAC</u>	<u>ATGTACAAGA</u>	<u>AAATGATTGA</u>	<u>AGTGGATCCT</u>	<u>CTTGCTCCTTA</u>	13920
<u>CAGCTGAGGA</u>	<u>GAATGCCAG</u>	<u>CATGCTGTCA</u>	<u>CCAAGCCCG</u>	<u>ATACATGCAG</u>	<u>TGGAGGGAAA</u>	13980
<u>CAATCAGCTC</u>	<u>TAGTGCCAAC</u>	<u>CTGGGCTTTA</u>	<u>GGATTGAAGG</u>	<u>GATTAAGGTA</u>	ATAGTCTCTGC	14040
TTCTGCCTGT	TCAATTTAGA	CTGAACCTTG	ATTTGTTAAT	TAATCAAAAT	GCTAGCATGC	14100
ATCAGTAACC	AGGTTTTTCTA	ATAGATTATG	TGAAAATGCA	TTAATTATAT	CCACAGAGTT	14160
TGATGTATTG	TTGCTTTAAA	GCATGAGTTG	CAATTGTAAC	AGTTGGGTCA	AGTAAGTTAA	14220
GCACCAAAATG	CATATCAGCC	ATGCTTGCC	CAATCACAGA	GATATTTTCA	GAAGGATCCA	14280
AACAGGTACA	CAGCATAGAT	ACAATGAAAA	TGTAAGGAGG	AATTAAGAAC	TGATGAAATA	14340
GCTGCCTCTC	CCCACACTT	TTGTTTTGTTT	GTTTTTTTAT	ACACAATTAT	ATTCTATTTA	14400
AATCACATAA	AAGAGTTTTT	GTTCCAGTTA	TGCTTACTTG	CAAGGCAAGT	TAAAAGCAAT	14460
AGAATCATAG	TGGACCAAGG	TGGAAAAGAC	TTCCAAGATC	ATCCAGTCTA	ATCATCCACC	14520
TATTACCAAT	ATTGCCCACT	AAAGCACGTC	CCTCAGTACA	ACATCTGCGC	GTTTCTTGAA	14580
CACCTCCAGG	GTGAGTGACT	CCACCACCTC	CCTGGGCAGC	CCATTCCAGC	TCCTGACCAC	14640
TCTTTTGGAG	AAGTAGTATT	GCCTGACATC	CAACCTGAAT	CTTCCCTGGT	GCAATTTGAG	14700
GCCATTTCCCT	CTAGTCTTAT	CACATAGTTAC	ATGGGAGAAG	ACACTGGCCC	CCATTTAGCT	14760
ATCTGTCTT	AGGAAACATC	TTTTTACTTC	TAGGAACATG	ACAGTATCCA	GTATAGATGA	14820
AGCTGGGATA	AAGCCCAAAA	ATAGAGTGAT	AAAATCTGTC	CATCAGCAAA	ATCCTTCTGC	14880
TGTTCTTGAT	GGATGAGTTT	CGCTCCCTTT	ACCATTTCTA	GGATACTACT	TTACAGCCTG	14940
TGAAGAATCT	TTGCAATTTT	CTTTCCTACC	CATTAATTAC	TTGTATTTCT	TGTGCCTCAT	15000
GGCAAAGTCA	AATACCTATC	CAGAAACCCT	TAGGACCTAC	ACTTAGAGTA	TCACCAACCT	15060
CACTAAGTAA	CTCAAATGCT	AAGGCTCCAG	GGGGACCTTA	TAGCAACCTT	CCAGTACATA	15120
AAGGGGGCCT	ACAGGACAGT	TGGGGAGGGA	CTGTTTTATA	AGGGCATGTA	GTGACAGGAA	15180
GAGGGGAAAT	GGCTTTAAAC	TGGAAGAGGG	CAGACATAGA	CTAGATATTA	GGAAAGAAAT	15240
CTTTACTCTA	TGTTGAGACA	CTGGCACAGG	TTGCCAGTG	AGGTTGTGGA	TGCCCCCTCC	15300

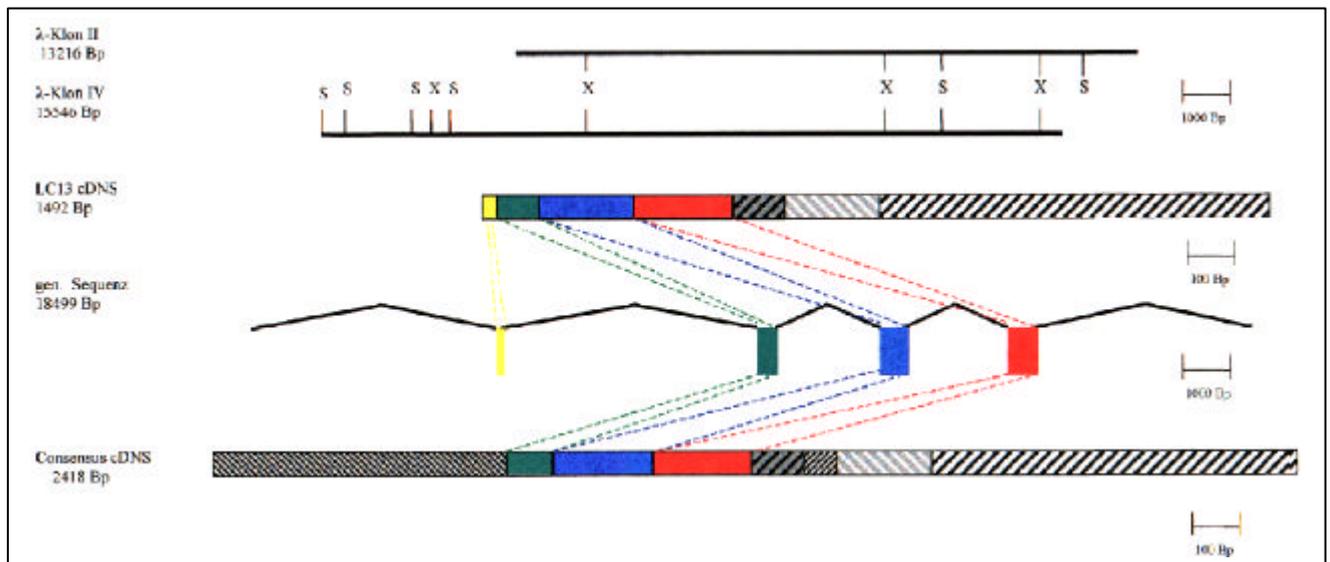
Ergebnisse

CTGGAAGCAT	TCAAGGCCAG	GCTGGATGGG	GCTTTGAGCA	ACCTCGTCTA	GAGGGAGGTG	15360
TTCTGCCTA	CAGAAGGGGG	GCTGGAGCTA	CGTGATCTTA	AAGGATCTTA	AAGGTCCCTT	15420
TTAACTCAA	CCATTCTATG	ATTCTAACAC	TAGCTCTGTC	ACAGCTAGCC	TTAAGTTAGT	15480
TTGCTTGGGT	TTTGATAACT	GTGTACCTGT	AGCAGCACAG	CGCTTGGTGA	GGGCAGCCCA	15540
AACACCCTGC	ACTCTGCGTG	AGTACTTGCT	AGCTGAAGCC	TGTGACGAGG	GATCTGAAGA	15600
GGTTAGCGGA	CTTAGTTACC	CTGTGTGATT	TCAGGGTGT	CATCAGAGCA	CAGTTGTGCC	15660
TTTTGTGAGC	ATATACATTT	AACGTAAGTA	TGTTTTGATG	CTTTAAATTA	TTATTTGGAT	15720
TTTGATGCT	TTTCATAGTT	CTAGCACACA	GGAAAAGAAA	AAAGGAATGA	AAGAGGGTGA	15780
CTCGCATGAA	CAGAGGCTCT	TTAACTATTC	CAATCTTCTC	CACCTCCACG	TGTTGTCTTT	15840
TTCTTCCCTT	GTTCACAGAT	CCTCCTGCTG	TGCTACAGGA	ACTAGTCTTT	CCAGCTCATG	15900
CTGTGCTTGG	CCCCCTGTAT	GCTGTGCCAC	CCACTCCTGG	CTGTTAGACA	CAGGCATTTT	15960
CATGCAGAAA	CTGTCTGGGT	AGTAGATTGT	CTGGCTCTAA	CCCTGCCAGC	ATACTTTCTG	16020
TCTTACCCTT	CAGCCGTATA	ATGATGTTAT	CCAAGTTACC	TGTTTCATTC	CTATGCCACT	16080
TGAAAGTCC	TGAATGTTCT	CTGTAATGGA	ATCAGAAACC	CAGGTGATCT	CAAGACCTTT	16140
TGTGTATGTT	CTCAGGAGTA	TCTTTGGTCA	GTGTAGACTT	ACACATATGT	GTTGAGTCTT	16200
GAAGATGAG	TCAGCTAGGG	GAGTATAGGG	GAGTCCAGT	AAAACCTCCT	GGTTGTCTT	16260
TTGTGATTTG	GCTGGTTGTC	AGAGGTGGGA	GGGAGCAGTA	TGGCACACAG	ACTGCATGAT	16320
ATTTCCCTCT	GTTGAGACAA	CGCTGTAACT	GTGCAAAAAA	GGACACAAAT	AATCCTTTTT	16380
TTAAGCACAA	GAAGTGCTGC	AGAGTACTGC	AGCGCATTTT	CTATTTCTCT	GTCTTTCTGT	16440
GCTGTTATGG	GGGATGTAGG	TAGGCATTAT	TCTTCTACTT	TTGTTTGTGG	AAAAGGCGTG	16500
GCAGAAGTTT	TTCAAGCCAT	ACAGCTAGTC	GGTATTTCCC	AAATCGCTTC	ACTGTAGCTG	16560
AACTGTAAGT	CCCATTTTGC	AGGGGAGCAA	TGCCATGCTT	TGCGATTCCC	CATTTTGAGA	16620
GGAAAGCCTG	TGAGGATCGG	TGATGTCAGC	AAATTGTTGA	TGGGGGGAAA	AAGGAGTTTC	16680
AGAGTTAGT	ATGGGGCTGA	CTCCAGGATT	AGGTCAGCAG	ATATGTTGGG	CTTGGTCTAT	16740
CAAAAATATT	CCAGTTTTGT	GGCTGCTGGA	GTAAGGAGCA	GAAATAAAGA	AAGTGAATTC	16800
ACAGAAGCTC	TTTTGTGAAG	GGGCTCACTA	TAAATGAGAT	TCAGTCCCTC	TCCCAAAGGG	16860
ACTGTCTGAA	GTCTTGGCCT	TGCAAAACGTC	ATCTCTTCAA	CACTAAGCTA	ATAGTTTTTG	16920
GAAGAGATAG	AAGACGTTGG	ACTGAACCTC	TTCTCATTTT	CCGTTCTGTC	AGTGAACCTG	16980
TGGTTTCCAG	AGTTACTTTC	CTTTGGTACC	GTTCTTTTCC	CTGTCTTTTG	GGATAGCCAT	17040
TTTCCCAGGA	GGACAGCAGA	TTTGATTCAT	TAGTCTCTGT	AAAATCCATC	TAGGTCACAA	17100
CCTTAACCCA	CAGCCCTTTA	AGGGAACCTT	GCAGAGTAAT	CTGAACAAGA	CCACGCAGGT	17160
ACTTCATTGC	ATGACAGATC	TGAAAATTTA	GTACTTAGGG	ATTTTTTTAT	ATATGTTCTA	17220
TGTCCCATCT	AGTGAGAAGG	TCCACCGGCT	GCACAGTGCA	ACAGACTGCT	GTGCTGGGCA	17280
GGAACTGACA	AAAGTGTGAC	CTTGGAGAGC	AGGTAGGGCA	AGCGCCTTCT	GGGATCAGG	17340
TACACCTAGA	GCTGTTGCAA	GGACCTGCTA	CAGGATATGA	GGGATGGTAC	AGGTCAAAGC	17400
CTGGCCTGTT	TTTTACAGCA	AGGAAAGACA	GGCAGCAGTT	ATGTTTCTGG	TCAACCACTG	17460
CAGAGGAACA	AAACCATAAG	AGTATTTCTA	AATAATAAGG	ATACAAGCCA	CTAGCATGTC	17520
CAGATTTAAA	GAAAAAAGGG	AAAAAAAAAA	AAAGAGAGAA	AACAGCAGCT	CTTACAGACT	17580
TTGTTGTGGG	ATTTAGGGCA	TGGGGAGGGA	TTACTTTTTT	TAAAATAACC	TTACTCCAGA	17640
GAAGAGATAG	AAGACGTTGG	ACTGAACCTC	AAACTTCTGT	CTGCCGTTGA	GTTGTATCGT	17700
ACCTCAGGTC	AGGTGAGATG	GCTCCTCTCT	ATCTGCTGCT	GCTTTTGGCT	AACATAACAC	17760
TCCCATTTGG	CTGACGTGCC	ACACTGGTAT	CTGGCCTGTG	GCCTTGAAT	AAAATTTCTG	17820
TTATTTCTCT	AAAAGGTCTG	GTTGGTGGGA	GGTTCTTCCAG	CATGGCTTTG	CCATTCGGTT	17880
AGGGCTCTGG	TTCTGCTGAG	AAATAAAAAG	CATTGCACCT	TCTGAGACCA	GGGCAGAATT	18000
TAACATATGTT	TGGTGCAGTG	ACAATGTGTT	GAAGGGAACG	TGTTTTGATG	ACCTGTTAAT	18060
TTAAGGAATT	GGGAATTGTA	AATGTAAAGG	AATAATGGAG	ATGTGGGATT	TCACTGGACT	18120
GATACAATGG	AGAGAAATGT	AGTTTGATAC	CTCGCAGGCT	TTTGGTAGAC	ACAGGTGACC	18180
AACTGCAAAA	ATGGCTGTAT	TTTACATGCC	TGTCCTACAA	GCTTTTCTCT	GTGTCTTTTC	18240
ACATGAGGGA	TCATCTTGCA	GAGGTTTATA	CTCATGCAGT	CTGTGTTGAC	AGATGTCTCA	18300
GATTCATTCA	CTGCTCTTAG	TTACTTGTAG	CCTCACAGGT	GCAAACCTGG	TGTTACCAAT	18360
TCACGAAAAG	ATTTTGTCT	TTTTCAGTAG	AGGGTGCTTC	TGTATTTCAG	TGTATTGCTG	18420
CTACAAGCGT	GCTCACACTG	TCTTTTGCCA	GAATTTACAC	ACCCGCTTTG	TCACTGCTAG	18480
CATTTGGATC	GAGTCGACT					18499

