

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie I - Zelluläre Signaltransduktion
des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. Georg W. Mayr

**Rekombinante Expression, Charakterisierung und Target-
Eigenschaften von Inositolphosphatkinasen humanpathogener
Protozoen**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg
vorgelegt von

Benjamin Lothar Löser
aus Hamburg

Hamburg, 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 11.02.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der / die Vorsitzende: Prof. Dr. Georg W. Mayr

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter / in: PD Dr. Evita Mohr

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter / in: Prof. Dr. Dr. Ulrike Beisiegel

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	7
2	Arbeitshypothese und Fragestellung	9
3	Einleitung	11
3.1	Inositolphosphate als wichtige Second Messenger der intrazellulären Signaltransduktion	11
3.2	Die Inositolphosphatkinasen der PDKG-Familie mit besonderer Betrachtung der Inositolphosphatmultikinase [IPMK] und Inositolhexakisphosphatkinase [IP6K] bei höher entwickelten <i>Eukaryoten</i>	14
3.2.1	Die Funktion der Inositolphosphatmultikinase [IPMK]	14
3.2.2	Die Funktion der Inositolhexakisphosphatkinasen [IP6K]	15
3.3	Die humanpathogenen Protozoen <i>Entamoeba histolytica</i> und <i>Trichomonas vaginalis</i>	16
3.3.1	Aufbau und Vorkommen von <i>Entamoeba histolytica</i>	16
3.3.2	<i>Entamoeba histolytica</i> als Erreger der Amoebiasis	19
3.3.3	Aufbau und Vorkommen von <i>Trichomonas vaginalis</i>	22
3.3.4	Durch <i>Trichomonas vaginalis</i> ausgelöste Erkrankungen	22
4	Material und Methoden	25
4.1	Material	25
4.1.1	Apparative Ausrüstung	25
4.1.2	Software.....	26
4.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	26
4.1.4	Chemikalien	26
4.1.5	Inositolphosphate.....	28
4.1.6	Enzyme	28
4.1.7	Verwendete Kits.....	28
4.1.8	Größenstandards für Proteine und doppelsträngige DNA	28
4.1.9	Oligonukleotide	29
4.1.10	cDNA-Vollsynthesen präzidierter Inositolphosphatkinasen unbekannter Spezifität aus <i>Entamoeba histolytica</i> und <i>Trichomonas vaginalis</i>	29
4.1.11	Puffer und Lösungen	31
4.1.11.1	Puffer für DNA-Polymerasen und DNA-Ligasen	31
4.1.11.2	Puffer für Agarosegelelektrophorese	31
4.1.11.3	Lösungen für SDS-PAGE	32
4.1.11.4	Puffer zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	33
4.1.11.5	Sonstige Puffer	33
4.1.12	Säulenmatrizes	33
4.1.13	Bakterienstämme und Medien.....	33
4.1.14	Vektoren	34

4.2	Methoden	36
4.2.1	Molekularbiologische Methoden	36
4.2.1.1	Polymerasekettenreaktion [PCR]	36
4.2.1.1.1	DNA-Amplifikation durch PCR	36
4.2.1.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	37
4.2.1.3	DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen.....	37
4.2.1.4	Schneiden von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	37
4.2.1.5	Ligation	37
4.2.1.6	Plasmid-Minipräparation.....	38
4.2.1.7	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	38
4.2.1.8	DNA-Sequenzierung.....	38
4.2.2	Mikrobiologische Methoden.....	39
4.2.2.1	Sterilisation von Gebrauchsmaterial.....	39
4.2.2.2	Anzucht und Lagerung von Bakterien (<i>E. coli</i> -Stämme)	39
4.2.2.3	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i>	39
4.2.2.4	Transformation von <i>E. coli</i> -Stämmen	40
4.3	Proteinbiochemische Methoden.....	40
4.3.1	Rekombinante bakterielle Expression von Proteinen.....	40
4.3.2	Lyse der Bakterien.....	41
4.3.3	Aufreinigung der Inositolphosphatkinasen durch die P11-Phosphocellulose-Säule	41
4.3.3.1	Herstellung der P11-Phosphocellulose-Säule.....	41
4.3.3.2	Reinigung der im Bakterienlysat vorhandenen rekombinanten IPKs durch	42
	Chromatographie.....	42
4.3.3.3	DEAE-Sephacel-Säulenchromatographie zur IPK-Ankonzentrierung.....	42
4.3.4	Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen	43
4.3.5	Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Brilliant-Blue.....	45
4.3.6	Konservierung und Aufbewahrung der Gele	45
4.3.7	HPLC-Analytik von Inositolphosphaten durch die Metal-Dye-Detection Methode (MDD)	45
4.3.7.1	Enzymatische Testungen der IPKs unbekannter InsPx-Spezifität	45
4.3.7.1.1	Enzymkinetik.....	46
4.3.7.1.2	Hemmstoffversuche	46
4.3.7.2	Aufreinigung der Proben für die HPLC-Analyse.....	46
5	Ergebnisse	48
5.1	Homologievergleiche zwischen der <i>Entamoeba histolytica</i> IPK [EhIPK-1],	48
	<i>Trichomonas vaginalis</i> IPK [TvIPK-1] und ausgewählten Kinasen	48
5.1.1	Erklärung der PDKG-Kinase Terminologie.....	53
5.2	Klonierung einer IPK aus <i>Entamoeba histolytica</i> [EhIPK-1] in den bakteriellen	55
	Expressionsvektor <i>pASK-IBA 3</i>	55
5.3	Bakterielle Expression der EhIPK-1.....	59
5.4	Partielle Aufreinigung des Bakterienlysats.....	60

5.4.1	Partielle Aufreinigung der EhIPK-1 durch die P11-Phosphocellulose-Säule.....	60
5.4.2	Aufkonzentrierung der EhIPK-1 mit der DEAE-Sephacel-Säule	61
5.5	Enzymkinetik	62
5.5.1	Vorversuche zum Ermitteln der optimalen Umgebungsvariablen für die EhIPK-1.....	63
5.5.2	K_M -Wert-Bestimmung für das vermutliche Hauptsubstrat Ins(1,4,5) P_3	63
5.5.3	K_M -Wert-Bestimmung für ATP	65
5.6	Substratselektivität der EhIPK-1	66
5.6.1	Umsetzung unterschiedlicher Substrate durch EhIPK-1	66
5.6.1.1	Umsetzung von Ins(1,4,5) P_3 durch EhIPK-1	67
5.6.1.2	Umsetzung von Ins(2,4,5) P_3 durch EhIPK-1	70
5.6.1.3	Umsetzung von Ins(1,4,6) P_3 durch EhIPK-1	71
5.6.1.4	Umsetzung von D/L-Ins(1,3,4,5) P_4 durch EhIPK-1	72
5.6.1.5	Umsetzung von Ins(1,4,5,6) P_4 durch EhIPK-1	73
5.6.1.6	Umsetzung von Ins(3,4,5,6) P_4 durch EhIPK-1	74
5.6.1.7	Umsetzung von Ins(1,3,4,6) P_4 durch EhIPK-1	75
5.6.1.8	Umsetzung von Ins(1,3,4,5,6) P_5 durch EhIPK-1	77
5.6.1.9	Umsetzung von D/L-Ins(1,2,4,5,6) P_5 durch EhIPK-1	78
5.6.1.10	Umsetzung von D/L-Ins(1,2,3,4,5) P_5 durch EhIPK-1	79
5.6.1.11	Umsetzung von Ins(1,2,3,4,6) P_5 durch EhIPK-1	80
5.6.1.12	Umsetzung von Ins P_6 durch EhIPK-1	81
5.6.2	Limitierte Hydrolyse von PP-InsP-Isomeren durch Trichloressigsäure	
	[TCA]-Behandlung	82
5.6.3	Zusammenfassung der Substratselektivität der EhIPK-1	84
5.7	Aktivitätsbestimmung der EhIPK-1 für die eingesetzten Substrate	87
5.8	Identifizierung von Inhibitoren der EhIPK-1	96
5.8.1	Bestimmung der IC_{50} -Werte für ausgewählte Hemmstoffe	98
5.8.1.1	Effekte unterschiedlicher Polyphenole auf die Enzymaktivität der EhIPK-1	98
5.9	Klonierung einer IPK aus <i>Trichomonas vaginalis</i> [TvIPK-1] in den bakteriellen	
	Expressionsvektor <i>pASK-IBA 5</i>	102
5.10	Bakterielle Expression der TvIPK-1	104
5.11	Partielle Aufreinigung des Bakterienlysats der TvIPK-1 durch die P11-.....	
	Phosphocellulose-Säule	105
5.12	Erste enzymatische Untersuchungen der TvIPK-1	105
5.12.1	Bestimmung der Substrateigenschaften für Ins P_6	105
5.12.2	K_M -Wert-Bestimmung für ATP	106
5.12.3	Substratselektivität der TvIPK-1	107
6	Diskussion	109
6.1	Phylogenie der EhIPK-1 und TvIPK-1.....	109

6.2	Struktur, biologische Funktion und Vergleich der EhIPK-1 mit ausgewählten IPKs....	114
6.3	Putative Strukturmodelle der EhIPK-1	118
6.4	Struktur und biologische Funktion von pyrophosphorylierten Inositolringen	125
6.4.1	Prädiktion von Strukturmodellen der PP-InsP ₃ -Isomere	126
6.4.2	Prädiktion von Strukturmodellen der PP-InsP ₄ -Isomere	129
6.4.3	Prädiktion von Strukturmodellen der PP ₂ -InsP ₃ -Isomere und InsP ₈	133
6.5	Ist die EhIPK-1 eine IP5K?	138
6.6	Funktionsvielfalt und Aminosäuresequenz-Homologien der EhIPK-1.....	138
6.7	Vergleich bekannter Hemmstoffe von IPKs mit potenten Inhibitoren der EhIPK-1	140
7	Zusammenfassung und Ausblick	143
8	Literaturverzeichnis	145
9	Anhang	155
10	Danksagung	159
11	Lebenslauf	160
12	Eidesstattliche Versicherung	162

1 Abkürzungsverzeichnis

3D	Dreidimensional
AHT	Anhydrotetrazyklin
AMPPNP	Adenylimidodiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATA	Aurintricarbonsäure
Ca ²⁺	Calcium-Ion
DAG	Sn(1,2)Diacylglycerol
DMT	Dimethoxytrityl
DNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	(1,4)-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EhIPK-1	In dieser Arbeit charakterisierte IPK aus <i>Entamoeba histolytica</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure
IC	Inhibitorische Konzentration
IPK	Inositolphosphatkinase
IP3K	Inositolphosphat-3-Kinase
IP52K	Inositolphosphat-5-2-Kinase
IP6K	Inositolphosphat-6-Kinase
IPMK	Inositolphosphatmultikinase
IPP	Inositolphosphatase
IPTG	Isopropylthiogalactopyranosid
InsP	Inositolphosphat
InsP ₂	Inositolbisphosphat
InsP ₃	Inositoltrisphosphat
InsP ₄	Inosoltetrakisphosphat
InsP ₅	Inosolpentakisphosphat
InsP ₆	Inosolhexakisphosphat
InsP ₇	Inosolheptakisphosphat
KCl	Kaliumchlorid
K _M	Michaelis-Menten-Konstante

MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natriumhydroxid
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance)
OD	Optische Dichte
PAR	4-(2-Pyridyl-(2)-azo)-resorcin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP-InsP	Pyrophosphoryliertes Inositol
PP-InsP ₂	Diphosphoinositolbisphosphat
PP-InsP ₃	Diphosphoinositoltrisphosphat
PP-InsP ₄	Diphosphoinosiltetrakisphosphat
PP-InsP ₅	Diphosphoinositolpentakisphosphat
PtdInsP ₂	Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphat
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RbCl	Rubidiumchlorid
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinasen
S _{0,5}	Substratkonzentration bei halbmaximaler Aktivität des Enzyms
SEM	Scanning Electron Microscope
SDS	Sodium Dodecylsulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
STD	Sexually Transmitted Disease
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TCA	Trichloressigsäure
TvIPK-1	In dieser Arbeit charakterisierte IPK aus <i>Trichomonas vaginalis</i>
V	Volt
v _{max}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
v _{max'}	Apparente maximale Umsatzgeschwindigkeit
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
v / v	Volumen / Volumen
w / v	Gewicht / Volumen

2 Arbeitshypothese und Fragestellung

Der Inositolphosphatmetabolismus in Protozoen und die an ihm beteiligten Inositolphosphatkinasen [IPKs] und Phosphatasen [IPPs] sind im Gegensatz zur Situation bei höher entwickelten *Eukaryoten* und der *Hefe* bislang kaum erforscht. Aufgrund der vielfältigen zellulären Funktionen von Inositolphosphatkinasen bei höheren *Eukaryoten* ist eine Charakterisierung von IPKs aus den humanpathogenen Protozoen *Trichomonas vaginalis* und *Entamoeba histolytica* von großer Bedeutung. Da für tierische Inositolphosphatkinasen sehr potente Hemmstoffe gefunden werden konnten [Mayr et. al., 2005], welche sämtlich antiproliferativ wirken, sollte in dieser Arbeit geprüft werden, ob sich auch IPKs aus den Protozoen *Entamoeba histolytica* und *Trichomonas vaginalis* als Targets für eine antiinfektiöse Therapie eignen. Protozoen-IPKs könnten wegen ihrer strukturellen und funktionellen Verwandtschaft zu tierischen IPKs durchaus neue Zielproteine für einen medikamentösen Behandlungsansatz gegen entsprechende Infektionskrankheiten darstellen.

Durch die von Prof. Dr. med. Mayr durchgeführte De-novo-Assemblierung von vollständigen genomischen DNA-Contigs aus Shotgun-Konsensus-Sequenzen, verfügbar in verschiedenen Sequenzdatenbanken, konnten komplette Proteinsequenzen zahlreicher putativer Inositolphosphatkinasen aus den oben genannten Protozoen vor Fertigstellung der eigentlichen Genomsequenzierungsprojekte beider Erreger vorhergesagt werden. Die durchgeführten Homologie-Untersuchungen (siehe Kapitel 5.1) zwischen tierischen IPKs und den *Entamoeba histolytica* IPKs bzw. *Trichomonas vaginalis* IPKs konnten im Vorfeld nicht eindeutig die Substratselektivitäten der einzelnen prädierten Isoformen klären. Um der Frage nachzugehen, für welche Art von IPKs die Protozoen-cDNAs codieren (möglich waren IP3K, IPMK, IP6K oder Mischspezifitäten, abgeleitet von denjenigen tierischer IPKs) und wie diese hemmbar sind, sollte nach einer Vollsynthese codierender DNAs eine rekombinante Expression sowohl einer kleinen, aus weniger als 400 Aminosäuren bestehenden IPK aus *Entamoeba histolytica* als auch einer IPK aus *Trichomonas vaginalis* in *E. coli* durchgeführt werden. Hierbei stand die ausgewählte rekombinante *Entamoeba histolytica* IPK im Vordergrund der Betrachtungen. Es sollte neben der Untersuchung der Substratselektivität (sie kann von InsP₃-Isomeren bis hin zu InsP₆ und InsP₇ reichen) auch eine weiterführende Charakterisierung beider Enzyme mit Bestimmung der enzymologischen Parameter K_M- und v_{max}-Wert für ATP und ein Hauptsubstrat erfolgen.

Nach erfolgter Reinigung und enzymologischer Charakterisierung der Enzyme sollte im Rahmen der Arbeit ein Hemmstoffscreening für die zuvor auf Substratselektivität untersuchte IPK aus *Entamoeba histolytica* durchgeführt werden. Die Verdachtsmomente kanzerogener Nebenwirkungen für etliche Standardantibiotika gegen das Protozoon *Entamoeba histolytica* waren ein Grund für die Auswahl des Enzyms aus diesem Protozoon für ein erstes

Hemmstoffscreening, das die Basis für antimikrobielle Therapieansätze von Amöbeninfektionen liefern könnte.

3 Einleitung

3.1 Inositolphosphate als wichtige Second Messenger der intrazellulären Signaltransduktion

Die Plasmamembran einer Zelle stellt in einem Organismus eine natürliche Barriere dar. Im Laufe der Evolution haben sich Signaltransduktionswege entwickelt, die es dem Organismus ermöglichen, extrazelluläre Signale über die Plasmamembran hinweg nach intrazellulär weiterzuleiten. Hochmolekulare und zumeist stark hydrophobe Substanzen sind normalerweise nicht in der Lage, die Plasmamembran einer Zelle zu überwinden. Botenstoffe, wie bspw. Wachstumsfaktoren, binden an Rezeptoren der Plasmamembran und bewirken eine Reaktionskaskade, die die Weiterleitung eines Signals ermöglicht. Es existiert eine Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren.

Bei der intrazellulären Signaltransduktion spielt Inositol(1,4,5)trisphosphat [InsP_3] eine entscheidende Rolle. Es entsteht durch die Hydrolyse von Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphat [PtdInsP_2] am inneren Blatt der Plasmamembran durch Isoformen der Phospholipase C [PLC]. Bisher sind zwei unterschiedliche Wege der Rezeptor vermittelten Aktivierung der PLC aufgezeigt worden:

1. Aktivierung der PLC_β durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren
2. Aktivierung der PLC_γ durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen [RTK]

Beteiligte G-Proteine sind heterotrimere Proteine, die aus einer α -, β - und γ -Untereinheit bestehen [Stryer, 1999]. Das G-Protein kann in einer Guanosindiphosphat- [GDP] (inaktiv) und einer Guanosintri-phosphat- [GTP] (aktiv) gebundenen Form vorliegen. Durch die Aktivierung des proteingebundenen Rezeptors durch Liganden, die in Form von Hormonen oder Transmittern (z.B. Vasopressin oder Adrenalin) im menschlichen Körper auftreten können, kommt es am bislang inaktiven GDP-gebundenen G-Protein zu einem Austausch des GDP gegen GTP, wodurch die α -Untereinheit von der $\beta\gamma$ -Untereinheit dissoziiert. Durch die GTP-gebundene α -Untereinheit wird schließlich die Phospholipase C_β aktiviert. Die Deaktivierung des G-Proteins findet durch eine intrinsische GTPase-Aktivität statt, wodurch es zu einer Hydrolyse des GTP und zum Entstehen von GDP kommt. Als Folge wird die Aktivität der PLC_β beendet (siehe Abbildung 3-1).

Der ebenfalls in Abbildung 3-1 gezeigte Tyrosinkinaserzeptor wird bspw. durch Wachstumsfaktoren, wie den epidermalen Wachstumsfaktor [EGF], aktiviert. Durch Bindung eines Liganden findet eine Dimerisierung des Rezeptors statt. Es folgt eine Tyrosinphosphorylierung der Untereinheiten. An die nun entstandenen Phosphotyrosinreste können SH_2 -Domänen-enthaltene (Adapter-)Proteine binden. Hierdurch werden die SH_2 -Domänen tragenden Isoformen γ der PLC aktiviert.

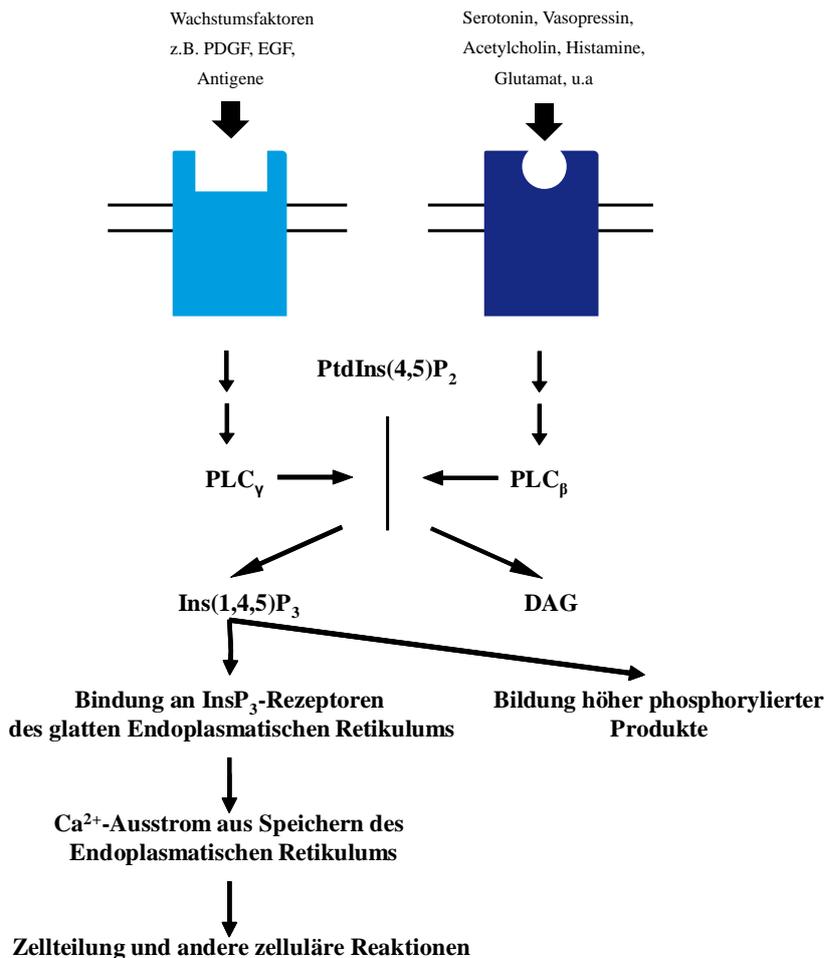


Abbildung 3-1: Aktivierung der Isoformen der PLC

Die Aktivierung der Isoformen geschieht durch Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (rechter Bildteil) oder eines Rezeptors mit intrinsischer bzw. assoziierter Tyrosinkinaseaktivität (linker Bildteil) durch exogene Stimuli mit entsprechenden dadurch ausgelösten Effekten.

Durch die Hydrolyse von PtdIns(4,5)P₂ wird Ins(1,4,5)P₃ gebildet. Bei der Aktivierung der PLC entsteht als weiteres Produkt das Sn(1,2)Diacylglycerol [DAG], das in der Plasmamembran verbleibt und die sogenannten konventionellen Isoformen α,β und γ der Proteinkinase C aktiviert. Das wasserlösliche InsP₃ diffundiert durch das Zytosol, wo es an Rezeptoren des Endoplasmatischen Retikulums [ER] bindet und hierdurch einen Ca²⁺-Ausstrom aus internen Speichern bewirkt. Durch die Entleerung der Speicher des ER kommt es zu einem Anstieg des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels bis zu Konzentrationen von über 1 μM. Durch den InsP₃ induzierten „Ca²⁺-Release“ werden unter anderem Signale vermittelt, die ausschlaggebend für Wachstums- und Zellteilungsvorgänge sind.

