

5. Zusammenfassung

Mit dieser Arbeit wurde das Ziel verfolgt, das 5'-Ende der cDNA-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 cDNA-Sequenz und damit der kodierende Sequenzbereich vervollständigt werden. Das Zusammenfügen aller cDNA-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-DNA-Bank mit einer digoxigeninmarkierten cDNA-Sonde. Die Sonde wurde aus einem cDNA-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 cDNA-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 cDNA-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.