Die drei in Richtung 3'-Ende gelegenden Exons, die für 32, 71 und 68 Aminosäuren aus der CaM-Bindungsdomäne und der katalytischen Domäne kodieren, konnten in allen cDNS-Klonen wiedergefunden gefunden werden, die diesen Sequenzbereich abdeckten. Dagegen konnte das am weitesten am 5'-Terminus gelegende Exon, das nur für 9 Aminosäuren kodiert, nur in dem λ -Klon LC13 nachgewiesen werden.

Abbildung 24: Schematische Gegenüberstellung der genomischen Klone, der genomischen Gesamtsequenz und der cDNS-Klone.

In der Darstellung der gen. Klone sind die Schnittstellen für XbaI (X) und SacI (S) eingezeichnet. Die Darstellung der gen. Gesamtsequenz zeigt die topographische Lage der Exons (bunte Rechtecke) zu den Introns (schwarze Linie). Durch die gestrichelten Querverbindungen zu der Consensus cDNS und dem LC13 Klon wird die Anordnung der Exons in diesen dargestellt. Die Abschnitte der cDNS, die nicht innerhalb der gen. Partiaalsequenz liegen, sind durch grau-gestreifte Rechtecke dargestellt.



Die cDNS des λ -Klon LC13 unterscheidet sich von den übrigen cDNS-Klonen zum einen durch die zusätzlichen 30 Bp am 5'-Terminus, welche auf genomischer Ebene als Miniexon identifiziert wurden, sowie durch die im Leserahmen liegende Deletion von 72 Bp innerhalb der katalytischen Domäne. Aufgrund dieser Unterschiede zu den übrigen cDNS-Klonen scheint der LC13 ein „alternatives Spliceprodukt“ darzustellen.

Im letzten Intron konnten innerhalb der Basenpaare 14363-14852 (CR1/I) und 15081-15461 (CR1/II) „chicken repeat 1 (CR1)“ Elemente identifiziert werden, die in entgegengesetzter Orientierung angeordnet sind.

CR1 Elemente gehören zu der Familie der „non-LTR retrotransposons“, da sie keine „Long Terminal Repeats“ (LTR) enthalten [Eickbush T.H.,1992]. Während in

Invertebraten viele „non-LTR“ identifiziert wurden, konnten aus Vertebraten bisher nur drei unterschiedliche Arten „non-LTR“ gefunden werden [Weiner A.M. et al., 1986; Gabriel A., Boeke J.D., 1993]. Am besten charakterisiert ist das L1 Element der Säugetiere [Fanning T.G., Singer M.F., 1987], das Tx1 Element aus Amphibien [Carroll D. et al., 1989] und das CR1 Element aus Hühnern [Stumph W.E. et al., 1981; Chen Z.Q. et al., 1991; Vandergon T.L., Reitmann M., 1994]. Im Hühnergenom kommen ca. 30.000 Kopien der CR1 Elemente vor, die wiederum in sechs Subfamilien gegliedert werden. Typisch für den Aufbau der CR1 Elemente ist das 3'-Ende mit der Consensussequenz (CATTCTRT) (GATTCTRT)₁₋₃ sowie ein stark verkürztes 5'-Ende als Folge der Reversen Transkription. Inzwischen ist es gelungen, eine CR1 Consensussequenz von 4558 Bp zu sequenzieren. Innerhalb dieser Sequenz konnten zwei ORFs identifiziert werden, wovon der zweite (ORF2) im C-terminalen Bereich eine Reverse Transkriptasedomäne und im N-terminalen Bereich eine putative Endonukleasedomäne besitzt, die beide essentielle Funktionen für die Retrotransposition darstellen. Der erste ORF (ORF1) könnte für ein Nukleinsäurenbindungsprotein kodieren [Burch J.B.E. et al., 1993; Haas N.B. et al., 1997].

Der Vergleich der beiden in dieser Arbeit gefundenen CR1 Elemente mit der oben erwähnten CR1 Consensussequenz zeigt, daß es sich bei beiden um Fragmente aus dem C-terminalen Bereich, also dem Bereich der Reversen Transkriptasedomäne des ORF2 handelt. Das CR1/II Fragment scheint sogar das 3'-Ende eines CR1-Elements darzustellen, da es den typischen 3'-Terminus (s.o.) aufweist.

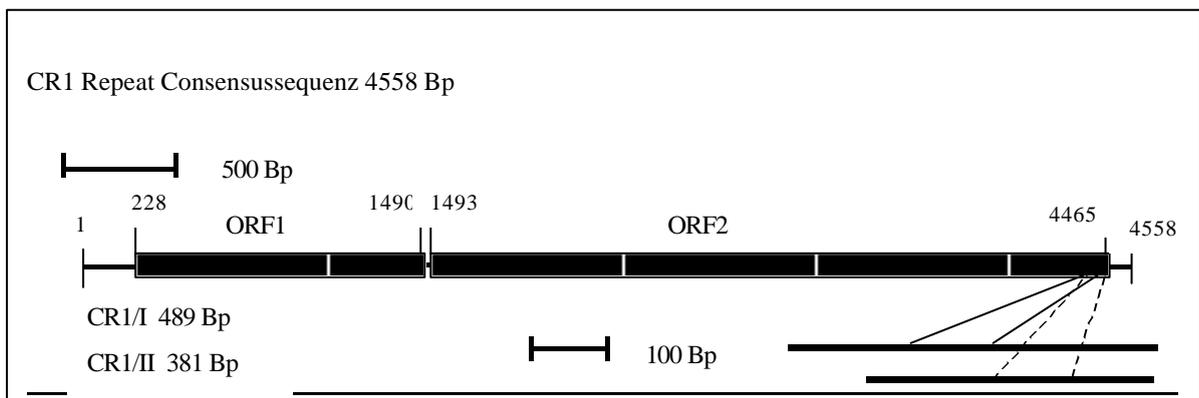


Abbildung 25: Gegenüberstellung der CR1 Repeat Consensussequenz mit den CR1 Repeat Fragmenten CR1/I und CR1/II.

In den dargestellten Sequenzbereichen zeigen CR1/I und CR1/II eine 79 bzw. 83% Identität mit der Consensussequenz auf.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Vervollständigung des 5'-terminalen Bereichs der Nukleotidsequenz der von Michael Haefs partiell klonierten und sequenzierten zytoplasmatischen Form der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase aus Hühnererythrozyten, um eine konkrete Aussage über ihre Isoformzugehörigkeit machen zu können. Des Weiteren erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Isolierung und Sequenzierung von zwei überlappenden genomischen λ -Klonen der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase, wodurch die Identifizierung von vier Exonbereichen und der entsprechenden Exon-/Introngrenzen gelang.

Hierzu wurden zunächst PCR-Sichtungen von acht cDNS-Banken, die aus unterschiedlichen Geweben (embryonalem Gewebe, Leber, Muskel, Hirn und Thymus) hergestellt waren, durchgeführt. Aus keiner dieser cDNS-Banken gelang es, wie auch bei Michael Haefs, das 5'-terminale Ende der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase zu amplifizieren. Die Ursache hierfür könnte an einer unvollständigen Erststrangsynthese bei der Herstellung der cDNS durch die Reverse Transkriptase liegen oder an der Tatsache, daß es sich bei den eingesetzten cDNS-Banken jeweils um die 2. Amplifikation von 1 Mio. Einzelphagen der 1. Amplifikation der originären Bank handelte. Ein weiterer Grund könnte auch die niedrige Abundanz der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase in Hühnererythrozyten sein, die schon in dem enormen Anreicherungsfaktor (135.000fach) bis zur proteinchemischen Isolation zum Ausdruck kam [Haefs M., 1994]. Die niedrige zelluläre Konzentration der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase scheint allerdings ein allgemeines Phänomen zu sein [Choi K.Y. et al., 1990]. Lediglich aus der cDNS-Bank, die aus muskulärem Gewebe hergestellt worden war, ließ sich ein spezifisches, ca. 900 Bp großes PCR-Produkt amplifizieren, das Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase-Sequenz beinhaltet. Die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase-Sequenz erstreckte sich allerdings nur über eine Länge von 44 Bp und brach noch 25 Bp vor dem zu diesem Zeitpunkt bekannten, unvollständigen 5'-terminalen Ende ab. Anschließend ging sie in eine Sequenz über, die keine Homologien zu den bisher bekannten Isoformen aufwies und auch kein offenes Leseraster mehr zeigte. Der Grund dieses Sequenzabbruches wurde erst bei der Analyse der partiellen genomischen Sequenz der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase deutlich. Hier zeigte sich, daß sich an der Abbruchstelle eine Exon-/ Introngrenze befindet und sich am intronischen Ende des Amplifikates ein Bereich mit 27 Adenosinresten erstreckt, der wohl bei der Isolation der m-RNS über die Poly-(dt)-Säulen dazu geführt hat, daß dieses Fragment genomischer DNS artifiziell mit in die cDNS verschleppt wurde.

Erst durch drei sukzessiv durchgeführte 5'-RACE-Runden mit mRNA, die aus 9 Tage alten Hühnerembryonen isoliert worden war, gelang es, fünf 5'-RACE-Amplifikate zu isolieren und zu klonieren (siehe Abb. 13), die das 5'-Ende der Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase vervollständigten. Die aus allen vorhandenen cDNS-Fragmenten zusammengefügte Sequenz erstreckt sich über 2418 Bp, wovon 1356 Bp kodierende Sequenz sind und 132 Bp im 5'- und 930 Bp im 3'-nichttranslatierten Bereich liegen. Dem Startcodon (Bp 133-135) geht ein im Leserahmen liegendes Stopcodon voraus (Bp 58-60), wodurch die Möglichkeit eines unvollständigen N-Terminus ausgeschlossen wird und das Startcodon bei Bp 133-135 bestätigt wird.