InsP₃ wird nach PLC-Stimulation relativ schnell metabolisiert (1-2 min). Dies erfolgt entweder durch einen Phosphatase vermittelten Abbau zu InsP₂ oder durch einen IP3K katalysierten Aufbau zu Ins(1,3,4,5)P₄. Ins(1,3,4,5)P₄ stellt das Ausgangssubstrat für die Synthese hochphosphorylierter Inosole dar und wirkt ebenfalls als Second Messenger. Vor kurzem wurde von Maréchal et al. [2007] berichtet, dass erhöhte Konzentrationen Ins(1,3,4,5)P₄ zu einer Stimulation von Ras, einem Protoonkogen, das u.a. an Wachstums und

Differenzierungsprozessen beteiligt ist, führen kann: Bei Zellen mit geringen Konzentrationen $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ bindet Ras-GAP (Ras-GTPase-activating protein) an $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, wodurch Ras inaktiviert wird. Erhöhte Konzentrationen $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ verhalten sich kompetitiv zu $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ und binden ebenfalls Ras-GAP. Dies führt zu einer Translokation von Ras-GAP ins Zytosol und schließlich zu einer Aktivierung von Ras.

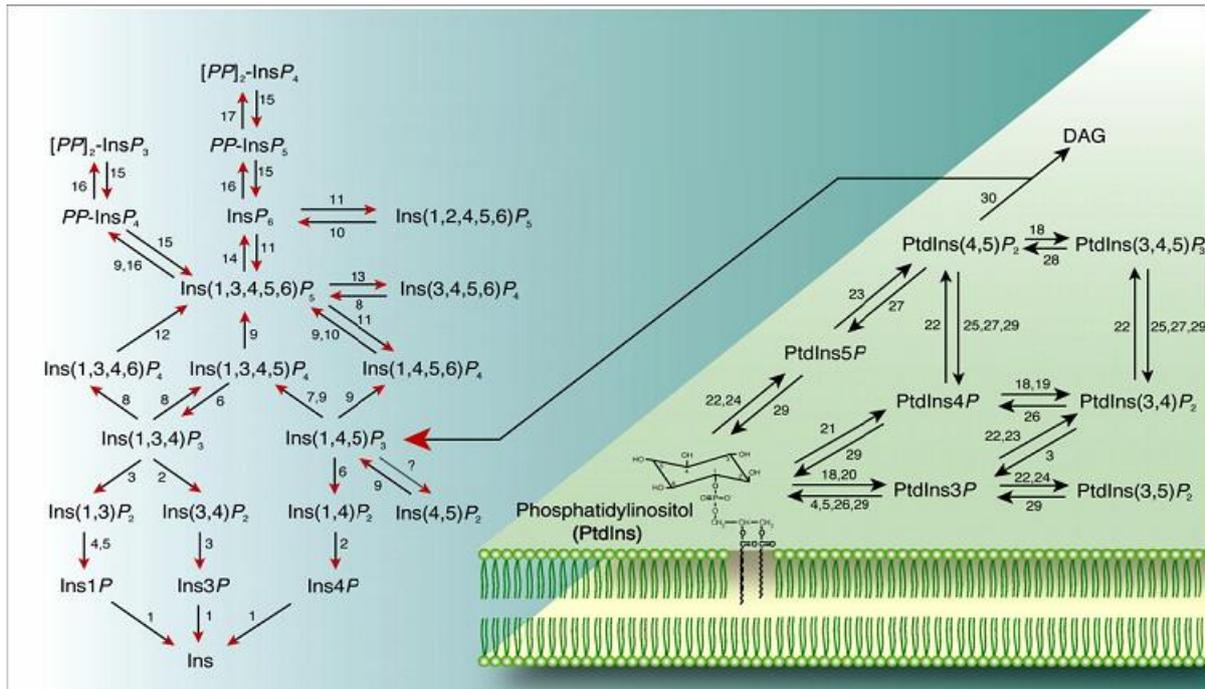


Abbildung 3-2: Stoffwechsel der Inositolphosphate und Phosphatidylinositole

Das Phosphatidylinositol ($\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$) und Derivate werden durch Kinasen und Phosphatasen ineinander umgewandelt. $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ kann durch die Phospholipase C in Diacylglycerol und $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ gespalten werden. $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ist Ausgangssubstrat für andere Inositolphosphate, die durch Kinasen und Phosphatasen entstehen. Im Falle einer vollständigen Dephosphorylierung werden die Inositolphosphate zum *myo*-Inositol abgebaut. Durch vollständige Phosphorylierung aller 6 OH-Gruppen des Inositols entsteht InsP_6 . Außerdem entstehen durch Pyrophosphorylierungen noch höher phosphorylierte Inositolphosphate wie InsP_7 und InsP_8 [Abel et al., 2001, modifiziert].

1 Inositol Monophosphatase; 2 $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2/\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ -1-Phosphatase; 3 $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3/\text{Ins}(3,4)\text{P}_2/\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ -4-Phosphatase; 4 $\text{Ins}(1,3)\text{P}_2/\text{PtdIns}3\text{P}$ -3-Phosphatase Typ I; 5 $\text{Ins}(1,3)\text{P}_2/\text{PtdIns}3\text{P}$ -3-Phosphatase Typ II; 6 $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3/\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase; 7 $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase; 8 $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3/\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -1-Kinase; 9 Inositol Polyphosphat Multikinase [IPMK]; 10 $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$ -3-Kinase; 11 Multiple Inositol Polyphosphatphosphatase; 12 $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$ -5-Kinase; 13 $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -1-Phosphatase; 14 $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase; 15 Diphosphoinositol Polyphosphat Phosphohydrolase; 16 Diphosphoinositol Polyphosphat Synthase (InsP_6 -Kinase); 17 Bis-Diphosphoinositol Polyphosphat Synthase; 18 Phosphoinositid-3-Kinase Typ I; 19 Phosphoinositid-3-Kinase Typ II; 20 Phosphoinositid-3-Kinase Typ III; 21 PtdIns -4-Kinase; 22 PtdInsP -Kinase Typ I; 23 PtdInsP -Kinase Typ II; 24 PtdInsP -Kinase Typ III; 25 $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2/\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ -5-Phosphatase; 26 PtdIns polyphosphat-3-Phosphatase; 27 SHIP; 28 PTEN; 29 Synaptojanin; 30 Phospholipase C;

Die Abbildung 3-2 gibt einen Überblick des seit 2001 bekannten sehr komplexen Phosphatidylinositol- und Inositolphosphatmetabolismus [Abel et al., 2001]. Die für die einzelnen Reaktionen verantwortlichen Enzyme sind in Abbildung 3-2 angegeben. Es konnte mittlerweile fast jeder der beobachteten Phosphorylierungsreaktionen eine Enzymaktivität zugeordnet werden.

3.2 Die Inositolphosphatkinasen der PDKG-Familie mit besonderer Betrachtung der Inositolphosphatmultikinase [IPMK] und Inositolhexakisphosphatkinase [IP6K] bei höher entwickelten Eukaryoten

3.2.1 Die Funktion der Inositolphosphatmultikinase [IPMK]

Die Inositolphosphatmultikinase phosphoryliert InsP_3 zu InsP_4 und bestimmte InsP_4 -Isomere zu InsP_5 . Sie ist weit verbreitet und kann bei einer Vielzahl von Organismen (*Hefe*, Pflanzen, Tiere) nachgewiesen und isoliert werden. Die IPMK ist innerhalb des Kerns lokalisiert und gehört ebenso wie die Inositolhexakisphosphatkinase und die Inositolphosphat-3-Kinase zur PDKG-Familie (siehe auch Kapitel 5.1.1). Neben dem PDKG-Motiv existieren auch weitere Consensus-Motive, auf die in Kapitel 5.1 eingegangen wird. Nalaskowski und Mayr [2004] und Shears [2004] nach zu urteilen, ist die IPMK phylogenetisch betrachtet die älteste Inositolphosphatkinase der PDKG-Familie.

Die IPMK besitzt, wie der Name schon sagt, Multikinaseaktivität und ist wie die Inositolphosphat-3-Kinasen in der Lage, InsP_3 an der Hydroxylgruppe 3 zu phosphorylieren. Außerdem katalysiert die IPMK die Phosphorylierung von InsP_3 am Kohlenstoffatom 6 ([Saiardi et al., 2000a], [Odom et al., 2000]). Hierdurch wird ersichtlich, dass die IPMK eine geringere Substratselektivität besitzt als die erwähnte Inositolphosphat-3-Kinase. Es wurde außerdem beschrieben, dass die IPMK auch an anderen enzymatischen Reaktionen beteiligt ist, bei denen neben $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ und $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ auch in einem weiteren Phosphorylierungsschritt $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ aus den genannten InsP_4 -Isomeren hervorgehen kann (siehe Abbildung 3-3).

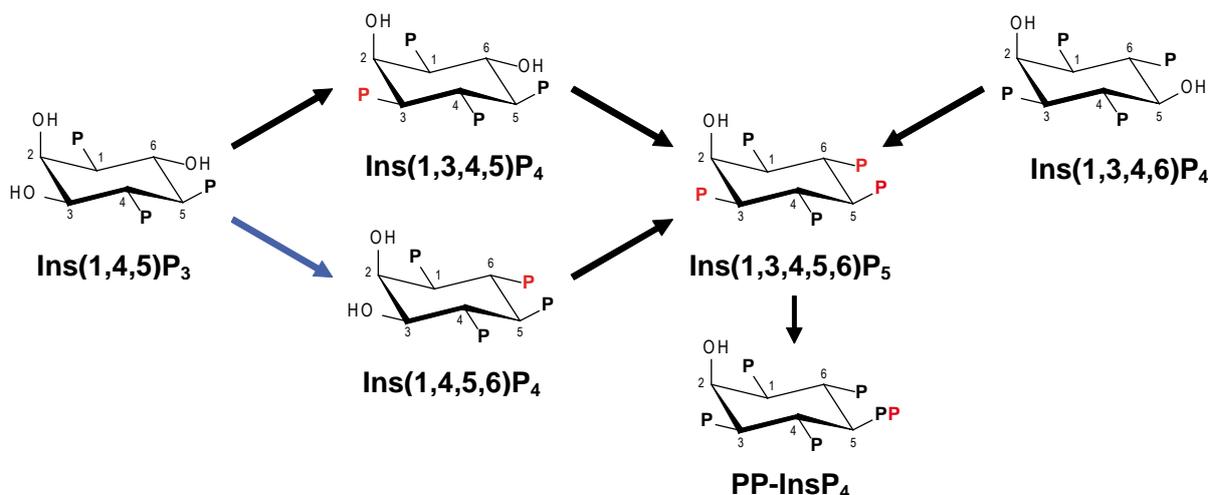


Abbildung 3-3: Bisher beschriebene durch die IPMK katalysierte Phosphorylierungsreaktionen von Inositolphosphaten

Schwarze Pfeile: Umsetzung sowohl für die IPMK aus *Saccharomyces cerevisiae* (ArgR III) als auch für die IPMK aus *Rattus norvegicus* gezeigt; Blauer Pfeil: Umsetzung bisher nur für ArgR III bewiesen [Deschermeier, 2005 modifiziert].

Neben der Katalyse von $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$ zu $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ [Chang et al., 2002] kann sie auch entstandenes InsP_5 zu einem PP- InsP_4 -Isomer pyrophosphorylieren ([Zhang et al., 2001], [Saiardi et al., 2001a], [Nalaskowski et al., 2002]).

3.2.2 Die Funktion der Inositolhexakisphosphatkinasen [IP6K]

Durch die IPMK gebildetes $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ wird durch die IP52K zu InsP_6 phosphoryliert. InsP_6 besitzt in der Regel in Zellen die höchste Konzentration aller Inositolphosphate (Konzentration von ca. 10 - 50 μM) und kann durch die IP6K weiter zu Phospho-Inositol-Pyrophosphaten metabolisiert werden. Die Inositolhexakisphosphatkinase, wie sie bei *Eukaryoten* vorkommt, führt bei InsP_6 , das schon an allen Kohlenstoffatomen in phosphorylierter Form vorliegt, zu einer Pyrophosphorylierung, indem eine zweite β -Phosphatgruppe von ATP auf eine vorhandene Phosphatgruppe des Inositolrings übertragen wird. Dadurch entsteht eine Säureanhydridbindung zwischen den beiden Phosphatgruppen. Hierbei entsteht aus InsP_6 ein „energiereiches“ PP- InsP_5 -Isomer (Diphospho-inositolpentakisphosphat) bzw. InsP_7 .

Auch die IP6K gehört zur Familie der PDKG-Kinasen. Bisher konnten drei *humane* Isoformen der Inositolhexakisphosphatkinase identifiziert werden ([Saiardi et al., 1999], [Saiardi et al., 2000b], [Saiardi et al., 2001b]). Es handelt sich um die HsIP6K-1, HsIP6K-2 und um die HsIP6K-3.

Saiardi et al. [1999] zeigten, dass alle Isoformen des Enzyms im Gehirn der *Ratte* vorkommen. Darüber hinaus wurde beschrieben, dass die IP6K-1 und IP6K-2 auch in der Lunge, Leber, Milz, Nieren, Hoden und im Herzen exprimiert werden. Die Isoformen sind innerhalb der Zelle unterschiedlich lokalisiert. Die IP6K-2 tritt nur im Kern auf, die Isoform 3 kommt größtenteils im Zytoplasma vor. Die Isoform 1 weist eine nahezu gleichmäßige Verteilung innerhalb der Zelle auf [Saiardi et al., 2001b].

Wie Nagata et al. [2005] zeigen konnten, ist Zytotoxizität mit einer Translokation der IP6K-2 vom Kern in die Mitochondrien assoziiert. Die Autoren beschrieben, dass entstehendes InsP_7 die Zellapoptose durch bisher noch nicht geklärte Mechanismen induziert und die IP6K-2 eine entscheidende Rolle beim Ablauf apoptotischer Prozesse spielt. Nagata et al. [2005] vermuteten den Zusammenhang in einem kompetitiven Verhalten zwischen InsP_7 und $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ in Bezug auf Bindung von PH-Domänen und Phosphorylierung von Proteinen. Hierdurch scheint es möglich zu sein, dass „survival factors“ an Quantität verlieren und den apoptotischen Prozess in Gang setzen. Morrison et al. [2001] und Morrison et al. [2002] konnten zeigen, dass die IP6K-2-Isoform für die Apoptose, die Interferon- β induziert ist, bedeutend ist. Die IP6K besitzt neben der enzymatischen auch eine nicht enzymatische Aktivität: Morrison et al. [2007] wiesen nach, dass die IP6K-2 mit TRAF-2

(tumour-necrosis-factor-receptor-associated factor-2) interagiert. Dadurch findet eine Attenuierung des durch NF-κB (nuclear factor κB) induzierten Signalweges statt.

3.3 Die humanpathogenen Protozoen *Entamoeba histolytica* und *Trichomonas vaginalis*

3.3.1 Aufbau und Vorkommen von *Entamoeba histolytica*

Entamoeba histolytica gehört zu den humanpathogenen Protozoen und ist der eukaryotischen Gruppe der *Amoebozoa* zuzuordnen. Die Protozoen sind der Ordnung der *Entamoebida* zugehörig und in die Familie der *Entamoebidae* eingruppiert. Das Genom von *Entamoeba histolytica* enthält, wie bspw. das Genom von Plasmodien auch, einen sehr hohen Anteil an Adenin / Thymin (ca. 78%). Die Fortbewegung der Protozoen erfolgt durch ungleichmäßige Ausstülpungen des Cytoplasmas (Pseudopodien und Lamellipodien). Das Protoplasma von *Entamoeba histolytica* besteht aus einem Ektoplasma (äußere Schicht des Zellplasmas) und einem Endoplasma (innerer Plasmaanteil der Zelle).

Amöben zeichnen sich durch ausgeprägte phagozytotische Aktivität aus. Insbesondere *Entamoeba histolytica* ernährt sich durch Phagozytose und Pinozytose von Darminhalt. Der Großteil der Amöben ernährt sich von phagozytierten Bakterien. Mit Hilfe der Pseudopodien werden Bakterien vom Cytoplasma umschlossen, phagozytiert und schließlich nach Internalisierung abgetötet und in Nahrungsvakuolen verdaut. *Entamoeba histolytica* verhindert hierbei effizient eine Proliferation und Ausbreitung der Bakterien im eigenen Organismus.

Das Cytoplasma ist angefüllt mit Vakuolen und Vesikeln unterschiedlichster Größe. Ungefähr 40 % des Zellvolumens besteht aus Vesikeln, die eine Funktion aufweisen, die der von cytotoxischen Vesikeln und Lysosomen in *Eukaryoten* sehr ähnlich ist [Scholze und Tannich, 1994]. Es wurde aufgrund von durchgeführten Elektronenmikroskopieaufnahmen postuliert, dass in *Entamoeba histolytica* der Golgiapparat und Mitochondrien fehlen würden [Henley et al., 1976]. Chavez-Munguia et al. [2000] beschrieben später bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen Organellen, die strukturell einem Golgiapparat am nächsten kamen. Ebenfalls war es möglich, ein glattes Endoplasmatisches Retikulum zu identifizieren.

Andere elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass intrazellulär keinerlei Mitochondrien vorhanden sind [Bakker-Grunwald und Wöstmann, 1993]. Spätere Untersuchungen des Genoms ergaben jedoch, dass eindeutig zwei Gene des *Entamoeba histolytica*-Genoms für mitochondriale Proteine codieren. Über Immunfärbungen konnten Organellen ausgemacht werden, die mitochondrialen Ursprungs waren ([Tovar et al., 1999], [Bakatselou et al., 2003]). Diese wurden als Mitosom bzw. Crypton bezeichnet [Mai et al., 1999]. Es wird angenommen, dass bei der Evolution vorhandene Mitochondrien zu

Mitosen reduziert wurden [Leon-Avila und Tovar, 2004]. Clark und Roger [1995] konnten durch Genanalysen zeigen, dass es bei *Entamoeba histolytica* zu einem sekundären Verlust mitochondrialer Funktionen gekommen sein muss. Abbildung 3-4 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme von *Entamoeba histolytica*.

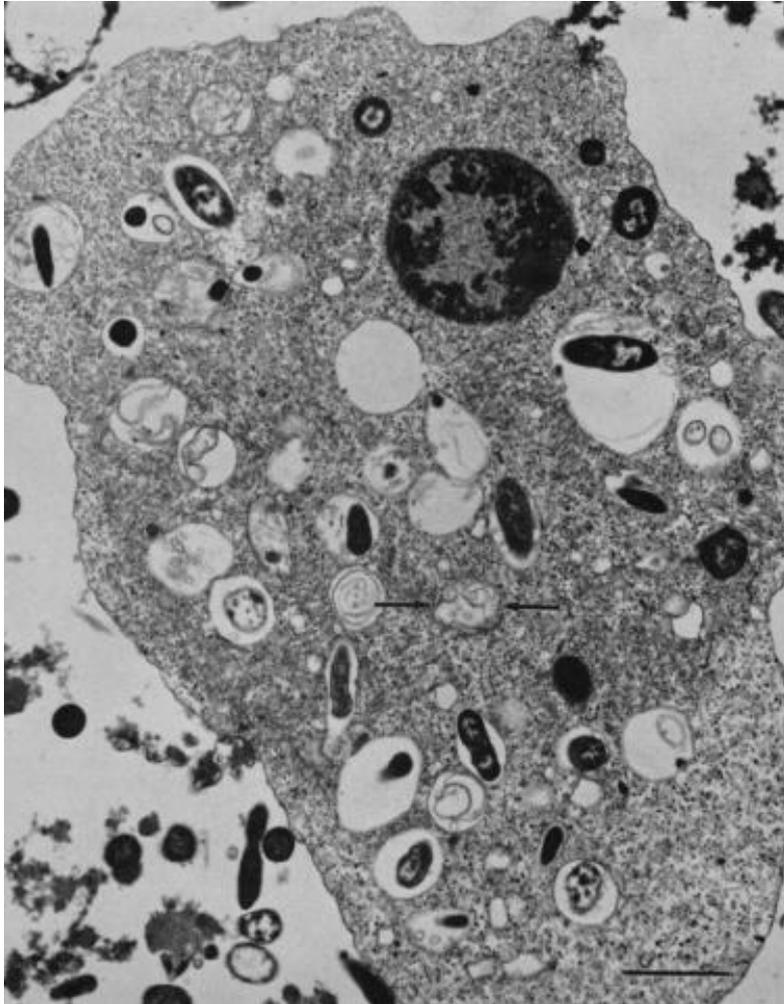


Abbildung 3-4: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Entamoeba histolytica*

In der Aufnahme sind mehrere Vakuolen zu sehen, die bakterielle Fragmente und membranöse Residuen enthalten. Durch die beiden Pfeile ist eine Vakuole mit autophagischer Aktivität hervorgehoben [Rosenbaum und Wittner, 1970].

Die Protozoen besiedeln in der Regel asymptomatisch den Darm, können jedoch auch zur Amöbenruhr bzw. Amoebiasis (Darm- und Leberamoebiasis) unter bisher ungeklärten Umständen führen. Es handelt sich hierbei um eine lebensbedrohliche Infektionskrankheit [Stauffer und Ravdin, 2003], auf die in Kapitel 3.3.2 näher eingegangen wird. Als Pathogenitätsfaktoren von *Entamoeba histolytica* sind Galaktose / N-Acetyl-D-Galaktosamin (Gal / GalNAc)-spezifisches Lektin, das verantwortlich für die Anheftung an Epithelzellen ist [Petri et al., 2002] bzw. Adhärenzlektin ([Tannich et al., 1991], [Tannich et al., 1992]), die sezernierten Cystein-Peptidasen, die die extrazellulären Matrixproteine des Dickdarms abbauen können ([Bruchhaus et al., 2003], [Que und Reed, 1997]), und eine Familie porenformender Peptide, die unter dem Terminus „Amoebapores“ zusammengefasst wird

und in der Lage ist, Zellen zu lysieren ([Young et al., 1982], [Leippe, et al., 1991], [Leippe, 1997]), bekannt.

Villalba et al. [2007] konnten einen „programmierten Zelltod“ (PCD) nachweisen, der durch das Aminoglycosid-Antibiotikum G418 ausgelöst wird. Hierbei kam es zu den üblichen morphologischen Erscheinungen wie bspw. Zellschrumpfung, nukleäre Kondensation und DNA-Fragmentation. Außerdem konnte eine Verminderung des intrazellulären Kaliums, ein Anstieg der Calcium-Konzentration und ein Absinken des pH-Werts nachgewiesen werden.