Die Analyse der das Startcodon in Richtung 5'-Ende flankierenden Sequenz ergab allerdings wenig Übereinstimmung mit der von Kozak [Kozak M., 1987] ermittelten Consensus-Sequenz des Translationsinitiationsbereichs für höhere Eukaryonten, (GCC)GCC A/G CCATG ---G, (vergleiche mit Abb. 13). In dieser Region ist die Position -3 am stärksten konserviert und in 97% mit einem Purin besetzt, das in 61% der Fälle ein Adenin ist. Die Positionen -6 und -9 werden bevorzugt mit Guanin besetzt und alle anderen Positionen durch Cytosin. In Richtung 3'-Ende konnte für die Position +4 wiederum Guanin als bevorzugte Base ausgemacht werden. Durch Mutationsexperimente konnte die besondere Bedeutung der Positionen -3 und +4 für die Translationseffizienz nachgewiesen werden, die bei Besetzung dieser Positionen durch andere Basen deutlich abnimmt. Dies könnte ein Grund für die geringe Translationseffizienz der Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase aus Hühnererythrozyten sein, da bis auf die Positionen -1 und +4 alle anderen von der Kozak Sequenz abweichen. Jedoch wird die Identifizierung des ATG an der Position Bp 132-135 als Translationsstartcodon durch die beträchtliche Differenz im G/C Gehalt zwischen dem 5'-nichttranslatierten Bereich von 36,4% zu dem G/C Gehalt im kodierenden Bereich von 65,2% unterstützt.

Nachdem das 5'-Ende der Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase aus Hühnererythrozyten vervollständigt war, konnte das aus 452 Aminosäuren bestehende Translationsprodukt, welches ein errechnetes Molekulargewicht von 51.104 Da besitzt, mit allen bisher bekannten Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase Proteinen verglichen werden.

Die gesamte Aminosäuresequenz der Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase aus Hühnererythrozyten besitzt eine Identität zu den bekannten Isoformen A, B und C aus Ratte und Mensch von 65 %, 57 % bzw. 54 %. Konzentriert man sich beim Vergleich der Primärstrukturen nur auf die konservierte C-terminal gelegene katalytische Domäne, da die Isoformen B und

C noch nicht in kompletter Länge vorliegen, erhält man eine Sequenzidentität zu A von 75%, zu B von 68%, zu C von 64% und sogar eine erhebliche Sequenzidentität zu der Peptidsequenz des Nematoden *Caenorhabditis elegans*.

In Northernblotanalysen von Poly-(A⁺)-RNS aus Hühnererythrozyten konnten Transkriptgrößen mit einem Hauptsignal von 6.3 kB und schwächeren Signalen bei 2,8 kB und 2,1 kB gezeigt werden [Bertsch U. et al., 1999]. Das Hauptsignal bei ca. 6 kB konnte durch eine im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Northernblotanalyse von total-RNA aus 6 bzw. 9 Tage alten Hühnerembryonen bestätigt werden. Hierzu wurde eine Sonde verwendet, die gegen den für die Isoform spezifischen N-Terminus (Bp 361-632) gerichtet war. Obwohl die Größe des Transkriptes eher der für die Isoform B nachgewiesenen Transkriptgröße entspricht [Vanweyenberg V. et al., 1995], schlossen wir aufgrund der höchsten Aminosäurehomologie zu der Isoform A sowie aufgrund des errechneten Molekulargewichtes von 51.104 Da, das dem Molekulargewicht der Isoform A (50-53 kDa) am ähnlichsten ist [Choi K.Y. et al., 1990; Takazawa K. et al., 1991a], daß es sich bei unserer Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase um eine für Vögel spezifische Isoform A handeln muß.

Im Vergleich dazu liegt das Molekulargewicht der humanen Isoform B bei mindestens 102 kDa [Vanweyenberg V. et al., 1995, Bertsch U. et al., 1999], das der Ratte bei 75 kDa [Thomas B. et al., 1994], und die Isoform C des Menschen besitzt ebenfalls ein Molekulargewicht von ca. 75 kDa [Dewaste V. et al., in press].

Die Identifizierung der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase aus Hühnererythrozyten als Isoform A wird noch durch drei Sequenzmotive der N-terminalen Domäne unterstützt, die charakteristisch für die Isoform A sind (Aminosäuren 68-79, 103-108, 137-154). Demgegenüber kommen solche charakteristischen Motive in den Isoformen B und C nicht vor. Neben der CaM-Bindungsdomäne und der katalytischen Domäne besitzen alle drei Isoformen, abgesehen von den Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase Varianten aus dem Invertebraten *Caenorhabditis elegans*, eine zusätzliche homologe Region, die weiter N-terminal gelegen ist und sich durch einen hohen Gehalt an den sauren Aminosäuren Serin und Threonin hervorhebt. Aufgrund ihres am stärksten konservierten Motivs wird diese Region als DSE-Box bezeichnet. Sie könnte eine PEST-Sequenz darstellen, die in Proteinen von Wirbeltieren als Erkennungsstelle zur proteolytischen Spaltung dient [Choi K.Y. et al., 1990]. Die Tatsache, daß die Hühner Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase originär aus Hühnererythrozyten aufgereinigt wurde [Bertsch U. et al., 1999], läßt den Schluß

zu, daß diese A-Isoform der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase in den Erythrozyten exprimiert wird. Bisher konnte für die Erythrozyten von Säugetieren keine Isoformspezifität der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase nachgewiesen werden, so daß es interessant wäre herauszufinden, ob die Expression der A-Isoform in Hühnererythrozyten eine Besonderheit der Vögel darstellt oder ob die Expression dieser Isoform auch in kernhaltigen erythrozytären Vorläuferzellen oder anderen kernhaltigen Blutzellen von Säugetieren stattfindet.

In Vogelerythrozyten stellt die Initiation der Synthese von Ins(1,3,4,5,6)P₅ durch die Phosphorylierung von Ins(1,4,5)P₃ durch die lösliche Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase vermutlich die Hauptfunktion der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase dar. Das Ins(1,3,4,5,6)P₅ fungiert als allosterischer Effektor des Haemoglobins in den Vogelerythrozyten analog dem 2,3-Bis-phosphoglycerat der Säugererythrozyten, welches die O₂-Affinität des Haemoglobins senkt. Zur effektiven Bereitstellung von Ins(1,3,4,5)P₄ als Vorläufermolekül zur Bildung von Ins(1,3,4,5,6)P₅ verfügt die A-Isoform der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase aus Hühnererythrozyten über eine besonders hohe Affinität zu ihren Substraten Ins(1,4,5)P₃ (K_m-Wert: 0,690) und ATP (K_m-Wert: 104 µM) sowie über eine hohe Basisaktivität, die nur gering durch Ca²⁺/CaM auf das 1,44fache zu steigern ist [Bertsch U. et al., 1999]. Inwieweit die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A-Isoform aus Hühnererythrozyten auch direkt an der Regulation der Ca²⁺ Homeostase in diesen beteiligt ist, ist noch unklar [Berrie et al., 1989].

Die geringe zusätzliche Aktivierbarkeit der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A durch Ca²⁺/Calmodulin, welche als allgemeine Eigenschaft der Isoform A beschrieben ist [Shin Y.S. et al., 1995], wirft auch innerhalb der Säugetiere die Frage nach ihrer genauen physiologischen Funktion auf. Von besonderer Bedeutung könnten hier die Erkenntnisse über die gewebespezifische Expression der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A im Vergleich zu den gewebespezifischen Expressionsmustern der InsP₆- und PP-IP₅-Kinasen sein. So konnte für die InsP₆ Kinase 1 ein dem der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A entsprechendes Expressionsmuster, das auf Hoden und Hirn beschränkt ist [Vanweyenberg V. et al., 1995], nachgewiesen werden. Weiterhin konnten sowohl für die InsP₆-Kinase 2 als auch die PP-InsP₅-Kinase die stärkste Expression im Hirn nachgewiesen werden. Diese Entdeckungen könnten darauf hinweisen, daß die eigentliche Funktion der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A in diesen Geweben dazu dient, durch die Phosphorylierung von Ins(1,4,5)P₃ zu Ins(1,3,4,5)P₄ die Verbindung zu den höher phosphorylierten Inositolphosphaten herzustellen, um die Versorgung der InsP₆- und

PP-IP₅-Kinasen mit ausreichend Substraten zu gewährleisten. Besonders vor dem Hintergrund der sich ständig vermehrenden Hinweise auf die physiologischen Funktionen von InsP₆, InsP₇ und InsP₈ insbesondere im Gehirn ist dies eine sehr interessante Vermutung. Hierbei ist vor allem an regulative Funktionen im Vesikelverkehr und Vesikelrecycling der synaptischen Vesikel zu denken, die durch die hohe Affinität von InsP₆, InsP₇ aber auch InsP₈ zu Proteinen, wie z.B. dem Golgi Coatomer Protein (COP I), dem AP-2, dem AP-3 und dem Synaptotagmin, angedeutet werden. Eine weitere Entdeckung, die auf eine mögliche physiologische Funktion von InsP₇ hinweisen könnte, ist die Fähigkeit von InsP₇ unter Verwendung einer spezifischen Kinase Phosphatgruppen an eine kleine Gruppe von Proteinen im Gehirn zu übertragen, welche nicht durch ATP phosphoryliert werden [Vogelmaier S.M. et al., 1994].

Die Sequenzierung der beiden genomischen Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinaseklone, welche zusammen eine Sequenzlänge von 18.499 Bp besitzen, ermöglichte die Identifizierung von vier Exonabschnitten der Hühner Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase. Drei der vier Exonbereiche, die für 32, 71 und 68 Aminosäuren kodieren, waren in allen cDNAs repräsentiert. Das vierte Exon, das nur für 9 Aminosäuren kodiert und dem 5'-Ende am nächsten lokalisiert ist, ließ sich nur in der cDNA Sequenz des λ-Klons LC13 wiederfinden, der schon durch eine Deletion von 72 Bp innerhalb der katalytischen Domäne auffiel und daher wohl als ein alternatives Spliceprodukt interpretiert werden muß.

Die Verbindung der im Rahmen dieser Arbeit neu gewonnenen Informationen über die Exon-/Intronverteilung des Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A Gens mit den bereits vorliegenden Informationen über die funktionellen Domänen der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A verdeutlichen ihren Aufbau aus funktionellen Modulen. So repräsentiert das 30 AS große Exon von K156-H186 in der Hühner Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A annähernd genau den Bereich von S156-L189 in der Ratten Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A. Dieser Bereich wurde bereits durch 5'-bzw. 3'-Deletionsmutationen als potentielle Calmodulinbindungsdomäne identifiziert [Takazawa K., Erneux C., 1991]. Er beinhaltet das W165, dessen Bedeutung für die Calmodulinbindung in der Ratten Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A durch Mutageneseversuche als essentiell dargestellt werden konnte [Erneux C. et al., 1993].

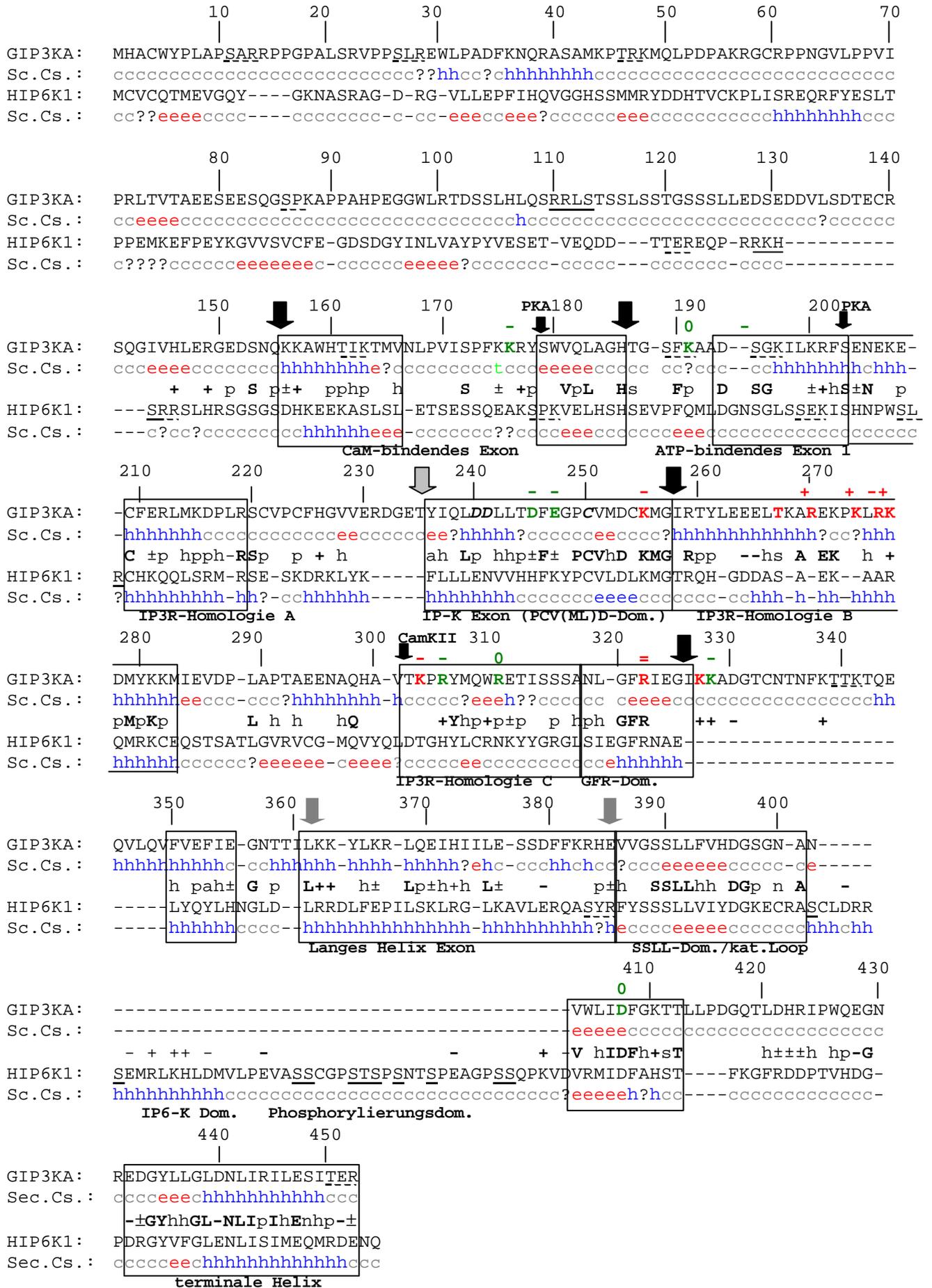


Abb. 19: Die Abbildung zeigt eine Gegenüberstellung der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A aus dem Huhn (GIP3KA) mit der humanen IP6-Kinase 1 (HIP6K1). Umrahmte Sequenzabschnitte zeigen Bereiche mit erhöhtem Homologiegrad und putativen bzw. bereits experimentell bewiesenen funktionellen Domänen an. Die fetten schwarzen Pfeile machen die Intron/Exongrenzen der Hühner IP3-Kinase A deutlich, während die fetten dunkelgrauen Pfeile die putativen Intronpositionen des Hühnergens für das alternative Spliceprodukt LC13 anzeigen. Die kleinen schwarzen Pfeile zeigen experimentell nachgewiesene Phosphorylierungsstellen an, während Sequenzbereiche, die mit einer durchgehenden Linie unterstrichen sind putative PKA Phosphorylierungsstellen und solche mit einer unterbrochenen Linie putative PKC Stellen anzeigen. Fette rote Buchstaben stellen AS dar, die in die IP3-Bindung der IP3K involviert sind. Durch die Zeichen plus und minus über den jeweiligen AS wird die, durch Mutagenese der entsprechenden AS hervorgerufene veränderte Affinität der IP3K zu IP3 angezeigt. Ein Pluszeichen bedeutet eine Affinitätszunahme, also eine Abnahme des K_m-Werts, ein Minus eine Affinitätsabnahme, also eine Zunahme des K_m-Wertes. Fette grüne Buchstaben weisen auf AS hin, die für die ATP-Bindung notwendig sind. Die Kennzeichnung durch + und – zeigt wieder eine durch Mutagenese der entsprechende AS bewirkte Zu bzw. Abnahme der Affinität zu ATP an. Eine 0 zeigt den Verlust der katalytischen Aktivität an. Unter den Peptidsequenzen der IP3K und der IP6K sind die putativen Sekundärstrukturen aufgeführt, wobei **h** einen helicalen Sequenzabschnitt andeuten, **e** einen β-Strang und **c** einen unstrukturierten Abschnitt darstellen. In der mittleren Zeile sind durch fettgedruckte Buchstaben identische AS der beiden InsP-Kinasen dargestellt, während ein p auf eine polare, ein h auf eine hydrophobe, ein + auf eine basische und ein – auf eine saure AS hindeutet. Das Zeichen ± zeigt Stellen an, wo eine saure durch eine basische AS ersetzt ist. Fettgedruckte kursive Buchstaben zeigen AS an, deren Mutagenese zu einem Faltungsfehler und somit zu Unlöslichkeit führen.

Die sich C-terminal an das calmodulinbindende Exon anschließenden beiden Exonbereiche der Hühner Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A besitzen Längen von 71 (T187-G257) und 69 Aminosäuren (I258-I326) und decken 51% der 275 Aminosäuren des C-Terminus ab, die notwendig sind, um eine katalytisch aktive Domäne zu bilden [Takazawa K., Erneux C., 1991]. Auch innerhalb dieser beiden Exonbereiche läßt sich der Aufbau des Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase-Gens aus funktionellen Modulen durch die Exongrenzen nachweisen. Diese beiden Exonbereiche scheinen eine funktionelle Einheit zu bilden, die der ATP/Mg²⁺- und Ins(1,4,5)P₃- Bindung dient. So zeigten Mutageneseuntersuchungen an der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A aus Rattenhirn, daß die Aminosäuren K197, R317 und D414, welche mit den Aminosäuren K191, R310 und D407 der Hühner Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase korrespondieren, in die ATP/Mg²⁺-Bindung involviert sind [Communi D. et al., 1993]. Weiter stellte sich heraus, daß das K262 der Ratten Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A, das dem K255 der Hühner Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A entspricht, sowohl für die Ins(1,4,5)P₃-Bindung als auch für die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinaseaktivität essentiell ist [Togashi S. et al., 1997].

Diese Ergebnisse konnten durch Mutageneseuntersuchungen an der Hühner Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase bestätigt und in Hinblick auf die ATP-Bindung um vier weitere Aminosäuren ergänzt werden, deren Mutation zu signifikanten Erhöhungen des K_m-Wertes für ATP führten (K176, D245, E247 und K327Q), während ihre K_m-Werte für Ins(1,4,5)P₃ nahezu unverändert blieben. Die Aminosäuren, die in die ATP-Bindung involviert sind, liegen entweder im Bereich zwischen der 23. und 94. Aminosäure vor oder 22 Aminosäuren nach einem 35 Aminosäuren großen Bereich (E271-R305) der Hühner Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase, welcher durch die Bindung von Ins(1,4,5)P₃ vor proteolytischer Spaltung geschützt wird. Innerhalb dieses geschützten Bereiches der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase (K274, R276, K277, K303) sowie in den sich unmittelbar N-terminal davor (T267, R270) bzw. sich C-terminal anschließenden Aminosäuren (R322, K303) führten Mutationen von acht Aminosäuren zu zum Teil erheblichen Veränderungen der Ins(1,4,5)P₃-Bindung. So zeigten die Mutanten R276L, K303Q und R322L im Vergleich zum Wildtyp eine Zunahme des K_m-Wertes um das 11-, 16- bzw. 15fache. Während die Mutationen von R276L oder R276K zu keiner Abnahme der katalytischen Aktivität im Vergleich zum Wildtyp führten, verursachten die Mutationen K303Q, R322K und R322L beträchtliche Verminderungen der katalytischen Aktivität mit 3,8-33fach niedrigeren V_{max}-Werten als der Wildtyp. Die Mutationen der fünf weiteren

Aminosäuren führten interessanterweise nicht zu einer Zunahme des K_m -Wertes für $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ im Vergleich zum Wildtyp, sondern zu einer Abnahme, wodurch eine verbesserte Substratbindung angedeutet wird. Insgesamt liegen die in die $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Bindung involvierten Aminosäuren in einem 73 Aminosäuren langen Segment in der Mitte der katalytischen Domäne der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase und werden NH_2 bzw. COOH -terminal von zwei ATP-bindenden Segmenten flankiert [Bertsch U. et al., 2000].

Dem bereits oben beschriebenen CaM-bindenden Exon folgt von T187-G257 ein Exon, über das unter anderem die ATP-Bindung (K191, D245, E247) an die $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase erfolgt. Eine weitere mögliche funktionelle Unterteilung dieses Exons ergibt sich aus dem Vergleich der kürzlich identifizierten Sequenzen der InsP_6 -Kinasen [Saiardi A. et al., 2000; Schell M.J., 1999] mit denen der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinasen. Hierbei fällt ein stark konservierter Sequenzbereich zwischen den beiden Inositolphosphatkinasen mit dem Motiv P-C(VAI)-(ML)-D-X-K-(ML)-G auf, der sich in der Hühner $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase A von P249 bis R257 erstreckt und somit das Ende des zweiten Exons darstellt. Dieser Bereich liegt sowohl in unmittelbarer Nachbarschaft zu den vorhergehenden, für die ATP-Bindung verantwortlichen Aminosäuren (s.o.) sowie zu dem nachfolgenden als $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -bindendes Kernsegment (E271-R305) identifizierten Bereich [Bertsch U. et al., 2000] am Beginn des dritten Exons (I258-I326). Aufgrund dieser Lage läßt sich für das in beiden Inositolphosphatkinasen konservierte Segment eine übereinstimmende Funktion ableiten. Diese könnte entweder der katalytische Transfer des Phosphates vom ATP zum Inositolring oder die Positionierung der γ -Phosphatgruppe des ATPs in die Nähe der Akzeptorhydroxylgruppe des Inositolringes sein. Hierdurch ließe sich vermuten, daß das K255 in der Hühner $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase A oder das korrespondierende K262 in der Ratten $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase A, welches ebenfalls in den InsP_6 -Kinasen konserviert ist, nicht wie bisher angenommen für die spezifische InsP_3 -Bindung essentiell ist [Togashi S. et al., 1997], sondern je nach Art der Inositolphosphatkinase für die Vermittlung der Bindung des entsprechenden Inositolphosphatsubstrates verantwortlich ist.

Das zweite Exon (I258-I326) der katalytischen Domäne setzt sich funktionell aus dem bereits erwähnten $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -bindenden Kernsegment (E271-R305) und drei weiteren außerhalb liegenden Aminosäuren (T267, R270, R322) zusammen, die ebenfalls in die

Ins(1,4,5)P₃-Bindung involviert sind, sowie aus zwei für die ATP-Bindung entscheidenden Aminosäuren (R305, R310).

Über die weitere Exonaufteilung der katalytischen Domäne läßt sich zur Zeit noch keine Aussage machen, da dieser Bereich des Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase-Gens nicht mehr in den beiden genomischen Klonen repräsentiert war. Als weiteres putatives Exon läßt sich zur Zeit noch das 72 Bp große Deletionssegment der alternativen Splicevariante LC13 deuten, das für 24 Aminosäuren der katalytischen Domäne (K362-E285) kodiert.

Aus evolutionärer Sicht ist der Vergleich der Exon-/Introngrenzen zwischen Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinasen von Vertebraten und Invertebraten besonders interessant. So zeigen die in dieser Arbeit identifizierten Exon-/Introngrenzen der Hühner Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase eine sehr ähnliche Verteilung wie die des Nematoden *Caenorhabditis elegans* [Clandinin T.R. et al., 1998]. Hierbei überrascht insbesondere die Exon-/Introngrenze der CaM-bindenden Domäne der Hühner Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase, die bis auf wenige Basenpaare Unterschied auch in *C. elegans* repräsentiert ist. Die Konservierung dieser Exongrenze könnte somit auch für *C. elegans* den Aufbau aus funktionellen Modulen andeuten. Allerdings wurde bisher aufgrund des geringen Konservierungsgrades der Primärstruktur in diesem Sequenzbereich zu den Vertebraten die Existenz einer CaM-Bindungsdomäne für die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase von *C. elegans* verneint [Clandinin T.R. et al., 1998]. Unterstützt wurde diese Annahme weiterhin durch das Fehlen eines konservierten Tryptophans in dieser Region, das für die CaM-Bindung als essentiell gilt [Erneux C. et al., 1993]. Doch wurde bisher weder die Existenz noch das Fehlen einer CaM-Bindungsstelle für *C. elegans* experimentell bewiesen.