Entamoeba histolytica ist weltweit verbreitet. Vor allem im tropischen und subtropischen Raum werden häufig Infektionen beobachtet, da die infektiösen Zysten hier in der Lage sind, aufgrund der hohen Feuchtigkeit in einem Zeitraum von einigen Tagen bis hin zu Monaten außerhalb des Wirtsorganismus zu überleben und infektiös zu bleiben.

Betrachtet man den Lebenszyklus von *Entamoeba histolytica*, werden zum einen die beweglichen Trophozoiten (vegetatives Stadium; Größe zwischen 20 – 40 µm) und die meist vierkernigen Zysten (Größe: 10 – 16 µm), die infektiös sind, unterschieden (siehe auch Abbildung 3-5, Abbildung 3-6 und Abbildung 3-7).

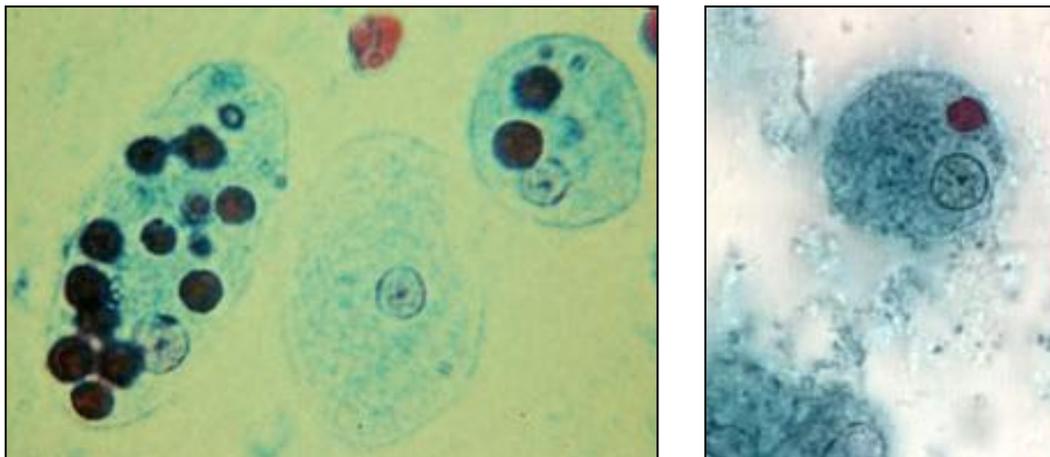


Abbildung 3-5: Mikroskopische Aufnahmen des vegetativen Stadiums (Trophozoiten) von *Entamoeba histolytica* mit teils verdauten Erythrozyten

Erythrophagocytose ist ein Charakteristikum von *Entamoeba histolytica*, das den humanpathogenen Typ von der nicht pathogenen *Entamoeba dispar* abgrenzt [CDC, Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern, www.dpd.cdc.gov/DPDx].

1903 wurde Fritz Schaudinns Namensgebung für die Protozoen vermutlich durch die Fähigkeit von *Entamoeba histolytica*, mit hoher Effizienz Zellen zu zerstören und Zellverbände aufzulösen [Pinilla et al., 2008], beeinflusst. Es wurde lange Zeit darüber spekuliert, ob eine klinisch inapparente, nicht infektiöse Gattung, neben einer infektiösen Art existieren könnte. Diamond und Clark [1993] unterschieden zwei Arten: Die nicht infektiöse *Entamoeba dispar* und den schon bekannten Erreger *Entamoeba histolytica*. Im Gegensatz zur morphologisch gleichen und infektiösen Variante, ist *Entamoeba dispar* nicht in der Lage, die Amöbenruhr auszulösen und besiedelt den Darm ausschließlich asymptomatisch. Bhattacharya et al. [2000] bewiesen ein Fehlen von „lipophosphoglycan-like glycoconjugates“ in *Entamoeba dispar*, die im Gegensatz dazu bei *Entamoeba histolytica*

vorkommen. Aufgrund von morphologischen, genomischen und immunologischen Unterschieden (ELISA) wird *Entamoeba dispar* heute von *Entamoeba histolytica* abgegrenzt [Clark, 2000]. Auch aufgrund molekularbiologischer Untersuchungen, durchgeführt von Tannich [1998] und Tachibana et al. [1991], fand eine Unterscheidung zwischen *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* statt.

3.3.2 *Entamoeba histolytica* als Erreger der Amoebiasis

Es existieren neben *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* auch weitere Amöbenarten, die den Menschen als Wirt nutzen. U. a. sind dies *Entamoeba hartmanni* und *Jodamoeba bütschlii*. *Entamoeba histolytica* ist jedoch der einzige fakultativ pathogene Vertreter. Bei der Amoebiasis handelt es sich um eine schwerwiegende Infektionskrankheit, die auch noch in der heutigen Zeit als dritthäufigste parasitische Todesursache, nach Malaria und der Schistosomiasis, weltweit zwischen 50.000 und 100.000 Opfer pro Jahr fordert ([Petri und Singh, 1999], [Clark, 2000], [Haque et al., 2001]). Der einzige wichtige Wirt scheint der Mensch zu sein. Eine ähnliche Erkrankung existiert jedoch auch bei *Eidechsen* und *Schlangen*, die von *Entamoeba invadens* hervorgerufen wird. In Industrieländern sind eine Infektion und ein letaler Ausgang eher selten. In Entwicklungsländern ist durch die schlechte medizinische Grundversorgung, die mangelnde Hygiene sowie durch Mangelernährung und dadurch bedingter Schwächung des Organismus eine Infektion der dort lebenden Menschen viel häufiger.

Die Aufnahme der infektiösen, säureresistenten Zysten geschieht über einen fäkal-oralen Übertragungsmechanismus: Durch verunreinigte Nahrung oder Trinkwasser wandern die infektiösen Zysten durch den Gastrointestinaltrakt. Nachdem sie die Säurebarriere des Magens überwunden haben, gelangen sie in den Darm, wo sie sich von Enterobakterien ernähren und klinisch inapparent bleiben. Innerhalb des Darms werden die beweglichen Trophozoiten ins Darmlumen freigesetzt. Die Träger von *Entamoeba histolytica* sind in der Regel auch gleichzeitig Ausscheider. Nachdem sich die ins Darmlumen abgegebenen Trophozoiten zu Zysten entwickelt haben (Enzystierung), werden sie ausgeschieden (siehe auch Abbildung 3-6 und Abbildung 3-7). Durch eine Invasion der Darmmucosa durch Trophozoiten findet eine Einwanderung der Trophozoiten vom Darmlumen in die Darmwand mit Ausbildung von Darmgeschwüren statt. Die Trophozoiten (Magna-Formen), die verantwortlich für die Penetration sind, unterscheiden sich von den nicht aggressiven Minuta-Formen. Die Magna-Formen zeichnen sich dadurch aus, dass sie Erythrozyten phagozytieren können, was bei den Minuta-Formen nicht festzustellen ist. Bei der Phagozytose scheint ein Membran-Protein (PATMK), das an der Trophozoiten-Oberfläche exprimiert wird, eine essentielle Rolle zu spielen [Boettner et al., 2008]. Es kommt zu

wässrig, blutig tingiertem Stuhl, begleitet von einer Kolitis und abdominalen Schmerzen [Salles et al., 2007].

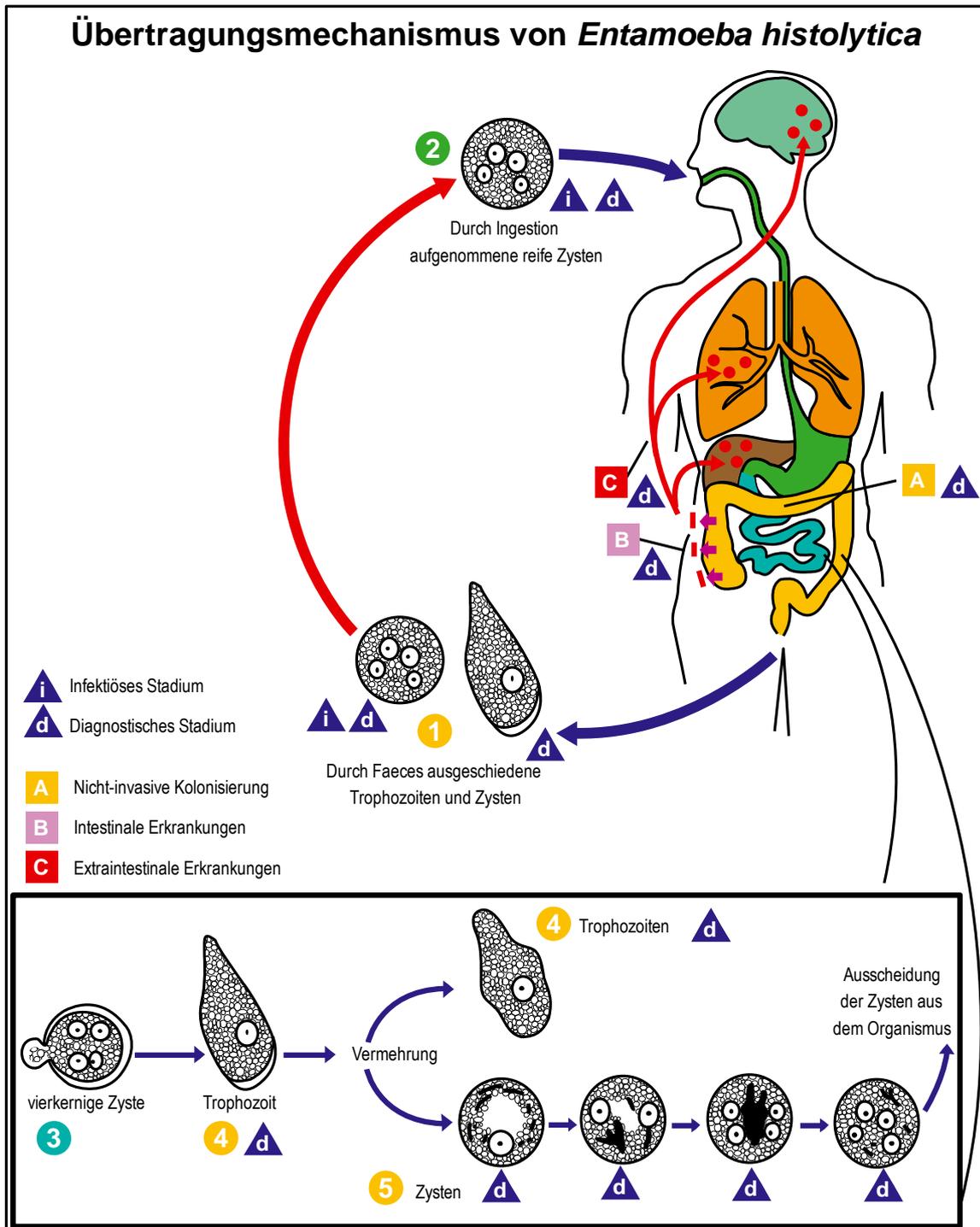


Abbildung 3-6: Lebenszyklus und Übertragungsmechanismus von *Entamoeba histolytica* [CDC, Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern, www.dpd.cdc.gov/DPDx, modifiziert]

Durch Einbrechen von Trophozoiten in das Blutgefäßsystem kann es zu einer hämatogenen Invasion der Leber kommen, die durch Einschmelzung von Gewebe begleitet sein und einen Leberabszess zur Folge haben kann. Dies stellt eine schwerwiegende Komplikation dar. Symptomatisch äußert sich dieser Prozess mit unspezifischen Symptomen in Form von

Fieber und Schmerzen im rechten Oberbauch. Andere extraintestinale Manifestationen können sich ebenfalls hämatogen entwickeln.

Trophozoiten, die ins Gefäßsystem eingebrochen sind, sind nicht mehr in der Lage, sich in den Geweben zu enzystieren. Die Enzystierung kann ausschließlich im Darm erfolgen. Somit stehen diese Trophozoiten der Vermehrung des Organismus nicht mehr zur Verfügung. Auch die von Durchfällen hervorgerufene Ausscheidung von nicht enzystierten Trophozoiten ist für *Entamoeba histolytica*, bezogen auf den Vermehrungszyklus, von Nachteil, da die infektiösen Zysten nur noch zu einem wesentlich geringeren Prozentsatz ausgeschieden werden.



Abbildung 3-7: Mikroskopische Aufnahme einer Zyste von *Entamoeba histolytica* [San Francisco Department of Public Health, <http://www.sfcddcp.org>]

Die Diagnostik bei Verdacht auf eine *Entamoeba histolytica*-Infektion geschieht durch eine Stuhlprobe, in der die ausgeschiedenen Zysten mikroskopisch identifiziert werden können [Köhler et al., 2001]. Bei der invasiven Form der Erkrankung kommt es in der Regel zu einer Immunantwort des *menschlichen* Körpers, wodurch die gebildeten Antikörper mittels Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), indirekter Immunfluoreszenz oder einer Komplementbindungsreaktion nachgewiesen werden können. Ohne Leberbeteiligung kann es jedoch vorkommen, dass serologische Reaktionen nicht sensitiv genug sind und Erkrankte nicht immer erkannt werden. Zur Therapie werden 5-Nitroimidazole als Mittel der Wahl eingesetzt. Vertreter sind Metronidazol, Tinidazol, Ornidazol oder Nimorazol. Leitsch et al. [2007] konnten zeigen, dass eine Interaktion zwischen Nitroimidazolen und der Thioredoxin-Reduktase in *Entamoeba histolytica* eine zentrale Rolle spielt. Mittlerweile vermutet man, dass einige dieser Medikamente ein kanzerogenes Potential besitzen, wobei dies bei einer vorübergehenden Infektion im Gegensatz zu einer Dauereinnahme wohl eine eher untergeordnete Rolle spielen dürfte.

Es erscheinen gehäuft Berichte über Resistenzen von *Entamoeba histolytica*, weswegen neue Therapeutika erprobt werden ([Bansal et al., 2006a], [Bansal et al., 2006b]). Neben der

Erprobung einer Vakzine [Stanley, 2006] unternahmen Torres-Gómez et al. [2008] *in vitro*-Versuche mit Benzimidazolen und Pentamidinen. Es konnte gezeigt werden, dass einige Analoga eine hohe Bioaktivität bereits im μM -Bereich aufwiesen und potentielle Therapeutika darstellen.

3.3.3 Aufbau und Vorkommen von *Trichomonas vaginalis*

Der Flagellat *Trichomonas vaginalis* wird dem Stamm der *Axostylata* zugeordnet. Der Parasit gehört der Klasse der *Parabasalida* an und wird in die Familie der *Trichomonadidae* eingeordnet. Neben dem pathogenen Vertreter *Trichomonas vaginalis* existieren auch andere apathogene Vertreter der Gattung *Trichomonas* wie bspw. *Trichomonas hominis* und *Trichomonas faecalis* beim Menschen. Diese Einzeller besitzen Geißeln und sind spitzoval geformt. Ihre Größe beträgt zwischen 10 - 24 μm . Sie verfügen über einen Achsenstab, der über den hinteren Zellpol hinausragt. Im vorderen Teil der Zelle liegt neben Parasasalfilamenten sowie Basalkörnern, von denen die fünf Geißeln ausgehen, auch der Zellkern. Von den fünf Geißeln sind vier nach vorne, eine nach hinten gerichtet (Abbildung 3-8). Die *Trichomonaden* verfügen über Promitochondrien, die sich bei aeroben Bedingungen zu Mitochondrien ausbilden können [Koprla, 1978]. Bei anaeroben Kulturbedingungen bilden sich die Mitochondrien wieder zurück.

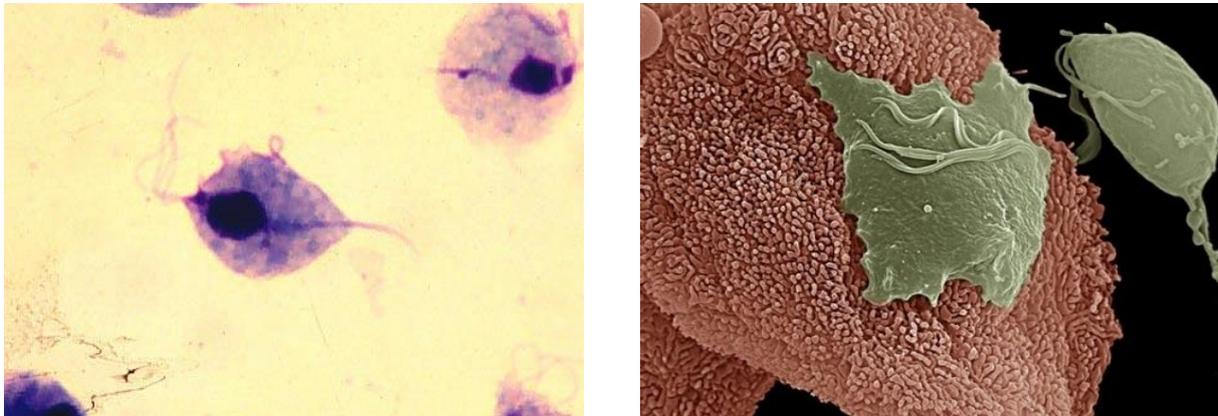


Abbildung 3-8: Morphologie von *Trichomonas vaginalis*

Linke Seite: mikroskopische Aufnahme von Trophozoiten (*Trichomonas vaginalis*) [J.D. MacLean, McGill Centre for Tropical Disease]; Rechte Seite: SEM-Aufnahme zweier *Trichomonas vaginalis* Parasiten (grün), die sich an vaginale Epithelzellen (pink) anheften [Antonio Pereira-Neves und Marlene Benchimol, Santa Ursula Universität, Rio de Janeiro, Brasilien].

3.3.4 Durch *Trichomonas vaginalis* ausgelöste Erkrankungen

Donné entdeckte *Trichomonas vaginalis* 1836 beim Menschen. *Trichomonas vaginalis* besiedelt die Schleimhäute und Drüsen des Urogenitaltraktes bei Mann und Frau [Köhler et al., 2001]. Sie lösen meist urogenitale Erkrankungen bei der Frau aus. Männer fungieren meist als asymptomatische Träger bzw. Überträger. Auf die männliche Fertilität scheint die Infektion keine oder nur geringe Auswirkungen zu haben [Ochsendorf, 2008]. Die

Übertragung erfolgt in der Regel durch Schleimhautkontakt beim Geschlechtsverkehr (siehe auch Abbildung 3-9). Insbesondere Promiskuität ist ein Risikofaktor [Verteramo et al., 2008].

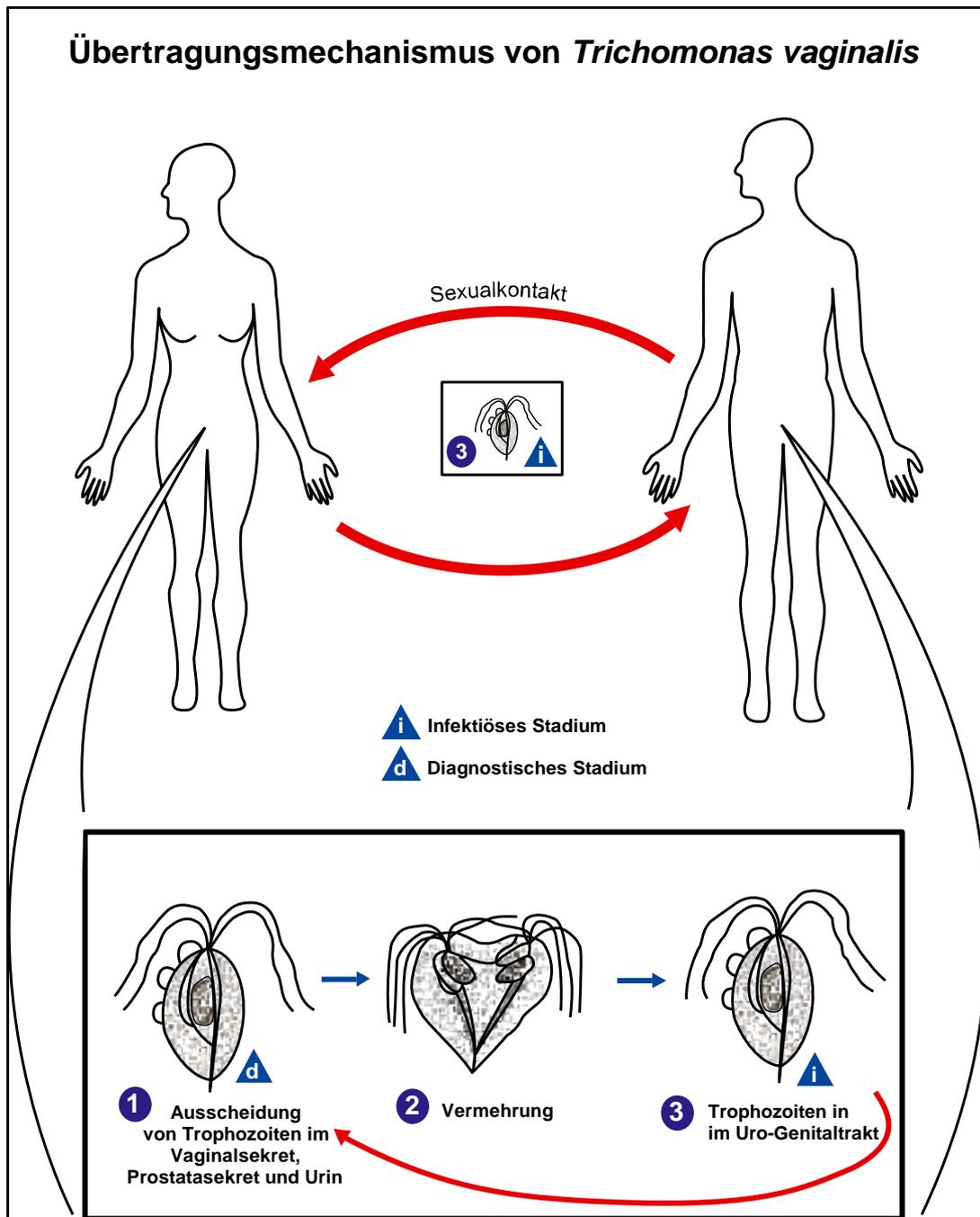


Abbildung 3-9: Übertragung und Vermehrung von *Trichomonas vaginalis* durch sexuellen Verkehr [CDC, Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern, www.dpd.cdc.gov/DPDx, modifiziert]

Badewäsche, feuchte Toilettensitze oder Schwimmbäder werden als mögliche Infektionsquelle diskutiert [Pereira-Neves und Benchimol, 2008]. Dies ist bisher jedoch nicht bewiesen und gilt aufgrund der sehr empfindlichen *Trichomonaden* als eher unwahrscheinlich. *Trichomonaden* treten bei Frauen im gebärfähigen Alter in 8 – 12 % aller Fälle auf. Bei Frauen mit entzündlichen Erkrankungen im Bereich des Urogenitaltraktes werden in bis zu 30 % aller Fälle *Trichomonaden* nachgewiesen [Köhler et al, 2001]. Die

Inzidenz dieser „Sexually Transmitted Disease“ [STD] liegt bei über 170 Millionen Fällen pro Jahr [Garber, 2005].

Der Trophozoit ruft eine geringgradige Entzündung durch Mechanismen hervor, die im Einzelnen bisher noch nicht vollends verstanden sind. Bisher ist noch nicht geklärt, ob *Trichomonas vaginalis* allein vorkommend für Erkrankungen wie Kolpitis, Ballanitis, Urethritis oder Prostatitis verantwortlich sein kann. Es wird diskutiert, ob in einem Großteil der Fälle nicht auch bakterielle Infektionen kausal sind. Eine bewiesene Infektion sollte jedoch immer medikamentös behandelt werden, auch wenn die Symptomatik kaum oder gar nicht ausgeprägt ist. Dies ist bei knapp einem Drittel der Träger der Fall. Bei Behandlung der Krankheit ist vor allem auch an die Behandlung des Partners zu denken („Ping-Pong-Effekt“). Eine Infektion mit *Trichomonas vaginalis* führt bei der Frau häufig zu einer Kolpitis, die mit übel riechendem weißlich-grünlichem Ausfluss begleitet wird. Es können zusätzlich auch Juckreiz und Schmerzen auftreten. Außerdem können kleinere hämorrhagische Läsionen vorhanden sein. In einem geringen Teil kann es auch beim Mann zu einer Klinik kommen: Der Urin besitzt dann ein glasiges Aussehen. Mittlerweile existieren Hinweise darauf, dass nach einer stattgefundenen Infektion mit *Trichomonas vaginalis* ein erhöhtes Risiko für ein später auftretendes Prostata-Carcinom besteht [Sutcliffe et al., 2006].

Diagnostisch findet die direkte Mikroskopie (auch Phasenkontrast) Anwendung. Als Probe kann hier neben Fluor auch Urethrasekret dienen. Auch die Kultur von *Trichomonaden* in Spezialmedien ist möglich. Als Mittel der ersten Wahl finden bei der Behandlung von Patienten 5-Nitroimidazole Anwendung.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Apparative Ausrüstung

Analysenwaage BP 221S	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Autoklav 5075 ELV	Systemec (Wettenberg, Deutschland)
Brutschrank für Bakterienkultur	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Duran Glasgeräte	Schott (Mainz, Deutschland)
Econo Column	Biorad (Philadelphia, USA)
Feinwaage PM 480 Delta range	Mettler (Giessen, Deutschland)
Gelkammer für Elektrophorese	Eurofins MWG (Ebersberg, Deutschland)
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Magnetrührer KMO 2 basic	IKA Labortechnik (Staufen, Deutschland)
Mischer Vortex Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
Monitor	Panasonic (Hamburg, Deutschland)
PCR-Maschine: Mastercycler Gradient / personal	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Netzgerät Gene Power Supply GPS 200 / 400	Pharmacia (Ratingen, Deutschland)
pH-Meter pH 526	WTW (Weilheim, Deutschland)
pH-Elektroden SenTix mic und Sentix 41	WTW (Weilheim, Deutschland)
Photometer BioPhotometer	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipette, Model Reference, 1 - 10 µl	Eppendorf (s.o.)
Pipette, Model Reference, 10 - 100 µl	Eppendorf (s.o.)
Pipette, Model Reference, 100 - 1000 µl	Eppendorf (s.o.)
Schüttelinkubator Serie 25	New Brunswick, Scientific Co., Inc. (New Jersey, USA)
Sterile Werkbank Typ HB2448 K	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Tischzentrifuge Biofuge pico und Biofuge fresco	Heraeus (s.o.)
Ultraschallhomogenisator Sonopuls GM 70	Bandelin Electronic (Berlin, Deutschland)
UV-Tisch (312 nm)	Bachofer (Reutlingen, Deutschland)
VarioCam	Phase (Lübeck, Deutschland)
Videoprinter UP-890 CE	Sony (Berlin, Deutschland)
Wasserbad	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Zentrifuge Sorvall Superspeed RC-2Bq	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)

4.1.2 Software

Bioedit	Ibis Biosciences (Carlsbad, Kanada)
Microsoft Office	Microsoft (Unterschleißheim, Deutschland)
Pymol	DeLano Scientific LLC, (Palo Alto, USA)
Sigma Plot	Systat Software (Erkrath, Deutschland)

4.1.3 Verbrauchsmaterialien

Filter Minisart RC 4	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Injektionskanüle	Braun (Kroneberg, Deutschland)
Küvetten, Halb-Mikro, Polystyrol	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nürnberg, Deutschland)
Reaktionsgefäße, Volumen 0,2 ml	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäße, Volumen 1,5 ml	Eppendorf (s.o.)
Reaktionsgefäße, Volumen 2,0 ml	Eppendorf (s.o.)
pH-Papier	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Parafim "M"	American National Can (Chicago, USA)
Petrischalen	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Pipetten (steril, 1, 2, 5, 10 und 25 ml)	Beckton (Heidelberg, Deutschland)
Spritze 1 ml	Braun (Kroneberg, Deutschland)
Spritze 2 ml	Braun (s.o.)
Uvette 50 µl – 2000 µl	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

4.1.4 Chemikalien

Acrylamid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Adenosin-5'-triphosphat [ATP]	Roche (Mannheim, Deutschland)
LE Agarose	Cambrex Bio Science (Maine, USA)
Ammoniumpersulfat [APS]	Serva (Hamburg, Deutschland)
Anhydrotetrazyklin [AHT]	Serva (s.o.)
Aurintricarbonsäure [ATA]	Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland)
Bacto-Trypton	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Bacto-Agar	Becton Dickinson (s.o.)
Bengalrosa	Fluka (Hamburg, Deutschland)
Benzamidinhydrochlorid	Fluka (s.o.)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Coomassie brilliant blue G 250	Serva (Heidelberg, Deutschland)

Desoxyribonukleosidtriphosphate [dNTPs]	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
(1,4)-Dithiothreitol [DTT]	Biomol (Hamburg, Deutschland)
Dodecylsulfat Natriumsalz [SDS]	Serva (Heidelberg, Deutschland)
DowexR 1 x 8	Serva (s.o.)
Chlorogensäure	Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland)
Essigsäure (Eisessig) 100 %	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol	Apotheke UKE (Hamburg Deutschland)
Ethidiumbromid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure [EDTA]	Merck (s.o.)
Ficoll 400	Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland)
D(+)-Glucose	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Glycerol 87 %	Merck (s.o.)
Glycin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Gossypol	Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland)
Hefeextrakt	Oxoid (Hampshire, England)
HEPES	Biomol (Hamburg, Deutschland)
Isopropylthiogalactopyranosid [IPTG]	Diagnostic Chemicals (Charlottetown, Kanada)
Kaliumchlorid [KCl]	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck (s.o.)
2-Mercaptoethanol	Merck (s.o.)
3-Morpholinopropansulfonsäure [MOPS]	Merck (s.o.)
Methanol	Merck (s.o.)
Methylenblau	Calbiochem (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid [NaCl]	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumfluorid [NaF]	Merck (s.o.)
Natriumhydroxid [NaOH]	Merck (s.o.)
Phenylmethylsulfonylfluorid [PMSF]	Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland)
2-Propanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Quercetin	Fluka (Hamburg, Deutschland)
Rubidiumchlorid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Robinetin	Roth (s.o.)
RotiphoreseR Gel 30	Roth (s.o.)
Rottlerin	Calbiochem (Darmstadt, Deutschland)
Salzsäure (HCl) 30 % suprapur	Merck (Darmstadt, Deutschland)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin [TEMED]	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Trichloressigsäure [TCA]	Merck (Darmstadt, Deutschland)

Tris	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Triton X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol)	Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland)

4.1.5 Inositolphosphate

D-myo-Ins(1,4,5)P ₃	Alexis Biochemicals (Lörrach, Deutschland)
D-myo-Ins(1,4,6)P ₃	Alexis Biochemicals (s.o.)
D-myo-Ins(1,3,4,5)P ₄	Alexis Biochemicals (s.o.)
D-myo-Ins(1,4,5,6)P ₄	Sichem (Bremen, Deutschland)
D-myo-Ins(3,4,5,6)P ₄	Sichem (s.o.)
m-myo-Ins(1,3,4,6)P ₄	Calbiochem (Darmstadt, Deutschland)
m-myo-Ins(1,3,4,5,6)P ₅	Prof. Dr. med. Mayr (Hamburg, Deutschland)
D-myo-Ins(1,2,4,5,6) P ₅	Prof. Dr. med. Mayr (s.o.)
D-myo-Ins(1,2,3,4,5)P ₅	Prof. Dr. med. Mayr (s.o.)
D-myo-Ins(1,2,3,4,6)P ₅	Prof. Dr. med. Mayr (s.o.)
D-myo-InsP ₆	Calbiochem (Darmstadt, Deutschland)

4.1.6 Enzyme

<i>Pfu-Polymerase</i>	Stratagene (La Jolla, Kanada)
<i>T4-DNA-Ligase</i>	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)

Restriktionsendonukleasen mit Schnittstellen:

<i>Dpn I</i>	5' ...GA ^m TC... 3'	Fermentas (St. Leon Roth, Deutschland)
<i>Eco 31 I</i>	5' ...GGTCTC(N ₁)-3'	Fermentas (s.o.)
<i>Hind III</i>	5' ...A'AGCTT... 3'	Fermentas (s.o.)
<i>Xba I</i>	5' ...T'CTAGA... 3'	Fermentas (s.o.)

4.1.7 Verwendete Kits

NucleoSpin Plasmid DNA Purification Kit	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Big Dye Terminator Sequencing Kit	Applied Biosystems (Foster City, USA)

4.1.8 Größenstandards für Proteine und doppelsträngige DNA

Proteinmarker:

LMW-Marker	Amersham (Buckinghamshire, England)
------------	-------------------------------------

DNA-Marker:

100 bp Leiter

Fermentas (St. Leon Roth, Deutschland)

1000 bp Leiter

Fermentas (s.o.)

4.1.9 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG erworben.

Sequenzierprimer (innerhalb des Expressionsvektors bindend)

MN 242: 5'-GAG TTA TTT TAC CAC TCC CT-3'

IBA3C_rev: 5'-CGC AGT AGC GGT AAA CG-3'

4.1.10 cDNA-Vollsynthesen prädizierter Inositolphosphatkinasen unbekannter Spezifität aus *Entamoeba histolytica* und *Trichomonas vaginalis*

Die in dieser Arbeit verwendeten Vollängen-cDNAs wurden bei der Firma Genscript (Piscataway, USA) nach Genprädiktionen, die von Prof. Dr. med. Mayr vor Abschluß der Genomsequenzierungen der Spezies erstellt wurden, synthetisiert. Es handelt sich um für bakterielle Expression in *E. coli* codonoptimierte cDNA, die in einem *pUC 57*-Vektor geliefert wurde. Start- und Stop-Codon sind unterstrichen:

 Vollängen-cDNA der *Trichomonas vaginalis* IPK als Template-DNA in einem *pUC 57*-Vektor:

```

    10      20      30      40      50      60      70      80
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
  ATGGTAGGTCCTCAGCGCCATGGAAAGCAACAGCGATAGCTTTAGCAGCAGCGATCTGGATCCGCTGAACACCCAGGGCGG
    90      100     110     120     130     140     150     160
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
  CGGCCATGGCCAGCTGTGCAAAATTAAAAACCTGGATCATGGCATTGATTGCGTGGCGAAACCGCTGTTTGAACATGAAA
    170     180     190     200     210     220     230     240
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
  ACAACTTTTATACCATTTATGACCAAAACCCCGCTGGCGGATTGCCGCGCTTCTTTGGCAACACCCAGATTGATGGC
    250     260     270     280     290     300     310     320
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
  CATGAATATCTGCTGATTGAAGATCTGACCGCGGGCATGACCAGCCCGTGCATTGCGGATCTGAAACTGGGCACCCGTAG
    330     340     350     360     370     380     390     400
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
  CTTTGAAATTGGCGTGAGCGAAAGCAAAGTGGCTAAACAGATGCAGAACATGAGCAAAAGCACCCACCCGAAATATGCGG
    410     420     430     440     450     460     470     480
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
  TGGCTATTATTGATGTGAGCATGCCGTAAGATGGCAACCTGGTGAACCATTGGGATCGTAACTTTGGCAAAAAGCGCCG
    490     500     510     520     530     540     550     560
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
  ATTCAGAGCTTTATTGATACCATGAACAAATTTATTCCGGTGAACCGTAAACAGGAAATTTCTGGATAAAGTGGAAAGATGT
    570     580     590     600     610     620     630     640
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
  GATTACCAACTGACCCAGACCAAGAAATTTATCCGGGCAGCCGCTGTGTATAGCGGAGCCTGCTGGTGGTGATGATG
    650     660     670     680     690     700     710     720
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
  GCGATCAGGATCTGCCGATTCTGTGGCGCTGATTGATTTTGGCATGCCGATATAGCGATATTACCCAGTGCAGCGGCAAA
    730     740     750     760     770     780     790     800
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
  ATGGATAGCGAAGAAATTTGAAGATAACACCATTTCTGGGCCGTGCCTAACATTATTTCATCTGCTGACCGATCCGACCGAACT
    810     820     830
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
  GGAAAAACGTCAGATTTGATATGAGACCTACCAT
  
```

4.1.11 Puffer und Lösungen

4.1.11.1 Puffer für DNA-Polymerasen und DNA-Ligasen

Die aufgeführten Puffer wurden kommerziell bei den entsprechenden Firmen erworben:

10 x <i>Pfu</i>-Puffer	Stratagene (La Jolla, Kanada)
5 x <i>T4 DNA-Ligase</i>-Puffer	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Half-Term-Puffer	Applied Biosystems (Foster City, USA)

4.1.11.2 Puffer für Agarosegelelektrophorese

6 x DNA-Probenpuffer	Fermentas (St. Leon Roth, Deutschland)
TAE-Puffer	40 mM Tris / Acetat 2 mM EDTA, pH 8,3

4.1.11.3 Lösungen für SDS-PAGE

Acrylamidlösung Rotiphorese Gel 30	30 % Acrylamid 0,8 % N,N-Methylbisacrylamid
Laemmli-Laufpuffer	0,025 M Tris / HCl 0,192 M Glycin 0,1 % SDS (w / v)
4 x Trenngelpuffer	1,5 M Tris / HCl 0,4 % SDS (w / v), pH 8,8
4 x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris / HCl 0,4 % SDS (w / v), pH 6,8
4 x SDS-Probenpuffer	0,25 M Tris / HCl 200 mM DTT 35 % Glycerol (w / v) 4 % SDS (w / v) 0,04 % Bromphenolblau (w / v), pH 7,6
Färbelösung	0,5 % Coomassieblau (w / v) 9 % Eisessig 45,2 % Methanol in dH ₂ O
Entfärber	8 % Eisessig 25 % Ethanol 67 % dH ₂ O
Ammoniumpersulfat [APS]-Lösung	10 % (w / v)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin [TEMED]-Lösung	10 % (v / v)
Sammelgel	5 % Acrylamid 0,05 % (w / v) Ammoniumpersulfat [APS] 0,1 % TEMED in 1x Sammelgelpuffer

Trenngel	12,5 % Acrylamid 0,05 % (w / v) APS 0,1 % TEMED in 1x Trenngelpuffer
-----------------	--

4.1.11.4 Puffer zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

RF I-Puffer	100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ * 4H ₂ O 30 mM K-Acetat 10 mM CaCl ₂ * 2H ₂ O 15 % Glycerol (w / v), pH 5,8 mit Essigsäure
--------------------	---

RF II-Puffer	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl ₂ * 2H ₂ O 15 % Glycerol (w / v), pH 6,8 mit Essigsäure
---------------------	---

4.1.11.5 Sonstige Puffer

Puffer E	50 mM Hepes, pH 7,5 1 mM EDTA
-----------------	----------------------------------

4.1.12 Säulenmatrizes

Ionenaustauschchromatographie:

DEAE-Sephacel	Pharmacia (Ratingen, Deutschland)
Phosphocellulose P11	Whatman (Maidstone, England)

4.1.13 Bakterienstämme und Medien

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind:

***E. coli* XL1-Blue Stamm:** recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI^qZDM15 Tn10 (Tet^r)]; bezogen von Stratagene (La Jolla, Kanada);

***E. coli* BL21(DE3)pLyS, pREP4 Stamm:** B F⁻ dcm ompT hsdS(rB⁻ mB⁻) gal λ(DE3)[pLyS Camr]; bezogen von Stratagene (La Jolla, Kanada);

Folgende Medien wurden für die Bakterienkultivierung verwendet:

LB-Flüssigmedium	4 g Bacto-Trypton
	2 g Hefeextrakt
	4 g NaCl

Der Messzylinder wurde nach dem Einwiegen mit 400 ml ddH₂O aufgefüllt. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,2 eingestellt.

LB-Agarplatten	4 g Bacto-Trypton
	2 g Hefeextrakt
	6 g Bacto-Agar
	0,5 ml 4 M NaCl

Der Messzylinder wurde ebenfalls auf 400 ml mit ddH₂O aufgefüllt. Je nach Bedarf wurden den Medien Antibiotika aus den angesetzten Stock-Lösungen im Volumenverhältnis 1:1000 hinzupipettiert:

Ampicillin (100 mg / ml)	Serva (Hamburg, Deutschland)
Kanamycin (50 mg / ml)	Fluka (Hamburg, Deutschland)
Chloramphenicol (38 mg / ml)	Calbiochem (Darmstadt, Deutschland)
Tetracyclin (12 mg / ml)	Boehringer (Ingelheim, Deutschland)

4.1.14 Vektoren

<i>pASK-IBA 3</i>	IBA Biotagnology (Göttingen, Deutschland)
<i>pASK-IBA 5</i>	IBA Biotagnology (s.o.)

Bei den verwendeten Expressionsvektoren *p-ASK IBA 3* und *pASK IBA 5* (siehe Abbildung 4-1 und Abbildung 4-2) handelt es sich um Vektoren für prokaryotische Expression von Strep-Tag-Fusionsproteinen. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von Anhydrotetrazyklin [AHT].

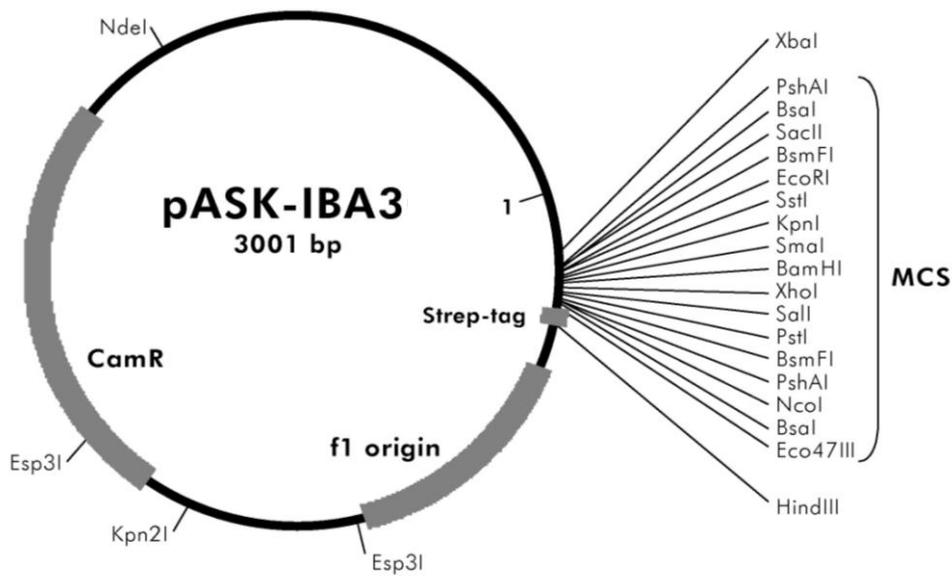


Abbildung 4-1: Vektorkarte des Expressionsvektors *pASK-IBA 3* mit C-terminal gelegenen Strep-Tag [www.iba-go.com]

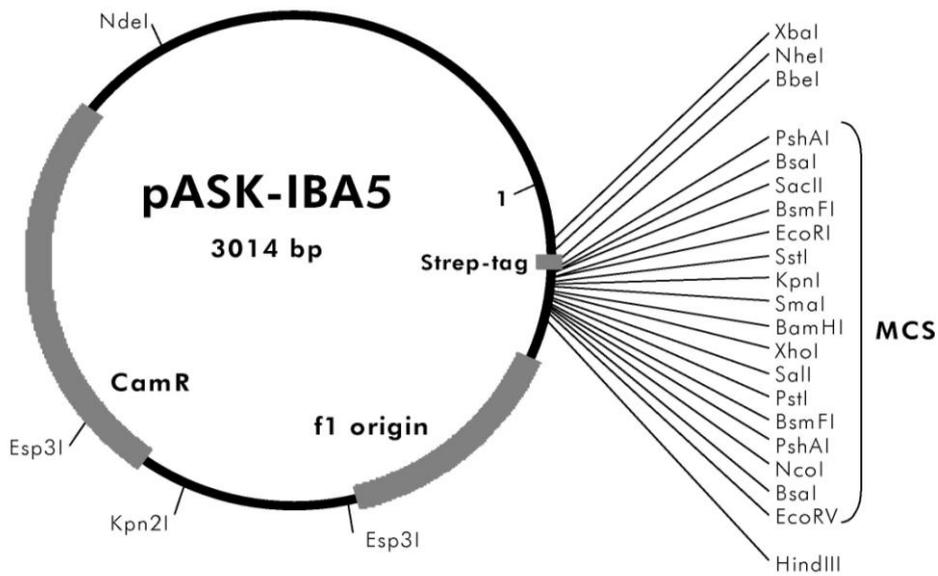


Abbildung 4-2: Vektorkarte des Expressionsvektors *pASK-IBA 5* mit N-terminal gelegenen Strep-Tag [www.iba-go.com]

4.2 Methoden

4.2.1 Molekularbiologische Methoden

4.2.1.1 Polymerasekettenreaktion [PCR]

Die Polymerasekettenreaktion wird zur Amplifikation von DNA verwendet. Hierbei binden Oligonukleotide (Primer) an bekannte Teile einer DNA-Einzestrand-Sequenz, um den Bereich, der zwischen diesen Teilen liegt, mit Hilfe einer hitzeresistenten Polymerase (*Pfu*- oder *Taq*-Polymerase) zu vervollständigen, wodurch schließlich wieder doppelsträngige DNA entsteht. Die PCR ist vielfältig und kann bei verschiedensten Techniken verwendet werden.