Die Konservierung der Exon-/Introngrenzen der katalytischen Domäne der Hühner Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase in der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase-Sequenz von *C. elegans* unterstützt ebenfalls die Vermutung, daß diese einen entsprechenden Aufbau aus funktionellen Modulen besitzt.

Ein zusätzlich interessanter Hinweis auf die mögliche Evolution der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinasen stammt von den DNS-Sequenzen weiterer Inositolphosphatkinasen, der yIP₆, InsP₆-Kinase 1 und 2 sowie der IPMK, die durch die Konservierung des Inositolphosphatkinasemotivs (P-C(VAI)-(ML)-D-X-K-(ML)-G), das sie mit den Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinasen teilen [Saiardi A. et al., 2000; Schell M.J. et al., 1999], identifiziert wurden. Die Konservierung des Inositolphosphatkinasemotivs zwischen diesen Inositolphosphatkinasen legte Irvin et al. die Vermutung nahe, daß sich die

Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinasen aus den InsP₆-Kinasen entwickelt haben könnten [Schell M.J. et al., 1999]. Diese Vermutung wird bekräftigt, wenn man die Gegenüberstellung der beiden Inositolphosphatkinasen, siehe Abb. 25, betrachtet. Hierbei fallen neben dem Inositolphosphatkinasemotiv weitere Sequenzmotive und Ähnlichkeiten in der Sekundärstruktur auf, die auf eine evolutionäre Beziehung zwischen den beiden Inositolphosphatkinasen schließen lassen.

Dem stark konservierten Inositolphosphatkinasemotiv folgt unmittelbar ein Sequenzbereich, der zwischen den beiden Inositolphosphatkinasen deutlich weniger stark konserviert ist und für die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase als Ins(1,4,5)P₃-bindendes Segment identifiziert wurde [Bertsch U. et al., 2000]. Sollte dieser Bereich auch in der InsP₆-Kinase der Substratbindung dienen wäre hier aufgrund der unterschiedlichen Substrate der beiden Inositolphosphatkinasen ein geringerer Homologiegrad nicht überraschend. Die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase zeigt in diesem Bereich gewisse Ähnlichkeiten (R259-M283) zu einem Segment des Ins(1,4,5)P₃-Rezeptors (siehe Abb. 25). So korrespondieren die Aminosäuren K268, R270, K272, K274 und R276 der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase mit den Aminosäuren K501, R504, R506, K508 und R511 des Ins(1,4,5)P₃-Rezeptors [Choi K.Y. et al., 1990]. Durch diese Übereinstimmung mit dem Ins(1,4,5)P₃-Rezeptor könnte man folgern, daß die Aminosäuren, die in diesem Bereich zwischen Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase und Ins(1,4,5)P₃-Rezeptor konserviert sind der spezifischen Ins(1,4,5)P₃-Bindung dienen, während die zwischen der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase und der InsP₆-Kinase übereinstimmenden Aminosäuren der generellen InsP-Bindung dienen.

Weitere in beiden Enzymen konservierte Bereiche sind das GFR-Motiv am Ende des dritten Exons der Hühner Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A sowie das SSSLxxxDG-Motiv (S389-G396) und das VxxIDFxxT-Motiv (V403-T412) (siehe Abb. 25).

Das SSSLxxxDG-Motiv zeigt Ähnlichkeiten zum katalytischen „Loop“ der Protein-kinasen und der PI 3-Kinase. Dies läßt vermuten, daß es auch in den beiden Inositolphosphatkinasen einen katalytischen „Loop“ darstellen könnte und somit als ein Indiz für die Zugehörigkeit dieser Inositolphosphatkinasen zu der Superfamilie der Protein-kinasen zu werten wäre.

Innerhalb des VxxIDFxxT-Motivs (V403-T412) dient das Aspartat in der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase der ATP-Bindung und ist essentiell für die katalytische Aktivität [Communi D. et al., 1993]. Aufgrund der Konservierung dieses Motivs auch in der InsP₆-Kinase läßt sich hier ebenfalls eine ATP-Bindungsfunktion annehmen.

Der C-Terminus beider Inositolphosphatkinasen zeigt wieder ein stärker konserviertes Sequenzmotiv GYxxGLxNLIxIxE (G434-E457) mit einer helicalen Sekundärstruktur. Für die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase konnte gezeigt werden, daß dieser helicale C-Terminus entweder direkt für die katalytische Aktivität oder zur ATP-Bindung notwendig ist. Eine Verkürzung des C-Terminus führte zu einem fast kompletten Verlust der Enzymaktivität [Togashi S. et al., 1997]. Die Ähnlichkeit des C-Terminus der InsP₆-Kinase könnte somit auch hier eine der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase entsprechende funktionellen Bedeutung andeuten.

Neben den bisher beschriebenen Sequenzbereichen, die sich durch eine stärkere Konservierung einiger Aminosäuren und der Sekundärstruktur zwischen den beiden Inositolphosphatkinasen auszeichnen, existieren jedoch auch Bereiche, die für die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase bzw. InsP₆-Kinase spezifisch zu sein scheinen. Diese Bereiche könnten somit die evolutionäre Entwicklung von der InsP₆-Kinase zur Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase andeuten. So schließt sich dem dritten Exon in der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase ein Sequenzbereich (K327-V349) an, der sich in der Sekundärstruktur aus einem unstrukturierten „Loop“ sowie einem helicalen Abschnitt zusammensetzt und in dem eine putative PKC-Phosphorylierungsstelle nachgewiesen werden konnte. In der InsP₆-Kinase wiederum folgt dem als „katalytischen Loop“ bezeichneten Bereich ein Sequenzabschnitt mit zunächst helicaler und dann unstrukturierter Sekundärstruktur. Innerhalb dieses für die InsP₆-Kinase spezifischen Bereichs lassen sich mehrere putative PKA-Phosphorylierungsstellen identifizieren. Inwieweit die beiden beschriebenen Bereiche für die jeweilige InsP-Kinase tatsächlich spezifische Funktionen, im Sinne von Substratbindung oder Regulation, ausüben, ist zur Zeit noch unklar. Hier müssen noch weitere Untersuchungen durch Mutageneseexperimente und enzymatische Analysen erfolgen.

Die Grundlagen dieser Gegenüberstellung waren neben identischen Aminosäuresequenzabschnitten Bereiche mit homologen Aminosäuren, Bereiche mit ähnlichen putativen Sekundärstrukturen sowie die Gliederung der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase in funktionelle Module, die in dieser Arbeit durch die Ermittlung der Exon-/Introngrenzen gezeigt wurde.

5. Zusammenfassung

Mit dieser Arbeit wurde das Ziel verfolgt, das 5'-Ende der DNS-Sequenz der zytosolischen Form der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase aus Hühnererythrozyten zu vervollständigen. Dies soll zur Klärung der Frage beitragen, ob die zytosolische Form der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase aus Hühnererythrozyten eine eigenständige neue Isoform der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase Enzyme darstellt oder ob es sich hierbei um eine speziesspezifische Variante der bereits bekannten Isoformen A, B oder C handelt.

Durch drei sukzessiv durchgeführte 5'RACE-PCR Runden mit mRNA, die aus 9 Tage alten Hühnerembryonen aufgereinigt wurde, konnte das 5'-Ende der DNS-Sequenz und damit der kodierende Sequenzbereich vervollständigt werden. Das Zusammenfügen aller cDNS-Sequenzen ergab eine Gesamtlänge von 2418 Bp. Hiervon stellen 1356 Bp kodierende Sequenz dar, während 132 Bp im 5'- und 930 Bp im 3'-nichttranslatierten Bereich liegen. Hieraus ergibt sich ein Translationsprodukt mit einer Länge von 452 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 51.104 kDa. Der Vergleich der Peptidsequenz mit allen bereits existierenden Peptidsequenzen der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase zeigte eine Identität von 65%, 57% bzw. 54% zu Isoformen A, B bzw. C. Des Weiteren konnten ebenfalls erhebliche Sequenzidentitäten zu der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase aus der Nematode *Caenorhabditis elegans* festgestellt werden. Aufgrund der höchsten Sequenz-identität zu der Isoform A der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase und der Identifizierung einiger, für die Isoform A typischer Sequenzmotive im Bereich des N-Terminus (Aminosäuren 68-79, 103-108 und 137-154) klassifizierten wir die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase aus Hühner- erythrozyten als zu der Isoform A gehörend ein.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte des Weiteren die Sichtung einer genomischen Hühner-DNS-Bank mit einer digoxigeninmarkierten DNS-Sonde. Die Sonde wurde aus einem cDNS-Fragment aus dem Zentrum der kodierenden Region der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase hergestellt. Hierdurch gelang die Isolierung und Sequenzierung zweier überlappender λ-Klone, die sich über 13.216 Bp und 15.546 Bp genomischer Sequenz der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase erstreckten. Die Gesamtsequenz aus den beiden Klonen ergibt eine Länge von 18.499 Bp. Innerhalb dieser genomischen Sequenz konnten durch den Vergleich mit den cDNS-Sequenzen vier Exons identifiziert werden, die für 9, 32, 71 und 69 Aminosäuren kodieren. Das für nur 9 Aminosäuren kodierende Exon, das zugleich das am weitesten am 5'-Ende gelegene ist, konnte allerdings nur in dem bereits von Michael Haefs klonierten und als LC13 bezeichneten cDNS-Klon wiedergefunden werden.

Dieser Klon fiel schon durch eine im Leserahmen liegende 72 Bp Deletion innerhalb der katalytischen Domäne auf und muß wohl als ein alternatives Spliceprodukt gewertet werden. Durch die Kombination der in dieser Arbeit gewonnenen Informationen über die Exon-/Introngrenzen innerhalb des genomischen Partialklons der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase mit denen in der Literatur beschriebenen funktionellen Resten bzw. Domänen der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase konnte für diese ein Aufbau aus funktionellen Modulen gezeigt werden.

Der Vergleich der Genstruktur der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase aus Hühnererythrozyten mit der des Nematoden *Caenorhabditis elegans* zeigte interessanterweise eine sehr ähnliche Konservierung der Exon-/Introngrenzen zwischen Vertebraten und Invertebraten; insbesondere die Exon-/Introngrenzen der CaM-bindenden Domäne (Aminosäuren 306-339).

Des weiteren wurde die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A aus Hühnererythrozyten mit der humanen InsP₆-Kinase 1 verglichen, wodurch sich zusätzliche Hinweise auf eine mögliche Abstammung der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase von der InsP₆-Kinase ergaben.

Durch die Vervollständigung der DNS-Sequenz der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A aus Hühner erythrozyten ist die Grundlage zu weiteren Untersuchungen auf eine mögliche regulatorische Funktion des N-Terminus gelegt worden. Interessante Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen sind die Klärung der genauen Funktion dieser Isoform, wobei das ähnliche gewebespezifische Expressionsmuster (Hoden und Hirn) mit den InsP₆- und PP-InsP₅-Kinasen von besonderer Bedeutung sein könnte.