4.2.1.1.1 DNA-Amplifikation durch PCR

Der Ansatz wurde in ein 0,2 ml Eppendorf-Tube zusammenpipettiert. Hierbei wurden die Konzentrationen wie folgt gewählt:

Bestandteil	Menge / Konzentration
DNA-Template	1,0 µl / 10 ng / µl
3'-Primer	2,0 µl / 10 µM
5'-Primer	2,0 µl / 10 µM
dNTPs	2,0 µl / 10 mM
10 x PCR-Puffer (mit MgCl ₂)	5,0 µl / 10 x <i>Pfu</i> -Puffer
<i>Pfu</i> -Polymerase	1,0 µl / 2,5 U / µl
ddH ₂ O	37 µl

Folgendes Programm durchlief der Ansatz im Thermocycler:

Programmschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]
1. Initiale Denaturierung	95	120
2. Denaturierung	95	30
3. Annealing	50 – 57	30
4. Elongation	72	60 – 180
5. Terminale Elongation	72	300

Die PCR wurde mit einem Hotstart begonnen (*Pfu*-Polymerase-Zugabe nach initialer Denaturierung). Die Teilschritte Denaturierung, Annealing und Elongation wurden insgesamt 24 x durchlaufen. Die Annealing-Temperatur wurde für die jeweilige Reaktion individuell angepasst, da sie stets 5 °C niedriger justiert wurde als die Schmelzpunkte der verwendeten Oligonukleotide. Die Elongationszeit hing von der Größe des Amplifikats ab. Als Berechnungsgrundlage dienten Erfahrungswerte innerhalb des Labors: 2 min / kb. Die entstandene DNA wurde mittels DNA-Sequenzierung (siehe 4.2.1.8) analytisch untersucht und nach eventuell unerwünscht aufgetretenen Mutationen gescreent.

4.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird zur Analytik von DNA-Fragmenten verwendet. Es werden normalerweise 1 % - Agarose-Gele gegossen. Die verwendete Agarose wurde für 3 min in 1 x TAE-Puffer erhitzt und zum Kochen gebracht. Es folgte eine Abkühlungsphase auf ca. 50 °C. Danach wurde Ethidiumbromid hinzupipettiert. Zum weiteren Abkühlen und Aushärten wurde das Gel in eine entsprechende Gelkammer mit einem Kamm zum Erstellen der benötigten Probestaschen verbracht. Nach Härtung des Gels wurde die Kammer mit 1 x TAE Puffer gefüllt und die zu analysierende DNA wurde mit 6 x DNA-Probenpuffer versetzt und anschließend in die Taschen des Agarosegels gegeben. Zusätzlich wurden Marker eingesetzt, um die Größe der DNA-Fragmente bestimmen zu können. In der Regel kam hier die 1 kb DNA-Leiter zum Einsatz. Für etwa 25 - 30 min wurde schließlich Spannung (80 V) angelegt, um die DNA-Fragmente größenabhängig voneinander trennen zu können. Die Fragmente wurden danach durch einen UV-Transilluminator (312 nm) sichtbar gemacht. Das Videodokumentationssystem Variocam wurde zur Photographie benutzt.

4.2.1.3 DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen

Nach dem Sichtbarmachen der DNA wurden zügig die Banden mit einem scharfen Skalpell entfernt, um die DNA danach extrahieren zu können. Die Extraktion bzw. Aufreinigung der DNA erfolgte mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit von Qiagen. Es wurde nach dem Standardprotokoll vorgegangen. Abweichend hiervon erfolgte die Elution mit 20 µl ddH₂O, pH 8,0.

4.2.1.4 Schneiden von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Das Prinzip eines Restriktionsverdauens beruht auf Restriktionsendonukleasen, die in der Lage sind, kurze DNA-Sequenzen, die häufig 4 bis 6 Nukleotide umfassen und meist palindromisch angeordnet sind, zu erkennen und diese zu schneiden. Dadurch entstehen überhängende Enden, die vor allem bei einer geplanten Ligation (4.2.1.5) von großem Wert sind. Es wurden stets die vom Hersteller mitgelieferten Puffer der Restriktionsendonukleasen verwendet. Die verwendeten Ansätze wurden so konzeptionisiert, dass auf 0,5 µg DNA 10 U der entsprechenden Restriktionsendonuklease kamen. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte 3 h lang bei 37 °C. Danach wurde eine analytische Gelelektrophorese durchgeführt, die zur Überprüfung des Ergebnisses diente (siehe Kapitel 4.2.1.2).

4.2.1.5 Ligation

Die Ligation des PCR-Produkts mit dem Expressions- bzw. Klonierungsvektor erfolgte nach dem Restriktionsverdau mit *T4-Ligase*. Dieses Enzym katalysiert die Bildung eines Phosphodiesters unter Verbrauch von ATP. Hierfür wurde das Eluat aus 4.2.1.3 und der

ebenfalls geschnittene Vektor (im Verhältnis 3:1) unter Zusatz von Ligations-Puffer und *T4-DNA-Ligase* (5 U) bei 4 °C über Nacht inkubiert.

4.2.1.6 Plasmid-Minipräparation

Um aus Vorkulturen Plasmid-DNA zu gewinnen, wurde das NucleoSpin Plasmid DNA Purification Kit von Macherey und Nagel nach den Herstellerangaben verwendet.

4.2.1.7 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Lösungen wurden durch Messungen am Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine $OD_{260} = 1$ bei doppelsträngiger DNA entspricht ungefähr einer Konzentration von 50 µg / ml DNA in der Lösung. Darüber hinaus wurden bei einer OD_{230} Salzkontaminationen und bei einer OD_{280} Protein-Kontaminationen bewertet. Außerdem konnte man bei einer OD_{320} auch die eventuelle Verunreinigung durch Ethanol nachweisen. Es gilt, dass bei einem $OD_{260/280}$ -Verhältnis von 1,8 bis 2,0 die DNA als rein eingestuft werden kann.

4.2.1.8 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung geschah nach der Didesoxy-Methode (modifiziert nach [Sanger et al., 1977]). Hierbei wurde das *Big Dye Terminator Sequencing Kit* und der *Taq-Polymerase-Puffer Half-Term* eingesetzt. Es wurden für die vorbereitenden Schritte der Sequenzierung Primer eingesetzt, die vektorspezifisch waren. Die benötigten Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden in ein 0,2 ml Tube pipettiert:

Bestandteil	Menge / Konzentration
Plasmid-DNA	250 ng – 500 ng
Primer	10 pmol
<i>Big Dye</i> -Reagenz	3,0 µl
<i>Half Term</i> -Puffer	5,0 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

Das Programm wurde im Eppendorf Mastercycler Gradient nach folgendem Schema ausgeführt:

Programmschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]
1. Denaturierung	96	10
2. Annealing	50	5
3. Elongation	60	240

Die Sequenz wurde insgesamt 25 x wiederholt.

Nach Abschluss des Programms wurde der Inhalt des Tubes in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert. Es erfolgte eine Ethanol-Fällung: 60 µl 96 % Ethanol wurden dazugegeben. Nach einer Inkubation (10 min) bei Raumtemperatur schloss sich eine Zentrifugation für 35 min bei 13000 rpm an. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Es wurde darauf

geachtet, dass das entstandene Pellet nicht verletzt wurde. Es erfolgte eine Waschung des Pellets mit 100 µl 70 % Ethanol. Die sich anschließende Zentrifugation wurde für 15 min bei 13000 rpm durchgeführt. Der Überstand wurde erneut verworfen. Es erfolgte eine Trocknung des Pellets für ca. 15 min bei Raumtemperatur. Die gefällte DNA in Form des Pellets wurde im Sequenzierlabor des UKE abgegeben, wo die Sequenzierung durchgeführt wurde.

4.2.2 Mikrobiologische Methoden

4.2.2.1 Sterilisation von Gebrauchsmaterial

Die benötigten und verwendeten Materialien wurden, sofern sie hitzestabil waren, mit Hilfe des Autoklaven bei 121 °C und 1,2 bar sterilisiert. Nicht hitzestabile Lösungen wurden durch Sterifilter (0,2 µm) filtriert. Die Arbeitsflächen und die verwendeten Geräte wurden mit 80 % Ethanol durch Besprühung nach Gebrauch desinfiziert.

4.2.2.2 Anzucht und Lagerung von Bakterien (*E. coli*-Stämme)

Zur Anzucht von Kulturen, um bspw. eine Expression von Proteinen durchzuführen, wurden die Bakterien, bevor sie in ein entsprechendes LB-Flüssigmedium gegeben wurden, gleichmäßig auf LB-Agar-Platten, die je nach Resistenzlage gezielt mit Antibiotika versetzt wurden, verteilt. Es erfolgte eine Inkubationsphase über 12 - 16 h bei 37 °C. Die Lagerung der LB-Agarplatten mit Bakterienkolonien erfolgte über einen Zeitraum von maximal 6 Wochen bei 4 °C. Die Platten wurden vor der Lagerung mit Parafilm versiegelt.

Um Vorkulturen herzustellen, wurde ein einzelner Klon von der Agarplatte gepickt und als Einzel-Kultur in 3 ml LB-Flüssig-Medium überführt, das mit einem entsprechenden Antibiotika-Zusatz versehen war. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator, der auf 250 rpm eingestellt wurde. Das Animpfen der Hauptkultur geschah am nächsten Tag.

Wie im Kapitel 4.2.2.1 beschrieben, wurden vor Zusatz von Antibiotika alle Medien des Antibiotikums autoklaviert und wieder auf ca. 50 °C abgekühlt.

4.2.2.3 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*

Wie in Kapitel 4.2.2.2 beschrieben, wurde von einer Agar-Platte mit XL1-Blue-Klonen, die mit Tetracyclin (12 µg / ml) versetzt war, ein Klon in ein 5 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Übernacht-Kultur wurde abzentrifugiert (5000 rpm, 4 °C, 5 min), um das Antibiotikum zu entfernen. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml LB-Medium resuspendiert. Mit dieser Vorkultur erfolgte schließlich die Animpfung der 50 ml Hauptkultur. Bei 37 °C im Schüttler wurde die Kultur einige Stunden inkubiert. Bei einer $OD_{600} = 0,5$ wurde die Hauptkultur 15 min auf Eis zwischengelagert und anschließend 15 min

mit 2000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in einem Drittel des Ausgangsvolumens RF I-Puffer vorsichtig resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut 15 min bei 2000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet dann in 1 / 12 des Ausgangsvolumens kaltem RF II-Puffer resuspendiert und weitere 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden in 100 µl-Fraktionen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

4.2.2.4 Transformation von *E. coli*-Stämmen

Die Transformation erfolgte mit einem 100 µl Aliquot transformationskompetenter Bakterien (siehe Kapitel 4.2.2.3). Dabei wurden die Zellen, die bei -80 °C gelagert wurden, langsam auf Eis aufgetaut (ca. 15 – 20 min). Nach dem Auftauen wurde die entsprechende Plasmid-DNA (10 – 20 ng) dazugegeben. Die Zellen wurden dann für 30 min auf Eis gelagert. Es erfolgte ein Hitzeschock (1 min) bei 42 °C. Der Ansatz wurde 1 min auf Eis inkubiert. Dann wurde 1 ml LB-Medium dazugegeben. Die transformierten Zellen wurden 1 h bei 37 °C geschüttelt (250 rpm). Bei der Transformation mit Plasmid-DNA wurde nach erfolgter Inkubation 50 µl des Ansatzes auf eine mit dem entsprechenden Antibiotikum versehene Agar-Platte verteilt. Bei Ligationsansätzen wurde das gesamte Volumen auf der Agar-Platte ausplattiert. Die Platten wurden 12 - 16 h bei 37°C inkubiert. Die Lagerung der Platten (siehe Kapitel 4.2.2.2) erfolgte für maximal 4 Wochen bei 4 °C.

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 Rekombinante bakterielle Expression von Proteinen

Der mit dem Expressionsvektor *pASK-IBA 3* bzw. *pASK-IBA 5* transformierte Expressionsstamm *BL21(DE3)pLyS*, *pREP4* Stamm wurde in 6 ml LB-Medium gegeben, das mit jeweils 6 µl der erforderlichen Antibiotika Kanamycin, Chloramphenicol und Ampicillin versetzt war. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur zum Animpfen von 500 ml LB-Medium benutzt, dem vorher 500 µl Ampicillin zugegeben wurde. Zusätzlich wurde dem Medium 5 ml 20 % Glucose hinzupipettiert. Die Kultur wurde bis zu einer OD = 0,5 bei einer Wellenlänge von 600 nm unter den gleichen Kautelen wie die 6 ml Vorkultur inkubiert. Als die optische Dichte erreicht worden war, wurde die Expression mit Anhydrotetrazyklin [AHT] induziert. Ein Aliquot wurde vor der Expression abgenommen. Nach 1 h und nach 2 h wurden weitere Aliquots entnommen. Nach 2 h Inkubationsphase wurde die Kultur 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. Die Pellets wurden in 15 ml Puffer E resuspendiert. Nach Resuspendieren wurde ein weiteres Aliquot entnommen. Mit diesem Aliquot erfolgte später eine Testlyse zu analytischen Zwecken.

4.3.2 Lyse der Bakterien

Die Lyse der Bakterien erfolgte durch das pLys-Gen, Triton X-100 und Sonifizierung. Zuvor wurden der Suspension aus Kapitel 4.3.1 die Proteaseinhibitoren PMSF und Benzamidin hinzugegeben. Außerdem wurde die Lösung mit DTT und Triton X-100 versetzt.

Die Endkonzentration im Ansatz betrug:

1 mM PMSF
0,5 mM Benzamidin
1 mM DTT
0,5 % Triton X-100

Die Sonifizierung wurde dreimal für jeweils 45 s durchgeführt. Zwischenzeitlich wurden die Bakterien 1 min auf Eis inkubiert. Die unlösliche Fraktion wurde durch 10 min Zentrifugation bei 15000 rpm und 4 °C von der löslichen Fraktion getrennt.

4.3.3 Aufreinigung der Inositolphosphatkinasen durch die P11-Phosphocellulose-Säule

4.3.3.1 Herstellung der P11-Phosphocellulose-Säule

Bei der P11-Phosphocellulose-Säule handelt es sich um eine Kationenaustauschersäule. Die funktionelle Gruppe ist PO_4H_2 . Zum Herstellen der Säule wurden 5 g P11 in einen 500 ml Messzylinder eingewogen und 133 ml NaOH (0,5 M) dazugegeben. Es wurde bei Raumtemperatur nach Mischen für exakt 4 min inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von ddH_2O , bis die Lösung im Messzylinder ein Volumen von 600 ml erreicht hatte. Es wurde das Absetzen der Matrix abgewartet und der Überstand verworfen. Es erfolgte eine Auffüllung mit ddH_2O bis zu einem Volumen von 600 ml, anschließend die Abdekantierung des Überstandes. Ein Volumen von 100 ml Matrix wurde mit 100 ml 1 M HCl versetzt, um eine Endkonzentration von 0,5 M zu erreichen. Es wurde ausreichend gemischt und weitere 4 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurde erneut auf 600 ml mit ddH_2O aufgefüllt. Nach Absetzen der Matrix wurde wieder der Überstand dekantiert. Es erfolgte ein letzter Waschschrift, bevor die Matrix in die gewünschte Säule (30 ml Säule; Durchmesser = 2,5 cm) überführt werden konnte. Der pH-Wert der Säule wurde auf 7,5 eingestellt, indem die Säule mit Tris-HCl (1M, pH 7,5) neutralisiert wurde. Es erfolgte anschließend mit Puffer A eine Äquilibration der Säule.

4.3.3.2 Reinigung der im Bakterienlysats vorhandenen rekombinanten IPKs durch Chromatographie

Der Überstand des Bakterienlysats aus Kapitel 4.3.2 wurde mit einem Volumen Verdünnungspuffer verdünnt (ddH₂O, 0,5 mM EDTA, 3 mM DTT) und auf die voräquilibrierte Säule gegeben. Die Flußrate betrug ca. 1 ml / min. Es erfolgte die viermalige Waschung der Säule mit Puffer A. Die Elution wurde mit dem salzhaltigen Puffer B durchgeführt. Die Waschung und Elution erfolgten mit jeweils 10 ml des entsprechenden Puffers. Mit einer SDS-PAGE wurden die Wasch- und Eluatfraktionen genauer untersucht. Die Eluate wurden dann entweder anderen Chromatographiestufen zur Konzentrierung zugeführt oder direkt glycerinisiert und bei -20 °C gelagert.

Puffer A	25 mM HEPES, pH 7,5
	1 mM DTT
	1 mM EDTA
	0,1 % Triton X-100
Puffer B	25 mM HEPES, pH 7,5
	1 mM DTT
	1 mM EDTA
	0,1 % Triton X-100
	500 - 750 mM NaCl

4.3.3.3 DEAE-Sephacel-Säulenchromatographie zur IPK-Ankonzentrierung

Um eine Konzentrierung des Enzyms zu erreichen, wurde die Anionenaustauschermatrix DEAE-Sephacel, die neben der Aufkonzentrierung der Eluate auch einer weiteren Reinigung diente, verwendet. 1 ml Matrix wurde hierfür in eine Säule mit einem Durchmesser von 1 cm gegeben.

Um die NaCl-Konzentration des Ausgangs-Eluats aus Kapitel 4.3.3.2 unter 50 mM Endkonzentration zu verdünnen, wurde das Eluat mit DEAE-Puffer verdünnt. Die Säulenmatrix wurde vor Auftragen des Eluats mit 10 Säulenvolumen DEAE-Puffer äquilibriert. Dann wurde das Eluat auf die Säule gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit je einem Säulenvolumen DEAE-Puffer wurde mit 8 x 1 / 3-Säulenvolumen des DEAE-Elutionspuffers eluiert. Auch hier erfolgte eine Kontrolle der Fraktionen mit der SDS-PAGE. Die entstandenen Eluate wurden glycerinisiert, bei -20 °C gelagert und in dieser Form für die späteren Experimente benutzt.

DEAE-Puffer	10 mM HEPES, pH 7,5 1 mM EDTA 1 mM DTT 0,1 % Triton X-100
DEAE-Elutionspuffer	10 mM HEPES, pH 7,5 1 mM EDTA 1 mM DTT 0,1 % Triton X-100 500 mM NaCl

4.3.4 Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Um eine Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht durchzuführen, wurden SDS-Polyacrylamid-Gele gegossen. Es wurde nach der Methode von Laemmli [1970] eine denaturierende Gelelektrophorese durchgeführt. Damit war es möglich, Proteine nach ihrem Molekulargewicht zu ordnen. Die Abmessungen der Gele betragen 13,5 cm (Länge) x 6 cm (Breite) x 0,1 cm (Tiefe). Die Elektrophorese wurde in vertikalen Gelelektrophoresekammern durchgeführt.

Ammoniumpersulfat (Endkonzentration 0,05 %) wurde zwecks Polymerisation der Gele dazugegeben. Nach Zugabe von Ammoniumpersulfat dauerte die Polymerisation ca. 30 min bei Raumtemperatur. Nach abgeschlossener Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Kamm mit 21 Taschen, die ein Volumen von 40 µl ermöglichen, in das Trenngel eingeführt. Nachdem die Stabilität der Gele gewährleistet war, wurden die beiden Gele in eine vertikale Gelelektrophoresekammer gespannt, die Tanks mit Laufpuffer gefüllt und der Kamm entfernt. Nach dem Herausziehen des Kamms wurden mit einer Hamilton-Spritze die Taschen von eventuellen Gelresten oder Luftblasen freigespült.

Die zu analysierenden Aliquots wurden auf ein Volumen von 24 µl gebracht und mit 8 µl 4 x Probenpuffer versetzt. Es fand eine Erhitzung auf 95 °C für 8 min statt, um eine gute Denaturierung der Proteine zu erreichen. Anschließend wurden die Proben in die Taschen eingefüllt. Als Molekulargewichtsmarker wurde auf jedem Gel der Low Molecular Weight Proteinmarker mit einer Konzentration von ca. 1 µg pro Protein aufgetragen, der vorher nach dem gleichem Schema wie die Proben behandelt worden war. Die Gelelektrophorese wurde bis zum Übertreten der Proben in das Trenngel mit 90 V durchgeführt. Dann wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, als das Bromphenolblau das Ende des Trenngels erreicht hatte.

Sammelgel-Puffer (4 x)	0,5 M Tris / HCl, pH 6,8 0,4 % SDS
Trenngel-Puffer (4 x)	1,5 M Tris / HCl, pH 8,8 0,4 % SDS
Sammelgel (5 %)	0,125 M Tris / HCl, pH 6,8 0,1 % SDS 5 % Acrylamid 0,13 % N,N-Methylbisacrylamid 0,05 % Ammoniumpersulfat 0,1 % TEMED
Trenngel (12,5 %)	0,375 M Tris / HCl, pH 8,8 0,1 % SDS 12,5 % Acrylamid 0,33 % N,N-Methylbisacrylamid 0,05 % Ammoniumpersulfat 0,05 % TEMED
Trenngel (10 %)	0,375 M Tris / HCl, pH 8,8 0,1 % SDS 12,5 % Acrylamid 0,33 % N,N-Methylbisacrylamid 0,05 % Ammoniumpersulfat 0,05 % TEMED
Probenpuffer (4 x)	0,219 mM Tris / HCl, pH 6,8 10 % SDS 5,8 % β -Mercaptoethanol 0,04 % Bromphenolblau 16 % Glycerol
Proteinmarker (Low Molecular Weight) enthält die Bandengrößen:	97,0 kD 66,0 kD 45,0 kD 30,0 kD 20,1 kD 14,4 kD

1 x Laemmli-Laufpuffer	0,025 M Tris / HCl
	0,192 M Glycin
	0,1 % SDS

4.3.5 Färbung von SDS-Polyacryamidgelen mit Coomassie-Brilliant-Blue

Nach abgeschlossener Gelelektrophorese wurden die beiden Gele voneinander getrennt und das Sammelgel verworfen. Das Trenngel wurde bei Raumtemperatur in 50 ml Coomassie-Färbelösung unter leichtem Schwenken für 20 min eingelegt. Nach der abgeschlossenen Färbung wurde das Gel mit Wasser abgespült und danach in 50 ml Coomassie-Entfärber unter Dowex-Zugabe 2 h lang entfärbt.

Coomassie-Färbelösung	0,5 % Coomassie brilliant blue
	9 % Essigsäure
	45,25 % Methanol
	45,2 % ddH ₂ O

Coomassie-Entfärber	8 % Essigsäure
	25 % Ethanol
	67 % ddH ₂ O

4.3.6 Konservierung und Aufbewahrung der Gele

Nach Photodokumentation wurden die Gele getrocknet und konserviert.

4.3.7 HPLC-Analytik von Inositolphosphaten durch die Metal-Dye-Detection Methode (MDD)

Bei der MDD-Methode ([Mayr, 1990], [Guse et al., 1995]) handelt es sich um ein Verfahren, wodurch die Detektion von Inositolphosphaten bis hin zum pikomolaren Bereich ohne den Einsatz von Radioaktivität ermöglicht wird. Es findet ein Ligandenaustausch in einem System, das aus dem Farbstoff 4-(2-Pyridyl-(2)-azo)-resorcin [PAR], dem Kation Yttrium und den Inositolphosphaten, die metallbindend sind, besteht, statt. Das Absorptionsmaximum des PAR liegt im Wellenbereich von 520 nm – 550 nm. Die Absorption wird durch eine Komplexierung des PAR durch Yttrium (1:1) erhöht. Inositolphosphate sind in der Lage, Yttrium durch ihre Phosphomonoestergruppen zu binden. Dadurch nimmt die Konzentration des oben beschriebenen Komplexes ab. Die Konzentrationsunterschiede werden am Monitor durch „Peaks“ sichtbar.

4.3.7.1 Enzymatische Testungen der IPKs unbekannter InsP_x-Spezifität

Die Experimente hatten, nachdem die für das Enzym optimalen Inkubationsbedingungen

ermittelt wurden, folgende Standardpufferbedingungen als Grundlage:

Standard-Assaypuffer	20 mM Hepes-Puffer, pH 6,9
	5,0 mM MgCl ₂
	30 mM KCl
	1,0 mM DTT

Die Inkubationsphase erfolgte bei 30 °C nach einer Vorinkubation der 1,5 ml Eppendorf-Tubes (10 min) je nach Anforderung an das Experiment unterschiedlich lang. Die partiell aufgereinigte und ankonzentrierte Enzymlösung hatte eine Endkonzentration von ca. 0,1 µg / µl. Die Endkonzentration des Enzyms in den Ansätzen lag zwischen 5,2 und 9,4 µg / ml. Das Stoppen der Reaktion fand durch Zugabe von H₂O (0 °C) und TCA (Endkonzentration 10 %) statt. Bei Experimenten, bei denen die Standardpufferbedingungen nicht eingesetzt oder Veränderungen vorgenommen wurden, wird im Ergebnisteil darauf verwiesen.

4.3.7.1.1 Enzymkinetik

Die Inositolphosphatkonzentrationen wurden den Experimenten angepasst (10 – 50 µM), je nachdem, ob es sich um eine Bestimmung der Substratelektivität oder der K_m-Werte der Substrate handelte. Bei der Bestimmung des K_M-Werts für ATP wurde im Gegensatz zu den im Kapitel 4.3.7.1 beschriebenen Standardpufferbedingungen die ATP-Konzentration variiert. Bei Untersuchung der Substratelektivität fand die Verwendung der in Kapitel 4.1.5 erwähnten Inositolphosphate in z.T. variablen Konzentrationen statt.

4.3.7.1.2 Hemmstoffversuche

Die Experimente in dieser Arbeit dienten neben der Untersuchung der Enzymkinetik auch der Untersuchung potentieller Hemmstoffe. Hierfür wurde der Standardmix verwendet. Als Substrat diente Ins(1,4,5)P₃, das normalerweise in einer Konzentration von 25 µM eingesetzt wurde. Die Hemmstoff-Konzentrationen variierten zwischen 0,16 µM und 100 µM in den Ansätzen. Die Kontrollen wurden mit H₂O und DMSO durchgeführt. Die getesteten Hemmstoffe waren Aurintricarbonsäure [ATA], Bengalrosa, Chlorogensäure, Gossypol, Methylenblau, Quercetin, Rottlerin und Robinetin.

4.3.7.2 Aufreinigung der Proben für die HPLC-Analyse

Für die Aufarbeitung der Proben, um sie später analytisch per HPLC untersuchen zu können, wurde jede einzelne Probe (ad 400 µl H₂O) mit 0,5 M EDTA (2,5 µl), 0,1 M NaF (5 µl), TCA 50 % (100 µl; zur Proteinfällung) und Kohle (20 µl einer 50 %-Kohlesuspension) versetzt. Die Proben wurden für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Drehung der Proben über Kopf (10 min) im Kühlraum, um die Kohle in Suspension zu halten und eine Bindung

von ATP an Kohle zu erreichen. Mit einer Tischzentrifuge wurden die Proben 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach Überführung des Überstands in neue 1,0 ml Eppendorf-Tubes, wurden die Proben mit weiteren 20 µl Kohle versetzt. Es erfolgte eine erneute Drehung über Kopf, um die Proben gut zu durchmischen, bevor ein weiterer Zentrifugationsschritt (2 min, 13000 rpm) erfolgte. Der Überstand wurde in 2 ml Tubes überführt, bevor sich die Ausetherung der Proben (insgesamt dreimal) mit 1 ml wassergesättigtem Ether anschloss. Hierfür mussten die Proben jeweils 4 min stark geschüttelt werden. Zwischenzeitlich wurde die aus Ether bestehende Phase mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die wässrigen Phasen wurden mit 2 M Tris / HCl auf einen pH-Wert von 6,5 - 7,5 eingestellt, bevor es zu einer Beseitigung des Restethers durch Inkubation (10 min bei 50 °C) kam. Die Proben wurden dann auf 1000 µl mit ddH₂O aufgefüllt, bevor eine Filtrierung erfolgte. Das Auftragen und die Analyse geschah im HPLC-Labor der Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Mayr.

5 Ergebnisse

5.1 Homologievergleiche zwischen der *Entamoeba histolytica* IPK [EhIPK-1], *Trichomonas vaginalis* IPK [TvIPK-1] und ausgewählten Kinasen

Zur Vorbereitung der praktischen Experimente der vorliegenden Arbeit wurde von Prof. Dr. med. Mayr eine Assemblierung von DNA-Contigs aus sequenzierten DNA-Klonen aus dem Genom von *Entamoeba histolytica* und *Trichomonas vaginalis* vorgenommen. Bei einem Contig handelt es sich um in der Basenfolge überlappende DNA-Stücke, die von derselben genetischen Quelle abstammen. Ein Contig kann dafür verwendet werden, die ursprüngliche DNA-Sequenz zu rekonstruieren. Die folgenden Daten in Abbildung 5-1 und Abbildung 5-2 wurden freundlicherweise von Prof. Dr. med. Mayr zur Verfügung gestellt.

Um eine Aussage über den Funktionsumfang der prädizierten und untersuchten IPKs aus *Entamoeba histolytica* und *Trichomonas vaginalis* vor der Durchführung des experimentellen Teils machen zu können, wurden Alignments mit bereits bekannten Eukaryoten-IPKs (IP3K, IPMK, IP6K) angefertigt und auf Homologien hin untersucht. Für die Alignments wurde das Programm Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) und das Multiple Sequence Alignment Programm (<http://genome.cs.mtu.edu/map.html>) eingesetzt [Huang, 1994]. Die entsprechenden Alignments sind in Abbildung 5-3 und Abbildung 5-4 zu sehen.

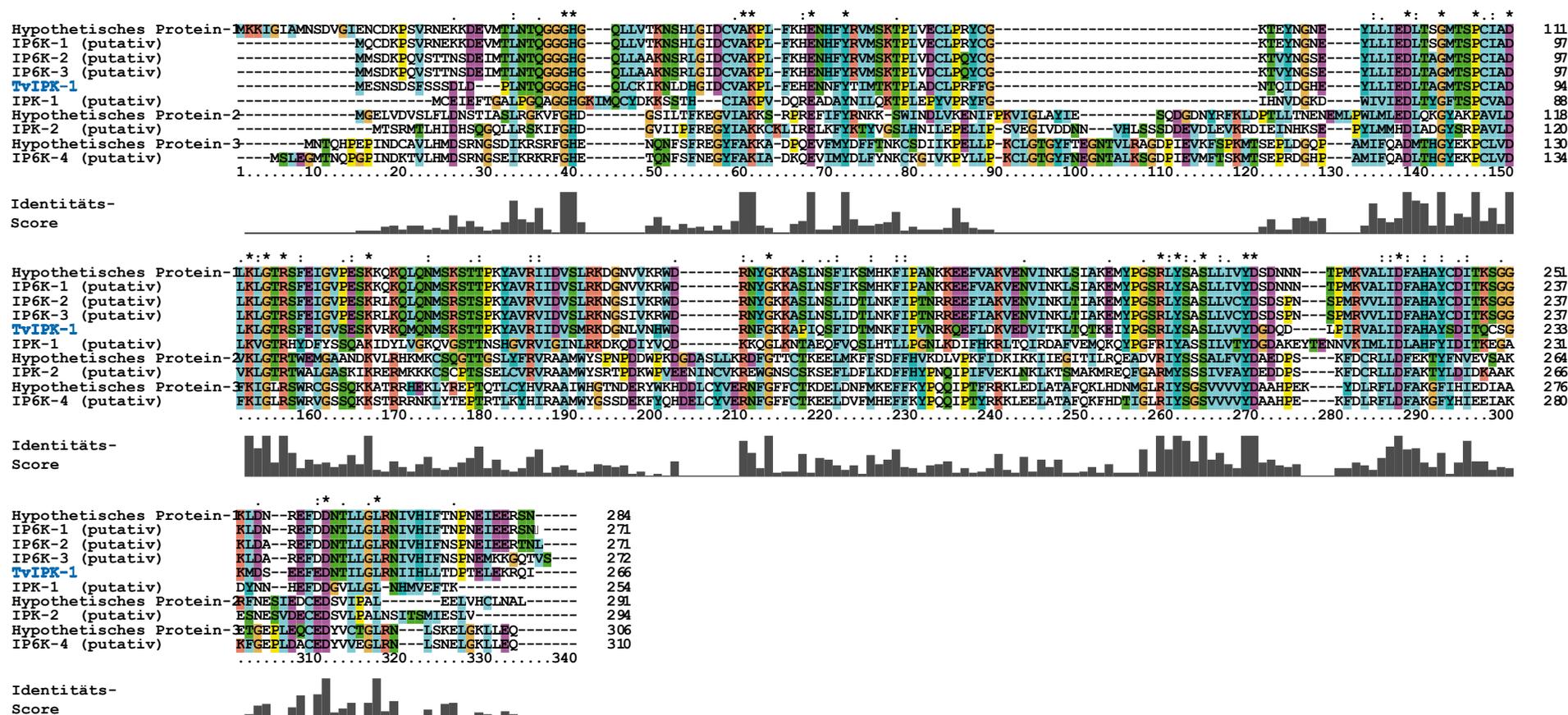


Abbildung 5-2: Alignment homologer Proteine aus *Trichomonas vaginalis*

Neben dem Alignment ist der Identitäts-Score abgebildet, der die Homologie der Proteine untereinander wiedergibt.

Bei dem in blau hervorgehobenen Protein handelt es sich um die exprimierte und charakterisierte TvIPK-1 (vgl. auch Abbildung 5-4). Die homologen Proteine sind auch hier (putative) IPKs, deren (putative) Funktion in der NCBI-Datenbank teilweise näher (maschinell) spezifiziert und in der Abbildung angegeben wurde. Drei der gezeigten Proteine werden in der Datenbank als hypothetische Proteine geführt. Die verwendete Nomenklatur der Proteine wird in den Stammbäumen in Kapitel 6 leicht variiert weiterverwendet. Jedem Protein wird in der Diskussion eine Bezeichnung zugeordnet, die sich an der Namensgebung der TvIPK-1 orientiert und die Homologie der putativen IPKs untereinander berücksichtigt (siehe Abbildung 6-1 und Abbildung 6-2).

Allen in der Abbildung gezeigten homologen Proteinen aus *Trichomonas vaginalis* sind die Accession-Nummern der NCBI-Datenbank zugeordnet: **Hypothetisches Protein-1:** XP_001297670; **IP6K-1:** XP_001312736; **IP6K-2:** XP_001302264; **IP6K-3:** Variante des Proteins XP_001302264; **TvIPK-1:** XP_001323250; **IPK-1:** XP_001583677; **Hypothetisches Protein-2:** XP_001318624; **IPK-2:** XP_001294231; **Hypothetisches Protein-3:** XP_001307469; **IP6K-4:** XP_001305423;

TvIPK-1	214	-----	-----
EhIPK-1	223	-----	-----
DmIP3K1	381	-----	-----
DmIP3K2	583	-----	-----
RnIP3KC	627	-----	-----
ScIPMK	288	-----	-----
DmIPMK	227	-----	-----
HsIP6K2	339	-----	-----
HsIP6K3	334	-----	-----
HsIP6K1	343	-----	-----
ScIP6K	956	YLLLIWNYLTSDMPLIFDEVEMNDMISEEADSNSTSATGSKINFNSKWDWLDEFDKED	-----
TvIPK-1	214	-----	-----
EhIPK-1	223	-----	-----
DmIP3K1	381	-----	-----
DmIP3K2	583	-----	-----
RnIP3KC	627	-----	-----
ScIPMK	288	-----	-----
DmIPMK	227	-----	-----
HsIP6K2	339	-----E-----	-----RPEVVLDSDAEDLED
HsIP6K3	334	-----EP-----	-----PERA-----PG-SP
HsIP6K1	343	-----ECRAESCLDRRSEMRLKHLDMVLPEVA-	-----SSCGPSTSP
ScIP6K	1016	EMYNDPNSKLRQWRKYELIFDAEPRYNDDAQVSD	-----
TvIPK-1	214	-----	-----
EhIPK-1	223	-----	-----
DmIP3K1	381	-----	-----
DmIP3K2	583	-----	-----
RnIP3KC	627	-----	-----
ScIPMK	297	DDDDDAEGSSEGPDKKTTGSLSSMSLIDFAHS	-----EITPGKGY-D-----E
DmIPMK	230	LADPPKPLINGYHQNDPDPATWVRVKMIDFAHV	-----YPAEQ-----GLPD-----E
HsIP6K2	355	LSEESADESAGAYAYKPIGASSVDVRMIDFAHTTCR	-----LYGEDTVVHEG-QD-----A
HsIP6K3	344	HPHEAPQAAHGS---SPGGLTKVDIRMIDFAHTTYK	-----GYWNEHTTYDG-PD-----P
HsIP6K1	379	S-NTSPEAGPSS---QP---KVDIRMIDFAHSTFK	-----GFRDDPTVHDG-PD-----R
ScIP6K		-----	-----
TvIPK-1	243	NTILGLRNIHLLTDPTLEKRQI	-----
EhIPK-1	248	GFLFGLNLIKSLIEDIENEFKSL	-----
DmIP3K1	413	GLLRGMDELT-----RSFE-EVYARCGSHRSCLKI	-----
DmIP3K2	616	GYLIGLNNLIDIFVELQASMEAEHAQ--AQAEAIQSPVSGSGGD-QAEQTGEE-SKP	-----
RnIP3KC	660	GYLWGLDNLICLLQGLAQS	-----
ScIPMK	340	NVIEGVETLIDIFMKF	-----
DmIPMK	273	NVMFGLQSLIEVVQSILHR	-----
HsIP6K2	405	GYIFGLQSLIDIVTEISEE-SGE	-----
HsIP6K3	391	GYIFGLNLRIRLQDIQEG-E	-----
HsIP6K1	421	GYVFGLENLISIMEQMRD--ENQ	-----
ScIP6K		-----	-----

Abbildung 5-3, Fortsetzung: Alignment der IPK aus *Entamoeba histolytica* [EhIPK-1] und *Trichomonas vaginalis* [TvIPK-1] gegen die IPMK aus *Saccharomyces cerevisiae*, die Isoformen 1 und 2 der IP3K aus *Drosophila melanogaster*, die Isoform C der IP3K aus *Rattus norvegicus* sowie gegen die Isoformen 1-3 der humanen IP6K

Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur die Bereiche des Alignments abgebildet, in denen die EhIPK-1 und TvIPK-1 mit den erwähnten IPKs aligniert. Die stark konservierten und für die katalytische Funktion des Enzyms essentiellen Motive sind farblich hervorgehoben. Das Alignment wurde mit der Amino-Säure-Matrix = Blossum 62 und den nicht Standard-Parametern gap open penalty = 5, gap extension penalty = 1 und gap size for constant penalty = 10 angefertigt.

Wie bereits in Kapitel 3.2.1 erwähnt, existieren in IPK-Aminosäuresequenzen Motive, die eine erste Hypothese in Bezug auf Zugehörigkeit und Funktion von IPKs zulassen. In der Abbildung 5-3 ist zu sehen, dass, durch rote Umrandungen hervorgehoben, verschiedene stark konservierte Consensus-Motive in der EhIPK-1, TvIPK-1 und in tierischen IPK-Sequenzen existieren.

5.1.1 Erklärung der PDKG-Kinase-Terminologie

Abbildung 5-3 zeigt das sehr gut konservierte Consensus-Motiv (**P-C-[VI]-[ML]-D-X-K-[MI]-G**) [**PDKG-Motiv**]. Dieses sog. PDKG-Motiv wurde von Saiardi et al. [1999, 2001a, 2001b] beschrieben. Es lässt sich sowohl bei Inositolphosphatmultikinassen als auch bei Inositolphosphat-3-Kinasen und Inositolhexakisphosphatkinasen als stark konservierter Bereich nachweisen. Das Signaturmotiv wurde von Togashi et al. [1997] an der Inositol(1,4,5)trisphosphat-3-Kinase und von Morrison et al. [2001] und Luo et al. [2002] an der Inositolhexakisphosphatkinase weiter untersucht. Im Falle von Mutationen im Bereich des PDKG-Motivs konnte gezeigt werden, dass, im Gegensatz zum Wildtyp-Enzym, unlösliche Mutanten entstehen [Deschermeier, 2005]. Es ist mittlerweile aus Kristallstrukturen von IP3Ks klar geworden, dass das Motiv für die 3D-Struktur bzw. Faltung des Proteins eine essentielle Rolle spielt. Es ist in einem β -Faltblatt gelegen und für die korrekte Positionierung von ATP verantwortlich. Mutationen beeinflussen sowohl die Bindung von ATP bzw. die Übertragung der Phosphatgruppe auf die entsprechende Hydroxylgruppe des Inositolrings als auch die maximale Umsatzgeschwindigkeit. Bertsch et al. [2000] konnten nachweisen, dass das Motiv neben der Positionierung des ATP auch bei der Bindung von Inositolphosphaten eine entscheidende Rolle spielt.

Zusätzlich existiert bei diesen Kinasen das (**S-[STA]₃-X-[LI]-G-[FV]-R-[IV]-X-G**)-Motiv [**GFR- / GVR-Motiv**] (siehe auch Abbildung 5-3), das, wie von Nalaskowski und Mayr [2004] beschrieben, für die korrekte Positionierung des Inositolphosphats erforderlich ist. Das Consensus-Motiv kommt nicht nur bei Inositolhexakisphosphatkinasen vor, sondern auch bei Inositol(1,4,5)trisphosphat-3-Kinasen. Deschermeier [2005] konnte experimentell beweisen, dass dieses konservierte Motiv eine funktionelle Bedeutung für die Inositolphosphatbindung der Inositol(1,4,5)trisphosphat-3-Kinasen besitzt. Gleiches ist bei der Inositolhexakisphosphatkinase zu vermuten. Wie der Abbildung 5-3 weiter zu entnehmen ist, weisen die EhIPK-1 und TvIPK-1 im Bereich des PDKG-Motivs starke Homologien zu den IPMKs als auch zu den IP6Ks auf. Die Verwandtschaft zu den IP6Ks scheint jedoch noch ausgeprägter zu sein. Beim hervorgehobenen GFR- / GVR-Motiv zeigen die beiden Kinasen, vor allem die EhIPK-1, die größte Übereinstimmung mit IP6Ks.

Neben dem erwähnten PDKG- und GFR- / GVR-Motiv existieren noch weitere für die Funktion der IPKs essentielle Motive. Das **SLL**-Motiv ist maßgeblich an der Aufrechterhaltung der 3D-Struktur der IPKs beteiligt und stellt Teil der o.g. β -Faltblattstruktur dar [Miller und Hurley, 2004]. Außerdem findet man bei allen Kinasen der PDKG-Familie das **DF[GA]-Motiv**. Dieses Motiv ist, wie die anderen Motive auch, im C-Terminus der katalytischen Domäne lokalisiert. Es kommt nicht nur bei Inositolphosphatkinasen sondern auch bei Proteinkinase vor. Es konnte durch Röntgenstrukturanalysen bereits gezeigt werden ([Lowe et al., 1997], [Johnson et al., 1998]), dass der Aspartat-Rest eine funktionelle

Bedeutung bei der ATP-Bindung besitzt. Mutationen des Aspartatrests führen zu einer kompletten Inaktivierung des Enzyms. Bezogen auf die aus der *Ratte* isolierte Inositol(1,4,5)trisphosphat-3-Kinase A wurde dies von Communi et al. [1993] beobachtet. Anhand eines Komplexes, bestehend aus der Phosphorylase Kinase, einem zugehörigen Peptidsubstrat und AMPPNP (Adenylymidodiphosphat), konnte gezeigt werden, dass die Carboxylgruppe des Aspartats eine wichtige Rolle für die korrekte Bindung des AMPPNP spielt. Daraus lässt sich ableiten, dass das DFG- / DFA-Motiv wichtig für die Bindung von ATP ist. Wie in Abbildung 5-3 zu sehen, ist das SSSL-Motiv bei allen Kinasen stark konserviert. Die TvIPK-1 besitzt in diesem Bereich die wohl ausgeprägteste Ähnlichkeit zu den dort abgebildeten IP6Ks. Die EhIPK-1 zeigt Homologien zu nahezu allen abgebildeten Kinasen, wodurch eine genaue Zuordnung zu einer speziellen Isoform der tierischen PDKG-Kinasen an dieser Stelle schwer fällt. Im Bereich des DFG- / DFA-Motivs lässt die Alignierung der IPKs ebenfalls keine klare Zuordnung der EhIPK-1 und TvIPK-1 zu einer tierischen PDKG-Kinase-Isoform zu. Es zeigt sich eine nahezu gleich ausgeprägte Homologie zu allen Kinasen, wobei die Ähnlichkeiten zu IPMKs und IP6Ks größer ist als zu IP3Ks.