6. Abkürzungen

6.1. Allgemeine Abkürzungen

AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaM	Calmodulin
cDNS	kopierte Desoxyribonukleinsäure
cpm	counts per minutes
C-terminal	carboxyterminal
CTP	Cytosintriphosphat
DAG	1,2-Diacylglycerol
Da	Dalton
DNase	Desoxyribonuklease
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dNTPs	Desoxynukleosid-5'-triphosphate
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fab-Fragment	Immunglobulin Fab-Fragment
HCl	Salzsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
kB	Kilobase
kDa	Kilodalton

K_m	Michaelis-Menten-Konstante
λ gt10	Bakteriophagen λ Stamm gt10
λ gt11	Bakteriophagen λ Stamm gt11
λ Fix II Phagen	Bakteriophagen λ Stamm Fix II
M	Mol pro Liter
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
mM	Millimol pro Liter
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
mRNS	Boten-Ribonukleinsäure
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	4-Nitrotetrazoliumblau
NGF	Nerven spez. Wachstumsfaktor
ORF	open reading frame (offenes Leseraster)
PBS-Lösung	phosphatgepufferte Lösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Blutplättchen spez. Wachstumsfaktor
PEG	Polyethylenglykol
Pfu	plaque forming unit (plaquebildende Einheit)
pZErO TM -2.1	Bakteriophagenstamm
RNS	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC-Puffer	Natriumchlorid/-citrat-Puffer
T4-DNA-Ligase	Desoxyribonukleinsäure-Ligase aus dem Phagen T4
TAE-Puffer	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
Taq-Polymerase	Desoxyribonukleinsäure-Polymerase aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE-Puffer	Tris/Borat/EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

U	Enzymeinheit
UPM	Umdrehung pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

6.2. Inositolphosphate und Phosphatidylinositole

Inositolphosphate und Phosphatidylinositole sind gemäß des IUPAC-Systems abgekürzt, wobei die Zahlen in Klammern die Position der Phosphatreste am Inositolring angeben.

InsP ₁	Inositolmonophosphat
InsP ₂	Inositolbisphosphat
InsP ₃	Inositoltrisphosphat
InsP ₄	Inosiltetrakisphosphat
InsP ₅	Inosilpentakisphosphat
InsP ₆	Inosilhexakisphosphat
InsP ₇	Diphosphoinosilpentakisphosphat
InsP ₈	Bis(diphospho)inosiltetrakisphosphat
PtdIns(x)P _y	Phosphatidylinositolphosphat

6.3. Ein - und Drei-Buchstaben-Code der Aminosäuren

Alanin	A	Ala	Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asn	Asparaginsäure	D	Asp
Cystein	C	Cys	Glutamin	Q	Gln
Glutaminsäure	E	Glu	Glycin	G	Gly
Histidin	H	His	Isoleucin	I	Iso
Leucin	L	Leu	Lysin	K	Lys
Methionin	M	Met	Phenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro	Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr	Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr	Valin	V	Val

7. Literaturverzeichnis

- Albert C.**, Safrany S.T., Bembenek M.E., Reddy K.M., Reddy K.K., Falck J.R., Bröker M., Shears S.B., Mayr G.W. (1997). Biological variability in the structures of diphosphoinositol polyphosphates in *Dictyostelium discoideum* and mammalian cells. *Biochem. J.* 327, 553-560
- Alessi D.R.**, Downes C.P. (1998). The role of PI 3-kinase in insulin action. *Biochem. et Biophys. Acta* 1436, 151-164
- Ali N.**, Duden R., Bembenek M.E., Shears S.B. (1995). The interaction of coatamer with inositol polyphosphates is conserved in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 310, 279-284
- Attree O.**, Olivos I.M., Bailey L.C., Nelson D.L., Lewis R.A., McInnes R.R., Nussbaum R.L. (1992). The Lowe's oculo-cerebrorenal syndrome gene encodes a protein highly homologous to inositol poly-phosphate-5-phosphatase. *Nature* 358, 239-242
- Balla T.**, Sim S.S., Baukal A.J., Rhee S.G., Catt K.J. (1994). Inositol polyphosphates are not increased by overexpression of Ins(1,4,5)P₃ 3-kinase but show cell-cycle dependent changes in growth factor stimulated fibroblasts. *Mol. Biol. Cell* 5, 17-27
- Balla T.**, Sim S.S., Iida T., Choi K.Y., Catt K.J., Rhee S.G. (1991). Agonist-induced calcium signaling is impaired in fibroblasts overproducing inositol 1,3,4,5-tetrakis-phosphate. *J. of Biolog. Chem.* 266, 24719-24726
- Barker C.J.**, French P.J., Moore A.J., Nilsson T., Berggren C.M., Bunce C.M., Kirk C.J., Michell R.H. (1995). Inositol 1,2,3-trisphosphate and inositol 1,2- and/or 2,3-bisphosphate are normal constituents of mammalian cells. *Biochem. J.* 306, 557-564
- Berridge M.J.**, und Irvine R.F. (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341, 197-205
- Berridge M.J.** (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361, 315-325
- Bertsch B.**, Haefs M., Möller M., Deschemeier C., Fanick W., Kitzerow A., Ozaki S., Meyer H.E., Mayr G.W. (1999) A novel A-isoform-like inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase from chicken erythrocytes exhibits alternative splicing and conservation of intron positions between vertebrates and invertebrates. *Gene*, 228, 61-71

- Bertsch U.**, Deschemeier C., Fanick W., Girkontite 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. *J. Biol. Chem.* 275, 1557-64
- Bertsch U.**, Möller M., Fanick W., Süße S., Frerk S., Mayr, G.W. (1999). Putative functional moduls in inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase isoenzymes from chicken, rat and human. *Biol. Chem.* 380, spez. Suppl., 138
- Bottomley M.J.**, Salim K., Panayotou G. (1998). Phospholipid-binding protein domains. *Biochimica et Biophysica Acta* 1436, 165-183
- Burch J.B.E.**, Davis D.L., Haas N.B., (1993). Chicken repeat 1 elements contain a pol-like open reading frame and belong to the non-long terminal repeat class of retrotransposons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 8199-8203
- Caroll D.**, Knutzen D.S., Garrel J.E. (1989). Transposable elements in *Xenopus* species. In: Berg D.E., Howe M.M. (Eds.) *Mobile DNA*. ASM Press, Washington, D.C., Chapter 24, 567-574
- Changya L.**, Gallacher D.V., Irvine R.F., Peterson O. H. (1989). Inositol 1,3,4,5-tetra-phosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate act by different mechanisms when controlling Ca^{2+} in mouse lacrimal acinar cells. *FEBS Lett.* 251, 43-48
- Chattaway J.A.**, Drobak B.K., Watkins P.A.C., Dawson A.P., Letscher A.J., Stephens L.R., Irvine R.F. (1992). An inositol 1,4,5-trisphosphate-6-kinase activity in pea roots. *Planta* 1992, 187, 542-545
- Chaudhary A.**, Gu Q.-M., Thum O., Profit A. A., Qi Y., Jeyakumar L., Fleischer S., Prestwich G. D. (1998). Specific interaction of Golgi Coatomer Protein α -COP with phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* 273, 8344-8350
- Chen Z.Q.**, Ritzel R.G., Lin C.C., Hodgetts R.B. (1991). Sequence conservation in avian CR1: an interspersed repetitive DNA family evolving under functional constraints. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 5814-5818
- Choi K.Y.**, Kim H.K., Lee S.Y., Moon K.H., Sim S S., Kim J. W., Chung H.K., Rhee S G. (1990). Molecular cloning and expression of a complementary DNA for inositol 1,4,5-trisphosphat 3-kinase. *Science* 248, 64-66
- Cifuentes M.E.**, Delaney T., Rebecchi M.J. (1994). D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate inhibits binding of phospholipase C- δ_1 to bilayer membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 1945-1994

- Clandinin T.R.**, DeModena J.A., Sternberg P.W. (1998). Inositol trisphosphate mediates a RAS-independent response to LET-23 receptor tyrosine kinase activation in *C. elegans*. *Cell* 92, 523-533
- Communi D.**, Takazawa K., Erneux, C. (1993). Lys-197 and Asp-414 are critical residues for binding of ATP/Mg²⁺ of rat brain inositol 1,4,5-trisphosphat 3-kinase. *Biochem. J.* 291, 811-816
- Communi D.**, Vanweyenberg V., Erneux C. (1994). Purification and biochemical properties of a high-molecular-mass inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase in human platelets. *Biochem. J.* 298, 669-673
- Communi D.**, Vanweyenberg V., Erneux C. (1997). D-myoinositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase A is activated by receptor activation through a calcium:calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation mechanism. *The EMBO J.* 16, 1943-1952
- Cullen P.J.**, Chung S.-K., Chang Y.-T., Dawson A.P., Irvine R.F. (1995). Specificity of the purified inositol (1,3,4,5) tetrakisphosphat-binding protein from porcine platelets. *FEBS Letters* 358, 240-242
- Cullen P.J.**, Dawson A.P., Irvine R.F. (1995). Purification and characterization of an Ins(1,3,4,5)P₄ binding protein from pig platelets: possible identification of a novel non-neuronal Ins (1,3,4,5)P₄ receptor. *Biochem. J.* 305, 139-143
- Cullen P.J.**, Hsuan J.J., Truong O., Letcher A.J., Jackson T.R., Dawson A.P., Irvine R.F. (1995). Identification of a specific Ins(1,3,4,5)P₄-binding protein as a member of the GAP1 family. *Nature* 376, 527-530
- Cullen P.J.** (1998). Bridging the GAP in inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate signalling. *Biochimica et Biophysica Acta* 1436, 35-47
- Da Silva C.P.**, Emmrich F., Guse A.H. (1994). Adriamycin inhibits inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase activity in vitro and blocks formation of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate in stimulated Jurkat T-lymphocytes. *J. of Biolog. Chem.* 269, 12521-12526
- Damen J.E.**, Liu L., Rosten P., Humphries R.K., Jefferson A.B., Majerus P.W., Krystal G. (1996). The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase. *Pro. Natl. Acad. Sci* 93, 1689-1693
- Dewaste V.**, Pouillon V., Moreau C., Shears S., Takazawa K., Erneux C. (2000).

- Cloning and expression of cDNA encoding human inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C. *Biochem. J.* in press.
- Donie F.**, Reiser G. (1991). Purification of a high-affinity inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptor from brain. *Biochem. J.* 275, 453-45
- Dubois E.**, Messenguy F. (1987). Characterization of two genes, ARGRI and ARGRIII required for specific regulation of arginine metabolism in yeast. *Mol. Gen. Genet.* 207, 142-8
- Dubois E.**, Messenguy F. (1994). Pleiotropic function of ArgRIII (Arg82p), one of the regulators of arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Role in expression of cell-type-specific genes. *Mol.Gen.Genet.* 243, 315-24
- Efanov A.M.**, Zaitsev S.V, Berggren P.O. (1997). Inositol hexakisphosphate stimulates non-Ca²⁺-mediated and primes Ca²⁺-mediate exocytosis of insulin by activation of protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4435-9
- Eickbush T.H.** (1992). Transposing without ends: the non-LTR retrotransposable elements. *New Biol.* 4, 430-440
- Erneux C.**, Moreau C., Vandermeers A., Takazawa K. (1993). Interaction of calmodulin with a putative calmodulin-binding domain of inositol1,4,5-trisphosphate 3-kinase. Effects of synthetic peptides and site-directed mutagenesis of Trp 165. *Eur. J. Biochem.* 214, 497-501
- Estevez F.**, Pulford D., Stark M.J., Carter N., Downes P. (1994). Inositol trisphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: identification, purification and properties of inositol 1,4,5-trisphosphate 6-kinase. *Biochem. J.* 302, 709-16
- Fanning T.G.**, Singer M.F. (1987). Line-1: a mammalian transposable element. *Biochim. Biophys. Acta* 910, 203-212
- Fleischer B.**, Xie J., Mayrleitner M., Shears S.B., Palmer D. J., Fleischer S. (1994) Golgi coatomer binds, and forms K⁺-selective channel gated by, inositol polyphosphates. *J. Biol. Chem.* 269, 17826-17832
- French P.J.**, Bunce C.M., Stephens L.R., Lord J.M., McConnell F.M., Brown G., Creba J.A., Michell R.H.(1991). Changes in the levels of inositol lipids and phosphates during the differentiation of HL60 promyelocytic cells towards neutrophils or monocytes. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 245, 193-201
- Fukuda M.**, Aruga J., Niinobe M., Aimoto S., Mikoshiba K. (1995). Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphate binding to C2b domain of IP4BP/synaptotagmin II.