Ein direkter Vergleich in Form eines Alignments zwischen der EhIPK-1 und TvIPK-1 in Abbildung 5-4 zeigt neben den bereits besprochenen Motiven ebenfalls einen sehr stark konservierten Bereich innerhalb des N-terminalen Bereichs der katalytischen Domäne in Form eines (Q-X-G-G-H-G)-Motivs, das man ebenfalls in allen PDKG-Kinasen finden kann.

TvIPK-1	1	MESNSDSFSS	SDLDPLNT	OGGGHG	QOLCKIKNLDHGIDCVAKPLFEH	ENNFYTIMTKTPL
EhIPK-1	1	MNTKIKREHM	STKKSQWV	QAGGGG	---PQQLHDPGQYLLKPKCLSHRE	ERDFYLIHKDDKE
TvIPK-1	60	---ADCL	PRFEG	----	NTQIDGHEYLLIEDL	TAGMTSP
EhIPK-1	58	WTGTGI	IPKRY	EVELHEFGFGELE	FIRMENLMYKYKR	PFVLDLKLGT
TvIPK-1	113	KQMQNSKST	TPKYAVRI	IDVSMRKDGNLVNHWRNF	-GKKAPIQSFIDTMN	KFIPVNRK
EhIPK-1	118	KRLVVDST	STTSLGVR	FSGMERNIGEEKPILYS	RYLCTHEVNTRDSL	KEYIKLFFNDGK
TvIPK-1	112	QEFLDKVEDV	TKLTQTK	EIYPGS--	RLYSASLLV	VYDGD---
EhIPK-1	178	KYRKELVPYF	ISQLDKMIE	VMKKREYKMFSS	SVL	FVYDSTTTLED
TvIPK-1	227	-DITQ	CSGKMDSEEF	EDNTILGLRN	IIHL	LDPTLEKRQI
EhIPK-1	238	LSEEECT	-----	V	EDGFLFGLN	NLKSITLED-IENEFKSL

Abbildung 5-4: Alignment der EhIPK-1 gegen die TvIPK-1

Es existieren schon jetzt in der AG Prof. Dr. med. Mayr Hinweise darauf, dass dieses Motiv ebenfalls auch bei anderen Protozoen-IPKs, u. a. bei *Plasmodium falciparum*, auftritt. Nähere Untersuchungen, bspw. in Form von Mutationsversuchen, könnten Aufschluss darüber geben, welche Funktion dieses Motiv innerhalb der katalytischen Domäne besitzt. In Bezug auf Protozoen sind bisher keine Veröffentlichungen bekannt, in denen funktionelle Isoformen von Inositolphosphatkinasen in Bezug auf Homologien zwischen

Protozoenspezies untersucht worden wären. Eine genaue Eingruppierung der EhIPK-1 und TvIPK-1 ist daher nicht möglich. Wie gezeigt sind die beiden als cDNA hergestellten IPKs von *Entamoeba histolytica* bzw. *Trichomonas vaginalis* sowie alle mittlerweile gefundenen Homologen sicher der PDKG-Familie zuzuordnen.

Wie spätere Untersuchungen zeigen werden (siehe v.a. Kapitel 5.6.3) sind Alignierungen der hier vorgestellten Protozoen-IPKs mit höher entwickelten Eukaryoten-IPKs und den damit verbundenen Prädiktionen der Funktion der IPKs nur bedingt aussagekräftig. Alignments, wie sie in der Abbildung 5-3 und Abbildung 5-4 zu sehen sind, zeigen in Kombination mit den durchgeführten Experimenten und den daraus resultierenden Ergebnissen, dass anhand von Aminosäure-Übereinstimmungen die Inositolphosphatspezifität (Liegt eine IPMK, IP3K oder IP6K vor?) der jeweiligen Kinase nur teilweise präzifizierbar ist.

5.2 Klonierung einer IPK aus *Entamoeba histolytica* [EhIPK-1] in den bakteriellen Expressionsvektor *pASK-IBA 3*

Nach dem durchgeführten Homologievergleich und der Assemblierung von DNA-Contigs durch Prof. Dr. med. Mayr wurde bei der Firma Genscript (www.genscript.com) eine Vollsynthese der präzifizierten DNAs für die IPKs aus *Entamoeba histolytica* und *Trichomonas vaginalis* in Auftrag gegeben, da keine cDNAs oder genomischen Klone zur Verfügung standen. Außerdem war es nicht möglich, DNA von Protozoen zu gewinnen, da die im Institut verfügbaren Labore nicht die entsprechende Sicherheitsstufe aufwiesen.

Vollsynthese von DNA-Strängen wird durch aufeinanderfolgende Addition aktivierter Monomere an eine wachsende Kette, die an eine unlösliche Matrix gebunden ist, durchgeführt [Stryer, 1999]. Protonierte Desoxyribonucleosid-3'-Phosphoramidite dienen hierbei als Monomere. Zunächst wird das 3'-Phosphoratom der neuen Gruppe an das 5'-Sauerstoffatom der entstehenden Kette gebunden. Der bei der Bindung entstehende Phosphitriester wird mit Iod zum Phosphotriester oxidiert. Zuletzt wird die Dimethoxytrityl (DMT)-Schutzgruppe am 5'-OH-Ende durch Dichloressigsäure entfernt, die vorher die 5' OH-Gruppe der einzelnen Nukleotide schützte. Durch Wiederholung dieser Schritte wächst die DNA-Kette kontinuierlich.

Es konnte leider nicht abschließend geklärt werden, wie die Firma Genscript den zweiten DNA-Strang synthetisiert. Eine beliebte Methode besteht darin, mehrere komplementäre, aber versetzte Oligonukleotide zu synthetisieren und zu hybridisieren. Die vorhandenen Lücken in den Strängen werden dann durch Polymerase-Zusatz gefüllt (siehe auch Abbildung 5-5). Nach Ligation der noch vorhandenen Gaps kann die zweisträngige DNA dann schließlich in einen Vektor kloniert werden.

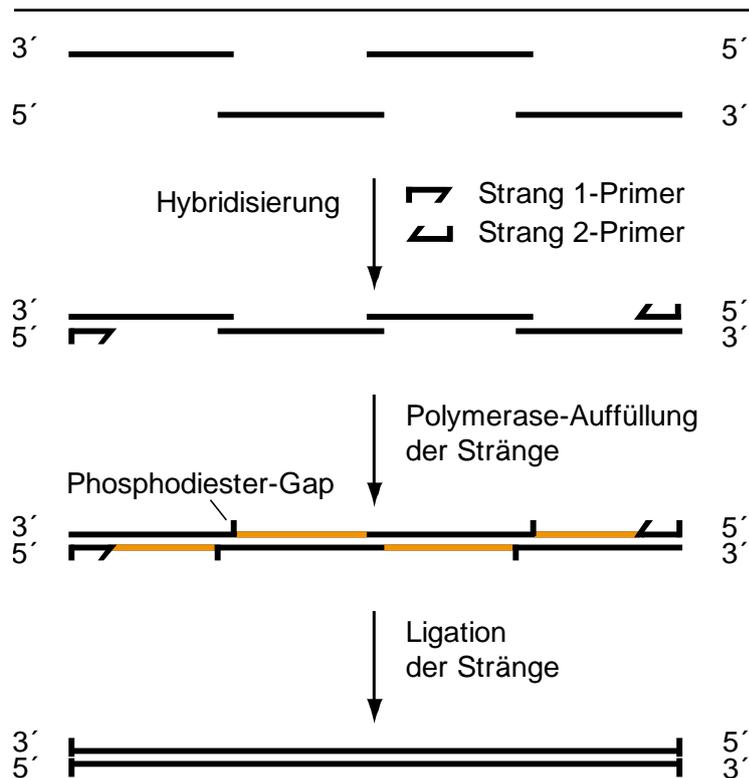


Abbildung 5-5: DNA-Synthese durch Oligonukleotidsynthese, katalysierte Zweitstrang-Auffüllung und abschließende Ligation

Die vollsynthetisch hergestellte cDNA, die von der Firma Genscript in einem *pUC57*-Vektor geliefert wurde, konnte durch Klonierungstechniken (Hydrolyse und Ligation) in den *pASK-IBA 3*-Vektor, der mit einem Strep-Tag zur Aufreinigung (siehe auch Kapitel 5.4.1) mittels Streptavidin-Matrix-Säulen versehen war, eingebracht werden (siehe Kapitel 4.2.1.4 und 4.2.1.5). Hierfür wurde die putative Inositolphosphatkinase aus *Entamoeba histolytica*, die in einem *pUC 57*-Vektor geliefert wurde, ebenso wie der entsprechende Expressionsvektor mit der Restriktionsendonuklease *Eco 31 I* hydrolysiert. Daraufhin erfolgte die Ligation mit *T4-DNA-Ligase*. Die Codon Usage der synthetisch hergestellten DNA wurde vorab von Genscript optimal an die anstehende bakterielle Expression angepasst. Nach einer erfolgten Sequenzierung des Inserts des Expressionsvektors nach der Ligation, um unerwünschte Mutationen auszuschließen, erfolgte die Expression wie sie in Kapitel 4.3.1 und 5.3 beschrieben ist.

Die translatierte DNA ergab die in der Abbildung 5-4 angegebene Aminosäuresequenz (Die Abkürzungen der Aminosäuren sind in Tabelle 5-1 aufgeschlüsselt).

Das Protein besitzt ein errechnetes Molekulargewicht von 31,81 kDa und eine Länge von 270 Aminosäuren. Der prozentuale und absolute Anteil der Aminosäuren an der Zusammensetzung der EhIPK-1 kann Tabelle 5-1 entnommen werden. Die Zusammensetzung des Enzyms aus den unterschiedlichen Aminosäuren ist noch einmal graphisch in Abbildung 5-6 dargestellt.

Aminosäure	Anzahl	Anteil [%]
Alanin [Ala (A)]	3	1,11
Cystein [Cys (C)]	4	1,48
Asparaginsäure [Asp (D)]	15	5,56
Glutaminsäure [Glu (E)]	25	9,26
Phenylalanin [Phe (F)]	16	5,93
Glycin [Gly (G)]	17	6,30
Histidin [His (H)]	8	2,96
Isoleucin [Ile (I)]	15	5,56
Lysin [Lys (K)]	29	10,74
Leucin [Leu (L)]	26	9,63
Methionin [Met (M)]	10	3,70
Asparagin [Asn (N)]	10	3,70
Prolin [Pro (P)]	8	2,96
Glutamin [Gln (Q)]	7	2,59
Arginin [Arg (R)]	12	4,44
Serin [Ser (S)]	19	7,04
Threonin [Thr (T)]	17	6,30
Valin [Val (V)]	12	4,44
Tryptophan [Trp (W)]	4	1,48
Tyrosin [Tyr (Y)]	13	4,81

Tabelle 5-1: Prozentualer und absoluter Anteil der Aminosäuren an der EhIPK-1

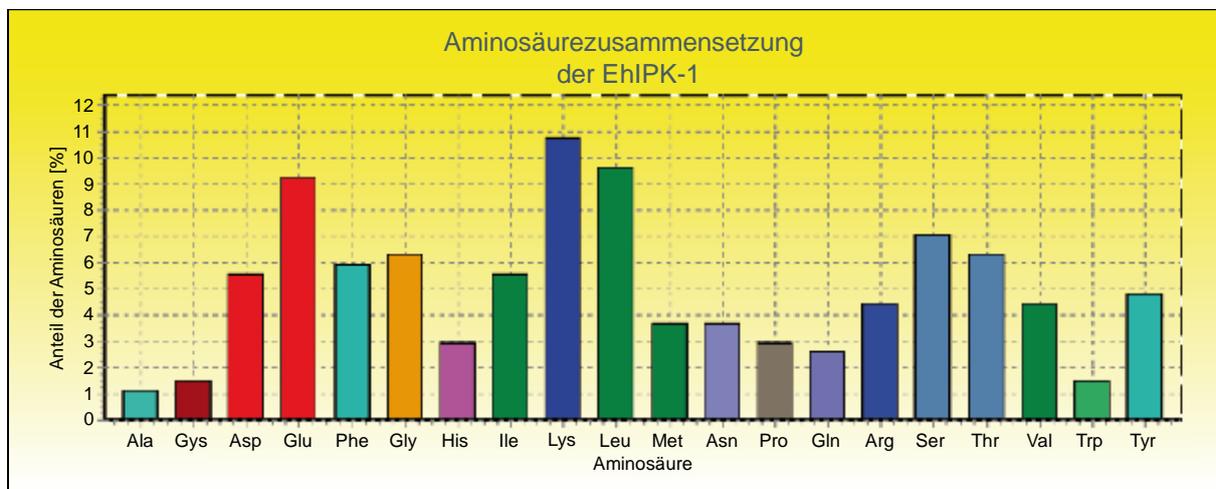


Abbildung 5-6: Prozentualer Anteil der Aminosäuren an der EhIPK-1

Bei Asparaginsäure und Glutaminsäure handelt es sich in der Regel um negativ geladene, bei Lysin und Arginin um positiv geladenen Aminosäuren. Wie in der Abbildung 5-7 hervorgehoben, scheint die Substratbindungsstelle des Enzyms negativ geladen zu sein. Das vollständige Protein besitzt jedoch eine positive Ladung von +1.

Im Rahmen eines Genomprojekts wurde im Verlauf dieser Arbeit von Loftus et al. [2005] die Sequenz des Genoms von *Entamoeba histolytica* komplettiert. Unter der Accession-Nummer XP_648490.1 (in Abbildung 5-7 als EhIPK A bezeichnet) ist ein Gen beschrieben, das für eine putative Inositolphosphatkinase codiert. Die von Prof. Dr. med. Mayr prädiizierte EhIPK-

1 unterscheidet sich lediglich durch neun am N-Terminus zusätzlich gelegene Aminosäuren, die bei der dort vorgestellten putativen IPK nicht existent sind und bei der hier verwendeten DNA exprimiert wurden. Abgesehen davon besteht zu dem von Loftus et al. prädierten Gen eine absolute Übereinstimmung zur EhIPK-1 von Prof. Dr. med. Mayr (siehe Abbildung 5-7).

EhIPK-1	1	MNTKIKREH	MSTKKSQWVQAGGHGGPQOLHPDGO	YLLKPCLSHRERDFYLHIKDDKEWTG
EdIPK A	1	-----	MNSKKSQWVQAGGHGGPQOLHPDGO	YLLKPCLSHRERDFYLHIKDDKEWTE
EhIPK A	1	-----	MSTKKSQWVQAGGHGGPQOLHPDGO	YLLKPCLSHRERDFYLHIKDDKEWTG
EdIPK B	1	-----	MSIPT-KSEWVQAGGHGGSHQLVPGK	YLLKPCLAPREKAFYLVQNDKEWSK
EhIPK B	1	-----	MSISTTKSEWVQAGGHGGSHQLVPNGE	YLLKPCLAPREKAFYLVQNDKEWCE
PDKG-Motiv				
EhIPK-1	61	TGIIPK	FGVELHEFGFGELEFIRMENLMYK	YKRPFVLDLKIQTOTWDPETASSKMKKRL
EdIPK A	52	TGI	VPKFGVELHEFGFGELEFIRMENLMYQ	YKRPFVLDLKIQTOTWDPETASSKMKKRL
EhIPK A	52	TGI	IPKFGVELHEFGFGELEFIRMENLMYK	YKRPFVLDLKIQTOTWDPETASSKMKKRL
EdIPK B	53	SEI	IPKFGVIEEHD	FGYGEFEFIKMNENLMNQVKKP
EhIPK B	54	SEI	IPKFGVIEEHD	FGYGEFEFIKMNENLMNQVKKP
Substratbindungssite				
EhIPK-1	121	VVDSTSTTTSLG	VRFSGMERNIGEEKPILYSRYLCTHEVNTRDSLKEYIKLFFNDGKKYR	
EdIPK A	112	MVDSTSTTTSLG	VRFSGMERNIGEEKPILYSRYLCTHEVNTRDSLKEYIKLFFNDGKKYR	
EhIPK A	112	VVDSTSTTTSLG	VRFSGMERNIGEEKPILYSRYLCTHEVNTRDSLKEYIKLFFNDGKKYR	
EdIPK B	113	IVDSTSTTTSLG	VRFSGMRRNI-TDKPILYSRYLCTNEVNTRDSLKEYIKLVFFDGEKYR	
EhIPK B	114	IVDSTSTTTSLG	VRFSGMRRNV-TDKPILYSRYLCTNEVNTRDSLKEYIKLVFFDGEKYR	
SSLL-Motiv				
EhIPK-1	181	KELVPYFIS	QLDKMI	EVMMKKREYKMFSSSVLFVYDSTTTLEDKKYNCKMIDFAHNWILSE
EdIPK A	172	KELVPYFIL	QLNKMI	EVMMKKREYKMFSSSVLFVYDASAASLEKKYNCKMIDFAHNWILSE
EhIPK A	172	KELVPYFIS	QLDKMI	EVMMKKREYKMFSSSVLFVYDSTTTLEDKKYNCKMIDFAHNWILSE
EdIPK B	172	NDLLPYFIQ	STNKMIDVMNKKQFKMFSASVLFVYDGASKFEDQKHACKIIDFAHAWDVT	
EhIPK B	173	NDLLPYFIQ	SISKMIDVMNKKQFKMFSASVLFVYDASAASKFEDQKHACKIIDFAHAWDVT	
EhIPK-1	241	EECTVEDGFLFGLN	NLKSILEDIENEFKSL	
EdIPK A	232	EECTVEDGFLFGLN	NLKSILEDIEIEFKSL	
EhIPK A	232	EECTVEDGFLFGLN	NLKSILEDIENEFKSL	
EdIPK B	232	EECNVDDGFVIGL	TTLNLMLEELHSEFNLL	
EhIPK B	233	EECNVDDGFVIGL	TTLKIMFEELHSEFNLL	

Abbildung 5-7: Alignment der EhIPK-1 mit hoch homologen identifizierten Genen aus *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar*

Mittlerweile existiert eine Korrektur für die EhIPK-1 A, die ebenfalls die neun zusätzlichen N-terminalen Aminosäuren umfaßt. Vielleicht existieren hier zwei alternative Start-Methionine.

Neben dem zur EhIPK-1 stark homologen Gen (EhIPK A) war es auch möglich, durch Alignments weitere Übereinstimmungen der exprimierten IPK innerhalb der NCBI-Genomdatenbank zu finden. Hierbei handelt es sich unter anderem um eine putative Inositolphosphatkinase (Accession-Nummer: XP_001736963.1) (EdIPK A) aus *Entamoeba dispar*. Die weiteren Alignments ergaben eine geringere Übereinstimmung mit der hier vorgestellten EhIPK-1: Zum einen konnte eine weitere Inositolphosphatkinase (Accession-Nummer: XP_652950.1) von *Entamoeba histolytica* (EhIPK B) identifiziert werden [Loftus et al., 2005], andererseits wurde ein Gen (Accession-Nummer: XP_001739264.1) (EdIPK B) gefunden, das bei *Entamoeba dispar* für eine putative Inositolphosphatmultikinase codieren soll [Lorenzi et al., 2007]. Eine experimentelle Verifizierung dieser Prädiktionen steht jedoch noch aus.

Im direkten Vergleich der Gene untereinander wird es offensichtlich, dass jeweils zwei Gene von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* (EhIPK A / EdIPK A; EhIPK B / EdIPK B)

stark übereinstimmen. Wie in Kapitel 3 bereits beschrieben, ähneln sich die Genome von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* sehr, mit dem wichtigen Unterschied, dass *Entamoeba histolytica* im Gegensatz zu *Entamoeba dispar* humanpathogen ist. Es ist daher anzunehmen, dass die jeweiligen Paare mit einer hohen Wahrscheinlichkeit und geringer Variabilität in der Aminosäuresequenz für die selbe Art von Inositolphosphatkinase codieren und es sich um Isoformen der EhIPK-1 handelt.

5.3 Bakterielle Expression der EhIPK-1

Nach Ligation der DNA, die für die EhIPK-1 codiert, mit dem Expressionsvektor *pASK-IBA 3* konnte der Expressionsvektor mittels Transformation (siehe Kapitel 4.2.2.4) in den Expressionsstamm *BL21(DE3)pLyS pREP4* eingebracht werden. Daraufhin wurde die Expression durchgeführt: Nach Animpfen einer Über-Nacht-Kultur mit dem Expressionsstamm wurde die Kultur in 500 ml LB-Medium gegeben und zusätzlich mit Ampicillin versetzt. Nach Erreichen einer OD=0,5 bei 600 nm Wellenlänge wurde die Expression durch Zugabe von Anhydrotetrazyklin [AHT] gestartet (siehe Kapitel 4.3.1). Nach der im Methoden-Teil dieser Arbeit besprochenen Überexpression erfolgte eine Analyse des Expressionsversuchs anhand einer SDS-PAGE.

Bei dem Enzym handelt es sich um ein Protein, das eine theoretische Größe von 31,8 kDa aufweist. Es wurden die drei Aliquots, die vor, nach 1 h und am Ende der Expression (nach 2 h) entnommen wurden auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich ist der LMW-Marker in der Abbildung 5-8 zu sehen.

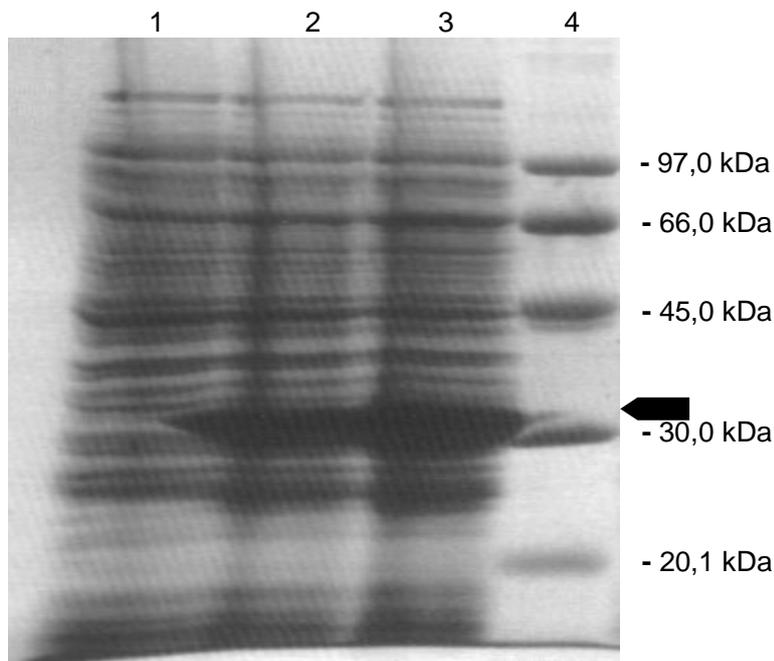


Abbildung 5-8: Analytische SDS-PAGE nach Überexpression der EhIPK-1

In der Abbildung sind die unterschiedlichen Spuren durch Nummerierung hervorgehoben: 1: Aliquot vor Induktion; 2: Aliquot 1 h nach Induktion; 3: Aliquot 2 h nach Induktion; 4: LMW. Die zum LMW-Marker zugehörigen Proteingrößen sind am rechten Bildrand angegeben. Der Pfeil verweist auf die neu hinzugekommene Bande nach Überexpression.