- J. Biol. Chem. 269, 29206-29211
- Gabriel A.**, Boeke J.D. (1993). Retrotransposon reverse transcription. In: Skalka A.M., Goff S.P. (Eds.), Reverse Transcriptase. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Plainview, NY, 275-328
- Glennon M.C.**, Shears S.B (1993). Turnover of inositol pentakisphosphates, inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol polyphosphates in primary cultured hepatocytes. *Biochem. J.* 1993, 293, 583-90
- Guse A.H.**, Greiner E., Emmrich F., Brand K. (1993). Mass changes of inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate and inositol hexakisphosphate during cell cycle progression in rat thymocytes. *J. Biol. Chem.* 268, 7129-7133
- Haas N.B.**, Grabowski J.M., Sivitz A.B., Burch J.B.E. (1997). Chicken repeat 1 (CR1) elements, which define an ancient family of vertebrate non-LTR retrotransposons, contain two closely spaced open reading frames. *Gene* 197, 305-309
- Haefs, M** (1994). Reinigung, Charakterisierung und Klonierung der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase aus Hühnererythrozyten. Naturwissenschaftliche Dissertation. Ruhr-Universität Bochum
- Hammonds-Odie L.P.**, Jackson T.R., Profit A.A., Blader I.J., Turck C.W., Prestwich G.D., Theibert A.B. (1996). Identification and cloning of centaurin- α . A novel phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-binding protein from rat brain. *J. Biol.Chem.* 271, 18859-68.
- Hawkins P.T.**, Poyner D.R., Jackson T. R., Letcher A.J., Lander D.A., Irvine R.F. (1993). Inhibition of iron-catalysed hydroxyl radical formation by inositol polyphosphates: a possible physiological function for myo-inositol hexakisphosphate. *Biochem. J.* 294, 929-934
- Helgason C.D.**, Damen J.E., Rosten P., Grewal R., Sorensen P., Chappel S.M., Borowski A., Jirik F., Krystal G., Humphries R.K. (1998). Targeted disruption of SHIP leads to hemopoietic perturbations, lung pathology, and a shortened life span. *Genes Dev.* 12, 1610-1620
- Ho M.W.Y.**, Shears S.B., Bruzik K.S., Duszyk M., French A.S. (1997) Ins(3,4,5,6)P₄ specifically inhibits a receptor-mediated Ca²⁺-dependent Cl⁻ current in CFPAC-1 cells. *Am. J. Physiol.* 272, 1160-8.
- Huang C.F.**, Vogelmaier S.M., Bembenek M.E., Saiardi A. and Snyder S.H. (1998) Identification and purification of diphosphoinositol pentakisphosphate kinase, which

- synthesizes the inositol bis(diphospho)inositol tetrakisphosphate.
Biochemistry 37, 14998-5004
- Huang K.N.**, Symington L.S. (1994). Mutation of the gene encoding protein kinase C stimulates mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol. Cell. Biol. 14, 6039-45
- Huang K.N.**, Symington L.S. (1995). Suppressors of a *Saccharomyces cerevisiae* *pkc1* mutation identify alleles of the phosphatase gene *PTC1* and of a novel gene encoding a putative basic leucine Zipper protein. *Genetics* 141, 1275-85
- Irvine R.F.** (1990). Quanteal Ca^{2+} release and the control of Ca^{2+} entry by inositol phosphates - a possible mechanism. *FEBS Lett.* 263. 5-9a
- Isaacks R.E.**, Harhness D.R. (1980). Erythrocyte organic phosphates and haemoglobine function in birds, reptils and fishes. *Am. Zool.* 20, 115-129
- Ismailov I.I.**, Fuller C.M., Berdiev B.K., Shlyonsky V.G., Benos D.J., Barret K.E. (1996). A biologic function for an "orphan" messenger: D-myo-inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate selectively blocks epithelial calcium-activated chloride channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 10505-10509
- Johanson R.A.**, Hansen C.A., Williamson J.R. (1988). Purification of D-myo-inositol 1,4,5 trisphosphate 3-kinase from rat brain. *J. Biol. Chem.* 263, 7465-7471
- Johnson R.M.**, Wasilenko W.J., Mattingly R.R., Weber M.J., Garrison J.C. (1989) Fibroblasts transformed with *v-src* show enhanced formation of an inositol tetrakisphosphate. *Science* 246, 121-124
- Köppler P.**, Mersel M., Humbert J.-P., Vignon J., Vincendon G, Malviya A.N. (1996) High affinity inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptor from rat liver nuclei: Purification, characterization, and amino-terminal sequence.
Biochemistry 35, 5481-5487
- Kozak M.** (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic-Acids-Res.* 15, 8125-48
- Larson O.**, Barker C.J., Sjöholm A., Carlqvist H., Michell R.H., Bertorello A., Nilsson T., Honkanen R.E., Mayr G.W., Zwiller J., Berggren P.O. (1997). Inhibition of phosphatases and increased Ca^{2+} channel activity by hexakisphosphate. *Science* 278, 471-474
- Laussmann T.**, Reddy K.M., Reddy K.K., Falck J.R., Vogel G. (1997). Diphospho-myo-inositol phosphates from *Dictyostelium* identified as D-6-diphos-

- pho-myo-inositol pentakisphosphate and D-5,6-bisdiphospho-myo-inositol tetrakisphosphate. *Biochem. J.* 322, 31-33
- Laussmann T.**, Hansen A., Reddy K.M., Reddy K.K., Falck J.R., Vogel G. (1998). Diphospho-myo-inositol phosphates in *Dictyostelium* and *Polysphondylium*: identification of a new bisdiphospho-myo-inositol tetrakisphosphate. *FEBS Lett.* 426, 145-150
- Lee S.Y.**, Sim S.S., Kim J.W., Moon K.H., Kim J.H., Rhee S.G. (1990). Purification and properties of D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase from rat brain. *J. Biol. Chem.* 265, 9434-9440
- Lowe C.V.**, Terrey M., MacLachan E.A. (1952). Organic-aciduria, decreased renal ammonia production, hydrophthalmus and mental retardation. *Am. J. Dis. Child.* 83, 164-184
- Mayr G.W.**, Dietrich W. (1987). The only inositol tetrakisphosphate detectable in avian erythrocytes is the isomer lacking phosphate at position 3: a NMR study. *FEBS Lett.* 213, 278-282
- Mayr G.W.**, Thieleczek (1991). Masses of inositol phosphates in resting and tetanically stimulated vertebrate skeletal muscles. *Biochem. J.* 280, 1-10
- Mayr G.W.**, Radenberg T., Vogel G. and Stephens L.R. (1992). Phosphoinositol diphosphates: non-enzymatic formation in vitro and occurrence in vivo in the cellular slime mold *Dictyostelium*. *Carbohydr. Res.* 234, 247-262
- Mc Connell F.M.**, Stephens L.R., Shears S.B. (1991). Multiple isoforms of inositol pentakisphosphate in Epstein-Barr virus transformed (T5-1) B-lymphocytes. Identification of inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate, D-inositol 1,2,4,5,6-pentakisphosphate, L-inositol 1,2,4,5,6-pentakisphosphate. *Biochem. J.* 280, 323-329
- Mello-Filho A.C.**, Meneghini R. (1991). Iron is the intracellular metal involved in the production of DNA damage by oxygen radicals. *Mut. Res.* 251, 109-113
- Mengubas K.**, Jabbar S.A.B., Nye K.B., Wilkes S., Hoffbrand A.V., Wickremasinghe R.G. (1994). Inactivation of calcium ion-regulating inositolpolyphosphate second messengers is impaired in subpopulations of human leukemia cells. *Leukemia* 8, 1718-1725
- Mizutani A.**, Fukuda M., Niinobe M., Mikoshiba K. (1997). Regulation of AP-2 synaptotagmin interaction by inositol high polyphosphates.

- Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997, 240, 128-31
- Moon K.H.**, Lee S.Y., Rhee S.G. (1989). Development changes in activities of phospholipase C, 3-kinase, and 5-phosphatase in rat brain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 164, 370-374
- Morris A.J.**, Downes C.P., Harden T.K., Michell R.H. (1987). Turkey erythrocytes possess a membrane-associated inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase that is activated by Ca^{2+} in the presence of calmodulin. Biochem. J. 248, 489-493
- Muiras M.L.**, Giacomoni P.U., Tachon P. (1993). Modulation of DNA breakage induced via the Fenton reaction. Mut. Res. 295, 47-54
- Niinobe M.**, Yamaguchi Y., Fukuda M., Mikoshiba K. (1994). Synaptogamin is an inositol polyphosphate binding protein: Isolation and characterization as an $\text{Ins}1,3,4,5\text{-P}_4$ binding protein. Biochem. and Biophys. Research Commun. 205, 1036-1042
- Norbis F.**, Boll M., Stange G., Markovich D., Verrey F., Biber J., Murer H (1997). Identification of a cDNA/protein leading to an increased P_i -uptake in *Xenopus laevis* Oocytes. J. Membr. Biol. 1997, 156, 19-24
- 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. J. Biol. Chem. 270, 214-218
- Nye K.**, Riley G.A., Poulter L.W., Portiri E., Hoffbrand A.V., Wickremasinghe R.G. (1992). Impaired degradation of Ca^{2+} -regulating second messengers in myeloid leukemia cells. Implication for the regulation of leukemia cell proliferation. Leukemia 6, 801-805
- O'Halloran T.V.** (1993). Transition metals in control of gene expression. Science 261, 715-725
- O'Rourke F.**, Matthews E., Feinstein M.B. (1996). Isolation of InsP_4 and InsP_6 binding proteins from human platelets: InsP_4 promotes Ca^{2+} efflux from inside-out plasma membrane vesicles containing 104 kDa GAP1 IP4BP protein. Biochem. J. 315, 1027-1034
- Odom A.R.**, Stahlberg A., Wentz S.R., York J.D. (2000). A role for nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate kinase in transcriptional control. Science 287, 2026-2029
- Ongusaha P.P.**, Hughes P.J., Davey J., Michel R.H. (1998). Inositol hexakisphosphate in *Schizosaccharomyces pombe*: synthesis from $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ and osmotic regulation

- Biochem. J. 335, 671-9
- Phillippy B.Q.**, Graf E. (1997). Antioxidant functions of inositol 1,2,3-trisphosphate and inositol 1,2,3,6-tetrakisphosphate. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 939-946
- Qiu H.F.**, Dubois E., Broen P., Messenguy F. (1990). Functional analysis of ArgRI and ArgRIII regulatory proteins involved in the regulation of arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Gen.Genet.* 222, 192-200
- Reiser G.**, Schäfer R., Donie F., Hülser E., Nehls-Sahanbandu M., Mayr G.W. (1991). A high-affinity inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptor protein from brain is specifically labelled by a newly synthesized photoaffinity analogue, N-(4 azido salicyl)-aminoethanol(1)-1-phospho-D-myo-inositol 3,4,5-trisphosphate. *Biochem. J.* 280, 533-539
- Safrany S.T.** and Shears S.B. (1998). Turnover of bis-diphosphoinositol tetrakisphosphate in a smooth muscle cell line is regulated by β_2 -adrenergic receptors through a cAMP-mediated A-kinase-independent mechanism. *The EMBO J.* 17, 1710-1716
- Saiardi A.**, Erdjument-Bromage H., Snowman A.M., Tempst P., Snyder S.H. (2000) Synthesis of diphosphoinositol pentakisphosphate by a novel family of higher inositol polyphosphate kinases. *Curr.Biol.* 9, 1323-6
- Schell M.J.**, Letscher A.J., Brearley C.A., Biber J., Murer H. and Irvine R.F. (1999). PiUS (Pi-uptake stimulator) is an inositol hexakisphosphate. *FEBS-Lett.* 461(3), 169-72
- Schiavo G.**, Gu Q.M., Prestwich G.D., Söllner T.H., Rothmann J.E. (1996). Calcium-dependent switching of the specificity of phosphoinositide binding to synaptotagmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 13327-1332
- Shamsuddin A.M.** (1995). Inositol phosphates have novel anticancer function. *J. Nutr.* 125, 725S-732S
- Shamsuddin A.M.**, Vucenik I., Cole K.E. (1997). Minireview, IP₆: A novel anti-cancer agent. *Life Science* 61, 343-354
- Shears S.B.** (1998). The versatility of inositol phosphates as cellular signals. *Biochimica et Biophysica Acta* 1436, 49-67
- Shears S.B.**, in . B.B. Biswas, S. Biswas (Eds.) (1996). *Myo-Inositol Phosphates, Phosphoinositides and signal transduction.* Plenum Press, New York, 1996, 187-226
- Shin Y.S.**, Choi G., Choi K.Y. (1995). Overexpression, purification and characteriza-

- tion of inositol 1,4,5-trisphosphat 3-kinase from rat brain. *Mol. Cells.* 5, 348-353
- Sihag R.K.**, Wang L.W., Cataldo A.M., Hamlin M., Cohen C.M., Nixon R.A. (1994). Evidence for the association of protein 4.1 immunoreactive forms with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brains. *Brain Res* 1994, 656, 14-26
- Sim S.S.**, Kim J. W., Rhee S.G. (1990). Regulation of D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase by cAMP-dependent protein kinase and Protein Kinase C. *J. Biol. Chem.* 265, 10367-10372
- Soriano S.**, Banting G. (1997). Possible roles of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B in Ca^{2+} homeostasis. *FEBS Lett.* 403, 1-4
- Soriano S.**, Thomas S., High S., Griffiths G., D'Santos C., Cullen P., Banting G. (1997). Membrane association, localization and topology of rat inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B: Implications for membrane traffic and Ca^{2+} homeostasis. *Biochem. J.* 324, 579-589
- Speed C.J.**, Little P.J., Hayman J.A., Mitchel A.C. (1996). Underexpression of the 43 kDa inositol polyphosphate 5-phosphatase is associated with cellular transformation. *The EMBO Journal* 15, 4852-4861
- Stephens L.R.**, Radenberg T., Thiel U., Vogel G., Khoo K.H., Dell A., Jackson T.R., Hawkins P.T. and Mayr G.W. (1993). The detection, purification, structural characterization, and metabolism of diphosphoinositol pentakisphosphate(s) and bisdiphosphoinositol tetrakisphosphate. *J. Biol. Chem.* 268, 4009-15
- Stephens L.R.**, Jackson T.R., Hawkins P.T. (1993). Agonist-stimulated synthesis of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate: a new intracellular signalling system? *Biochem. Biophys. Acta* 1179, 27-25
- Stricker R.**, Hülser E., Fischer J., Jarchau T.H., Walter U., Lottspeich F., Reiser G. (1997). cDNA cloning of porcine $p42^{IP4}$, a membrane-associated and cytosolic 42 kDa inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptor from pig brain with similarly high-affinity for phosphatidylinositol 3,4,5- P_3 . *FEBS Letters* 405, 229-236
- Stumph W.E.**, Kristo P., Tsai M., O'Malley B.W. (1981). A chicken middle-repetitive DNA sequence which shares homology with mammalian ubiquitous repeats. *Nucl. Acids Res.* 9, 5383-5397
- Südhof T.C.** (1995). The synaptic vesicle cycle: cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375, 645-653
- Takazawa K.**, Passareiro H., Dumont J. E., Erneux C. (1989). Purification of bovine

- brain inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase: identification of the enzyme by SDS/polyacrylamide-gel electrophoresis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, 483-488
- Takazawa K.**, Lemos M., Delvaux A., Lejeune C., Dumont J.E., Erneux C. (1990 a). Rat braininositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase: Ca^{2+} -sensitivity, purification and antibody production. *Biochem. J.* 268, 213-217
- Takazawa K.**, Vandekerckhove J., Dumont J. E., Erneux, C. (1990b). Cloning and expression in *E. coli* of rat brain cDNA encoding a Ca^{2+} /calmodulin sensitive inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase. *Biochem. J.* 272, 107-112
- Takazawa K.**, Erneux C. (1991). Identification of residues essential for catalysis and binding of calmodulin in rat brain inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase. *Biochem. J.* 280, 125-129
- Takazawa K.**, Perret J., Dumon J.E., Erneux C. (1991a). Molecular cloning and expression of a human brain inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 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. *Biochem. J.* 278, 883-886
- Takazawa K.**, Go M., Togashi S., Endo T., Erneux C., Onaya T.
EMBL Datenbankeintrag D38169
- Tan Z.**, Bruziki K.S., Shears S.B. (1997). Properties of the Inositol 3,4,5,6,-tetrakisphosphate 1-kinase purified from rat liver. *J. Biol. Chem.* 272, 2285-2290
- Theibert A.B.**, Estevez V.A., Ferris C.D., Danoff S.K., Barrow R. K., Prestwich C. D., Snyder S.H. (1991). Inositol 1, 3, 4, 5-tetrakisphosphate and inositol hexakisphosphate receptor proteins: Isolation and characterization from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 3165-3169
- Theibert A.B.**, Estevez V.A., Mourey R. J., Marecek J. F., Barrow R. K., Prestwich C.D., Snyder, S.H. (1992). Photoaffinity labeling and characterization of isolated inositol 1,3,4,5 tetrakisphosphate- and inositolhexakisphosphate-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 267, 9071-9079
- Thomas B.**, Brake B., Luzio J.P., Stanley K., Banting G. (1994). Isolation and sequence of a full-length cDNA encoding a novel inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1220, 219-222
- Thomas S.**, Soriano S., D`Santos C., Banting G. (1996). Expression of the recombi-

- nant rat myo-inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B suggest a regulatory role for its N-terminus. *Biochem. J.* 319, 713-716
- Timerman A.P.**, Mayrleitner M.M., Lukas T.J., Chadwick C.C., Saito A., Watterson D.M., Schindler H., Fleischer S. (1992). Inositol polyphosphate receptor and clathrin assembly protein AP-2 are related proteins that form potassium-selective ion channels in planar lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8976-8980
- Togashi S.**, Takazawa K., Endo T., Erneux C., Onaya T. (1997). Structural identification of the myo-inositol 1,4,5-trisphosphate-binding domain in rat brain inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase. *Biochem. J.* 326, 221-225
- Ui M.**, Okada T., Hazeki O. (1995). Wortmannin as a unique probe for an intracellular signalling protein, phosphoinositide 3-kinase. *Trends Biochem. Sci.* 20, 303-307
- Vandergon T.L.**, Reitman M., (1994). Evolution of chicken repeat 1 (CR1) elements: evidence for ancient subfamilies and multiple progenitors. *Mol. Biol. Evol.* 11, 886-898
- Vanweyenbergh V.**, Communi D., D'Santos C.S., Erneux C. (1995). Tissue- and cell-specific expression of Ins(1,4,5)P₃ 3-kinase isoenzymes. *Biochem. J.* 306, 429-435
- Vogelmaier S.M.**, Keen J.H., Murphy J.-E., Ferris C.D., Prestwich G.D., Snyder S.H., Theibert A.B. (1992). Inositol hexakisphosphate receptor identified as the clathrin assembly protein AP-2. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 187, 158-163
- Vogelmaier S.M.**, Kaplin A.I., Bembenek M.E., Dorman G., Prestwich G.D., Snyder S.H. (1994). 24th annual Meeting of the Society for Neuroscience 1994 Abstract 383.6.
- Vogelmaier S.M.**, Bembenek M.E., Kaplin A.I., Dorman G., Olszewski J.D., Prestwich G.D. and Snyder S.H. (1996). Purified inositol hexakisphosphate kinase is an ATP synthase: diphosphoinositol pentakisphosphate as a high-energy phosphate donor. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 4305-10
- Weiner A.M.**, Deininger, P.L., Efstratidis, A. (1986). Nonviral retroposons: genes, pseudogenes and transposable elements generated by reverse flow of genetic information. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 631-661
- Wennström S.**, Hawkins P., Cooke F., Hara K., Yonezawa K., Kasuga M., Jackson T., Claesson-Welsh L., Evans T., Symons M., Stephens L. (1994). Activation of phosphoinositide 3-kinase is required for PDGF-stimulated membrane ruffling. *Curr. Biol.* 4, 385-93

- Wilson M.P.**, Majerus P.W. (1996). Isolation of inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase, cDNA cloning and expression of the recombinant enzyme.
J. Biol. Chem. 1996, 271, 11904-10
- Woodring P.J.**, Garrison J.C. (1996). Transformation of Rat-1 fibroblasts with the v-src oncogene induces inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase expression.
Biochem. J. 319, 73-80
- Xie W.**, Kaetzel M.A., Karol S., Dedman J.R., Shears S.B., Nelson D.J. (1996). Inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate inhibits the calmodulin-dependent Protein Kinase II-activated chloride conductance in T84 colonic epithelial cells.
J. of Biol. Chem. 271, 14092-14097
- Yamaguchi K.**, Hirata M., Kuriyama H. (1988). Purification and characterization of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase from pig aortic smooth muscle.
Biochem. J. 251, 129-134
- 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. J. Biol. Chem. 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
- Yoshida Y.**, Imai S. (1997). Structure and funktion of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Jpn. J. Pharmacol. 74, 125-137
- Zang X.L.**, Jefferson A.B., Auethavekiat V., Majerus P.W. (1995) The protein deficient in Lowe syndrome is a phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 5-phosphatase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92, 4853-1856

8. Danksagung:

Herrn Prof. Dr. Mayr danke ich für sein Vertrauen zur Überlassung des Themas und die Bereitstellung der gesamten labortechnischen und materiellen Infrastruktur sowie für die finanzielle Unterstützung als wissenschaftliche Hilfskraft.

Größten Dank möchte ich meinem Betreuer Herrn Dr. Uwe Bertsch aussprechen, der mich in die molekularbiologischen Arbeitstechniken eingewiesen hat und mir freundschaftlich mit Rat und Tat zur Seite stand.

Werner Fanick danke ich für die vielen hilfreichen Tricks und Tips aus seinem umfangreichen Erfahrungsschatz, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Für die finanzielle Unterstützung möchte ich mich bei dem DFG- geförderten Graduiertenkolleg für Molekulare Endokrinologie - Molekularer Stoffwechsel bedanken.

Des weiteren möchte ich mich bei allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe und des Institutes für die gute Zusammenarbeit und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre bedanken. Hier möchte insbesondere Sigrid Poll, Kirsten Hillemeier, Christina Deschemeier, Claudia Albert, Birgit Flügge, Christopher Illies, Sven Haveland, Dr. Wolfgang Weglöhner, Dr. Joachim Weizel, Finn Zedler, Marcus Nalaskowski, Klaas Max und Karsten Lindner nennen.

Für die Unterstützung in allen computertechnischen Fragen sowie für das Korrekturlesen der Arbeit und seine Freundschaft möchte ich mich bei Thomas Streichert bedanken. Für das Korrekturlesen der Arbeit bedanke ich mich ebenfalls bei Christina Deschermeier, Stefanie Heuer, Frau Hannigbrinck und meiner Freundin Kerstin Thamm.

Bei meiner Freundin Kerstin Thamm möchte ich mich vor allem für die Geduld und das Verständnis in den letzten Jahren bedanken, in denen ich manches Wochenende und die Semesterferien im Labor verbrachte.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern für ihre großzügige Unterstützung während des Studiums und dieser Arbeit und ihrer Erziehung, die die Grundlage nicht nur dieser Arbeit stellt.

9. Curriculum Vitae:

Persönliche Daten:

Name: Marcus Möller
Geburtsdatum: 26. September 1970
Geburtsort: Stade
Familienstand: ledig
Nationalität: Deutsch
Adresse: Heider Straße 15
20251 Hamburg

Ausbildung:

Schulbildung:	1977-81	Grundschule in Hameln
	1981-83	Orientierungsstufe in Hameln
	1983-90	Albert-Einstein-Gymnasium in Hameln
	1990	Abitur
Wehrdienst:	1990-92	Ausbildung zum Sanitätstruppenoffizier der Reserve: Dienstgrad Oberleutnant d. R.
Studium:	10.1992	Beginn des Medizinstudiums am Universitäts-Klinikum-Hamburg-Eppendorf
	09.1994	Physikum
	09.1995	1. Staatsexamen
	09.1998	2. Staatsexamen
	12.1999	3. Staatsexamen
AiP-Zeit:	02.2000	Bei Herrn Prof. Dr. med. Koch in der HNO-Klinik des Universitätsklinikums Eppendorf
Promotion:	seit 11.1995	Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie Universitätsklinikum-Hamburg-Eppendorf Direktor: Prof. Dr. med. Georg W. Mayr

Erklärung:

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, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:

Gez. Marcus Möller, im Januar 2001