Tatsächlich ist auf der SDS-PAGE bei den Spuren 2 und 3, verglichen mit der Spur 1, die Verstärkung einer Bande auf Höhe der 30 kDa-Bande des LMW-Markers zu sehen. Wie erwartet deckt sich also das theoretisch errechnete Gewicht des Proteins mit der auf der SDS-PAGE gefundenen sehr prominenten Bande.

5.4 Partielle Aufreinigung des Bakterienlysats

5.4.1 Partielle Aufreinigung der EhIPK-1 durch die P11-Phosphocellulose-Säule

Es ist aus Arbeiten des Instituts von Prof. Dr. med. Mayr an anderen rekombinanten IPKs bekannt, dass sich IPMKs mit einer Phosphocellulose-Säule gut aufreinigen lassen. Für die Reinigung wurde daher eine (kostengünstige) P11-Säule (siehe auch Kapitel 4.3.3) verwendet und auf die Aufreinigung mit einer Streptavidin-Säule trotz des im rekombinanten Proteins vorhandenen Tags verzichtet. Die 30 ml-P11-Säule besaß einen Durchmesser von 2,5 cm. Der pH-Wert der Säule wurde auf 7,5 eingestellt. Die Flußrate betrug ca. 1 ml / min. Nach Lyse der Bakterien durch Sonifizierung (siehe Kapitel 4.3.2) wurde eine SDS-PAGE angefertigt (siehe Abbildung 5-9), die nach der Aufreinigung mit einer P11-Phosphocellulose-Säule entstand (siehe Kapitel 4.3.3.2) und die Wasch- und Eluatfraktionen, die während der Aufreinigung entstanden, zeigt. Es wurde auch hier der LMW-Marker aufgetragen. Es ist gut zu erkennen, dass die Eluatfraktionen eine Bande auf Höhe von ca. 30 kDa aufweisen. Diese zusätzliche Proteinbande entsteht erst nach Induktion.

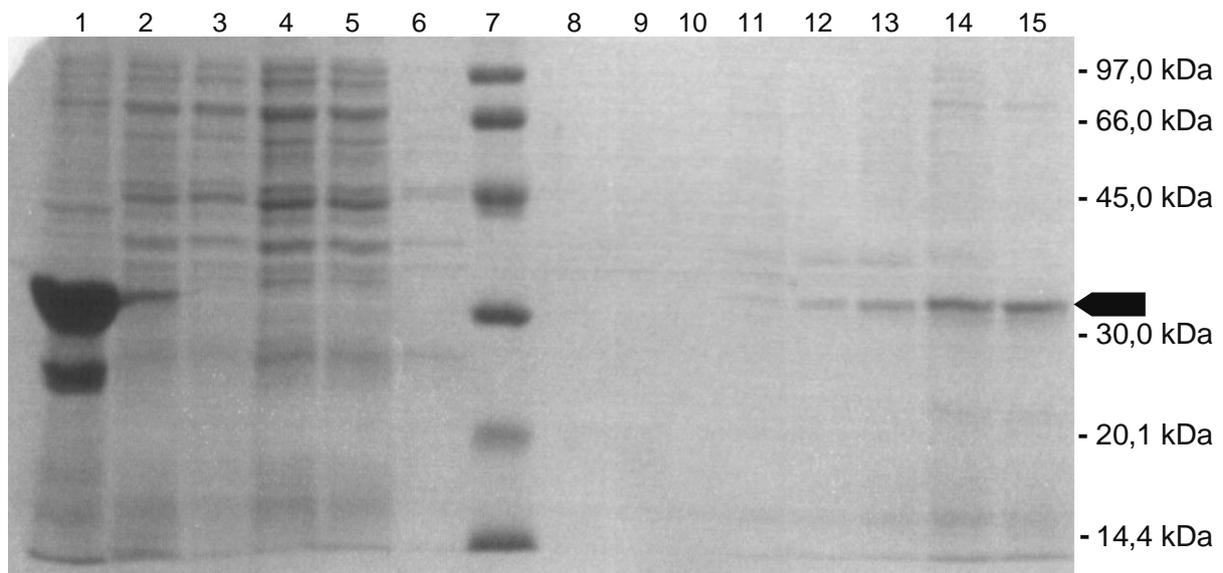


Abbildung 5-9: Analytische SDS-PAGE nach Aufreinigung der EhIPK-1 mit einer P11-Phosphocellulose-Säule: Die Spuren sind durchnummeriert: 1: Pellet-Probe; 2: Lyse-Probe; 3: Waschfraktion 1; 4: Waschfraktion 2; 5: Waschfraktion 3; 6: Waschfraktion 4; 7: LMW; 8: Eluatfraktion 1; 9: Eluatfraktion 2; 10: Eluatfraktion 3; 11: Eluatfraktion 4; 12: Eluatfraktion 5; 13: Eluatfraktion 6; 14: Eluatfraktion 7; 15: Eluatfraktion 8; Der Pfeil zeigt das aufgereinigte Protein.

Wie die späteren enzymologischen Analysen ergaben, handelt es sich bei dem Protein tatsächlich um die EhIPK-1, die nach den Waschschrritten nun stark angereichert in den einzelnen Eluatfraktionen vorliegt. Durch die sehr prominente Bande auf Höhe von 30 kDa kann man sehr gut sehen, dass die Überexpression des Proteins in größeren Mengen erfolgreich war.

5.4.2 Aufkonzentrierung der EhIPK-1 mit der DEAE-Sephacel-Säule

Um das Protein stärker zu konzentrieren, wurden die einzelnen Eluatfraktionen der P11-Phosphocellulose-Säule an eine DEAE-Sephacel-Säule gebunden und mit geringem Volumen eines Desorptionspuffers eluiert (siehe Kapitel 4.3.3.3). Es handelt sich hierbei um eine Anionenaustauschermatrix, die neben einer Aufkonzentrierung der Eluate auch eine weitere Reinigung der IPK ermöglichte. 1 ml Matrix wurde hierfür in eine Säule mit einem Durchmesser von 1 cm gegeben und mit DEAE-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde eine entsprechende P11-Fraktion über die Säule gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit DEAE-Puffer wurde mit DEAE-Elutionspuffer eluiert. Die Reinheit der Proben ist in Abbildung 5-10 dargestellt.

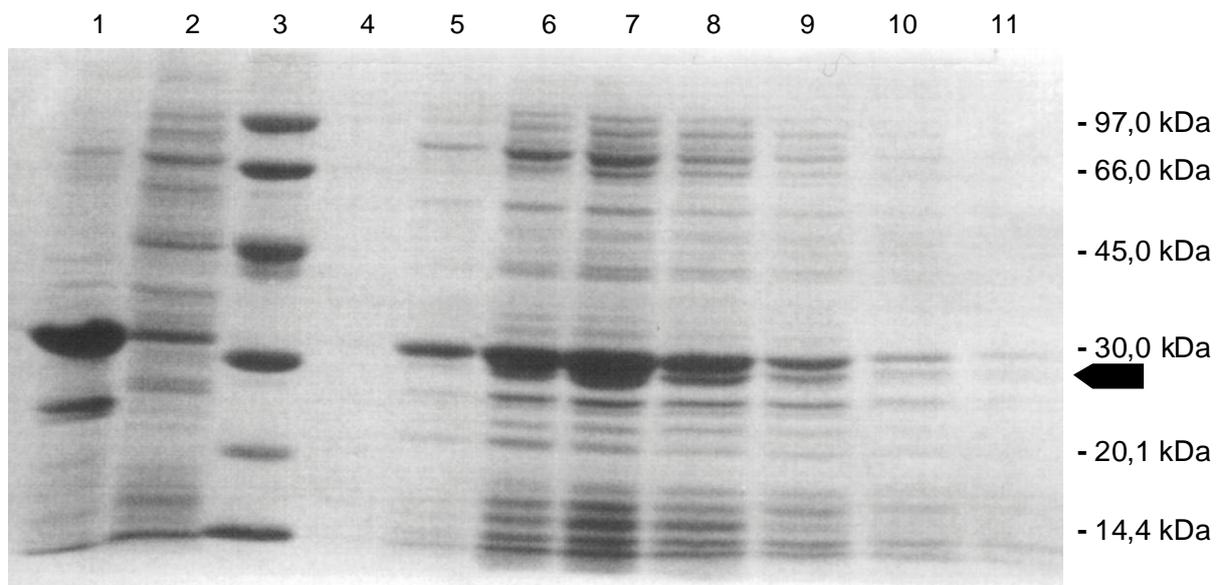


Abbildung 5-10: Analytische SDS-PAGE nach Aufkonzentrierung der EhIPK-1 mit einer DEAE-Sephacel-Säule: Nummerierung der Spuren: 1: Pellet-Probe; 2: Lysat-Probe; 3: LMW; 4: Eluatfraktion 1; 5: Eluatfraktion 2; 6: Eluatfraktion 3; 7: Eluatfraktion 4; 8: Eluatfraktion 5; 9: Eluatfraktion 6; 10: Eluatfraktion 7; 11: Eluatfraktion 8; Der Pfeil zeigt das überexprimierte Protein auf Höhe der 30 kDa-Bande.

Auf Höhe von 30 kDa ist eine sehr ausgeprägte Bande (v.a. Spur 7) zu sehen, die durch die Konzentrierung der Eluatfraktionen der P11-Phosphocellulose-Säule verstärkt wurde und die EhIPK-1 darstellt.

5.5 Enzymkinetik

Enzym-Substrat-Affinitäten und Umsatzraten von Substraten werden durch Parameter wie den K_M - und v_{max} -Wert bestimmt:

Die Bestimmung des K_M - und v_{max} -Werts erfolgt durch die Erstellung einer Substratsättigungskurve (siehe Abbildung 5-11). Hierbei wird auf der Abszisse die Substratkonzentration, auf der Ordinate die Reaktionsgeschwindigkeit aufgetragen. Die entstehende Funktion nähert sich einer Asymptote an.

Diese Asymptote entspricht rechnerisch der **maximalen Reaktionsgeschwindigkeit** [v_{max}]. Der v_{max} -Wert wird erreicht, sobald alle Moleküle des untersuchten Enzyms mit Substrat gesättigt sind. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich das Substrat im Überschuss, wodurch das Enzym für die Reaktion geschwindigkeitsbestimmend ist.

Die **Michaelis-Menten-Konstante** [K_M], die auch aus dem Diagramm abgelesen werden kann, gibt die Substratkonzentration an, die bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit vorliegt.

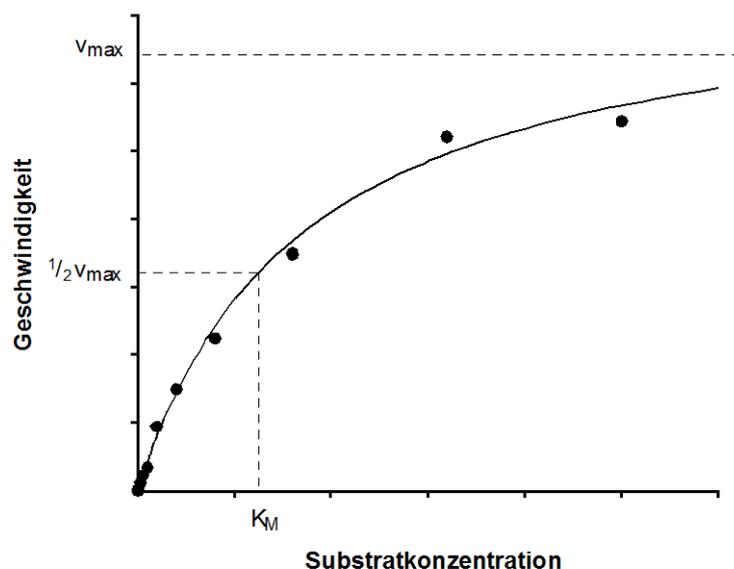


Abbildung 5-11: Beispiel einer Substratsättigungskurve

Die exprimierte, angereicherte und konzentrierte EhIPK-1 wurde einer entsprechenden enzymologischen Charakterisierung unterzogen. Neben der Messung des K_M -Werts für das angenommene Hauptsubstrat $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ und des K_M -Werts für ATP wurde in einer ersten Versuchsreihe bei bestimmten Substratkonzentrationen die Substratelektivität der EhIPK-1 untersucht. Es war aufgrund zu niedriger spezifischer Aktivität des partiell gereinigten Enzyms nicht möglich, die Enzymaktivität im Photometer mit Hilfe eines gekoppelten enzymatisch-optischen Tests ([Bertsch et al., 1999], [Bertsch et al., 2000]) zu untersuchen. Alternativ wurden die Analysen mit der MDD-HPLC durchgeführt.

5.5.1 Vorversuche zum Ermitteln der optimalen Umgebungsvariablen für die EhIPK-1

Wie bereits in Kapitel 5.1 besprochen, konnte schon vor Expression der IPKs eine erste Hypothese aufgestellt werden, um welche Art von Inositolphosphatkinase es sich möglicherweise handelt. Nach Datenbankanalysen und Alignments konnten spezifische tierische Consensus-Motive für IPMK-, IP3K- und IP6K-Isoformen ermittelt werden. Bestimmte Consensus-Motive treten bei spezifischen Inositolphosphatkinasen auf und erfüllen, lokalisiert im Bereich der katalytischen Domäne, wichtige Aufgaben bezüglich Strukturstabilisierung des Proteins und damit erst möglicher Bindung von Reaktionsteilnehmern (Substrat, ATP, etc.; siehe Kapitel 5.1)

Vorversuche, bei denen der optimale pH-Wert des Enzyms als auch andere Parameter wie die $MgCl_2$ -, Hepes-Puffer-, und KCl-Konzentrationen optimiert wurden, ergaben die optimalen Inkubationsbedingungen für das Enzym bei Verwendung von **20 mM Hepes (pH 6,9), 5 mM $MgCl_2$, 30 mM KCl und 1,0 mM DTT**. Entsprechend enthielt der in Kapitel 4.3.7.1 beschriebene Assaypuffer standardmäßig diese Endkonzentrationen an Puffer, Ionen und DTT. Diese Standardpufferbedingungen fanden bei den meisten Experimenten Anwendung.

Die Aktivität des Enzyms wurde für die Optimierung des pH-Werts des Assays zwischen pH 6,5 und pH 7,8 genauer untersucht. Die Auswertung ergab, dass das Enzym im pH-Bereich von 6,9 die höchste Aktivität zeigte. Daraufhin wurden alle weiteren Assays bei diesem pH-Wert durchgeführt. Die für das Enzym optimalen $Ins(1,4,5)P_3$ - und ATP-Konzentrationen wurden anhand der K_M -Wert-Bestimmungen in Kapitel 5.5.2 und Kapitel 5.5.3 ermittelt.

5.5.2 K_M -Wert-Bestimmung für das vermutete Hauptsubstrat $Ins(1,4,5)P_3$

Die K_M -Wertbestimmung für $Ins(1,4,5)P_3$ erfolgte unter Standardpufferbedingungen und einer eingesetzten ATP-Konzentration von 1 mM. Die Assaykonzentrationen von $Ins(1,4,5)P_3$ in den Ansätzen waren 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 und 100 μM . Die Ansatzvolumina variierten zwischen 240 und 1920 μl bei einer Enzymkonzentration von ca. 9,4 $\mu g / ml$. Es erfolgte eine kinetische Vierpunktbestimmung: Aliquots aus dem Reaktionsansatz wurden nach 0, 30, 60 und 90 min entnommen und mittels MDD-HPLC analysiert (siehe Kapitel 4.3.7). Die Auswertung erfolgte hier anhand der nach 30 min entnommenen Proben (siehe Abbildung 5-12), da in Auswertungen ersichtlich wurde, dass der Substratumsatz des Enzyms innerhalb der ersten 30 min am höchsten war und im weiteren Verlauf ein Rückgang der Aktivität des Enzyms durch stärkeren Substratverbrauch als 30 % feststellbar war.

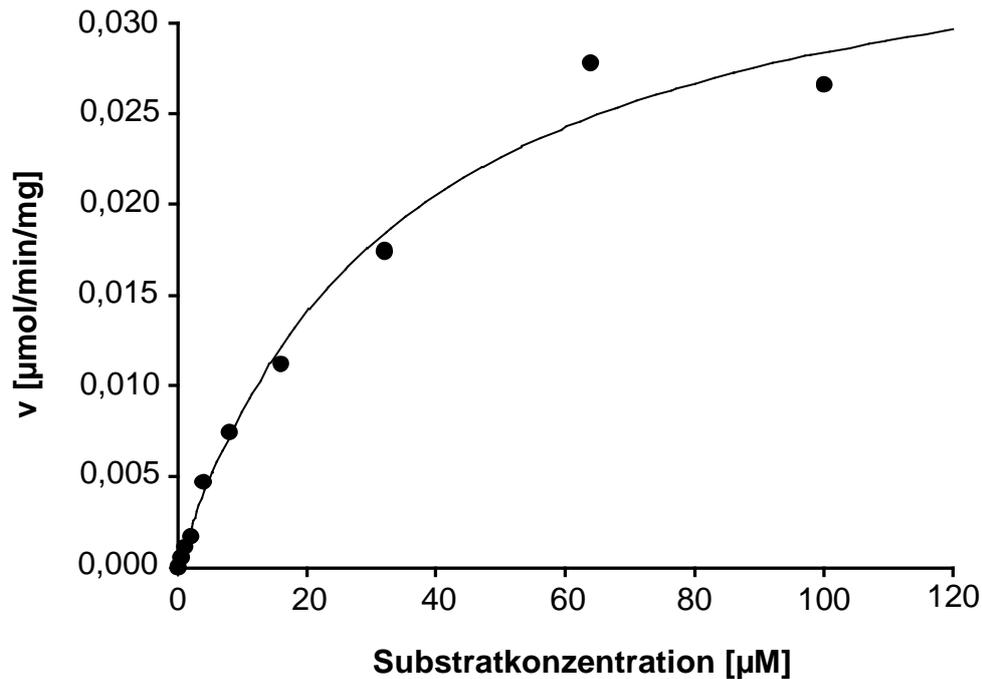


Abbildung 5-12: K_M -Wert-Bestimmung für das vermutete Hauptsubstrat $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ nach einer Inkubationsphase von 30 min nach Michaelis Menten und einer Enzymkonzentration von ca. $9,4 \mu\text{g} / \text{ml}$

Es ergab sich ein K_M -Wert für $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ von **ca. $34,3 \mu\text{M}$** . Hierbei handelt es sich, verglichen mit anderen IPKs, um den höchsten K_M -Wert für $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, der in Kapitel 6 der Arbeit diskutiert wird. Der v_{\max} -Wert errechnete sich mit **$0,038 \mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$** .

Abbildung 5-13 zeigt eine Bestimmung der Aktivität des Enzyms über die Zeit bei einer initialen $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Konzentration von $50 \mu\text{M}$ (siehe auch Kapitel 5.7). Das Experiment erfolgte ebenfalls unter Standardpufferbedingungen bei einer Enzymkonzentration von ca. $9,4 \mu\text{g} / \text{ml}$ und einem Assayvolumen von $160 \mu\text{l}$. Die maximale Geschwindigkeit (v_{\max}) wurde zum Zeitpunkt 30 min mit **$0,022 \mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$** ermittelt. Es ist davon auszugehen, dass der v_{\max} -Wert größer ist als bestimmt, da die Aktivität des Enzyms über die Zeit stark abnimmt (siehe auch Kapitel 5.7).

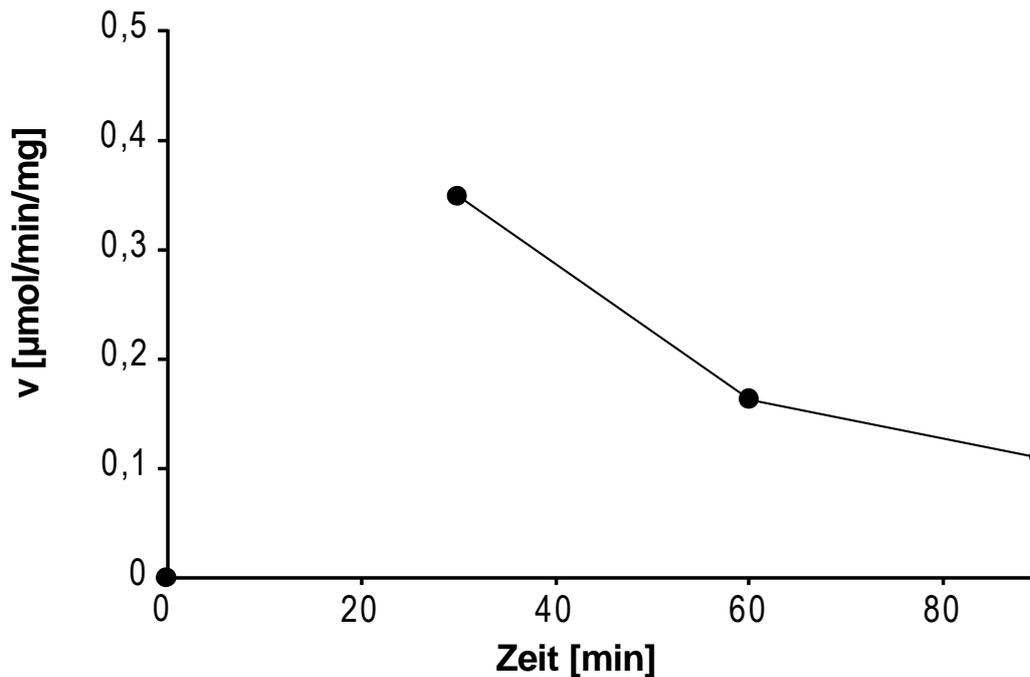


Abbildung 5-13: Bestimmung der Umsatzgeschwindigkeit über die Zeit bei zunehmendem Verbrauch von initial $50 \mu\text{M}$ Substrat und einer Enzymkonzentration von ca. $9,4 \mu\text{g} / \text{ml}$

5.5.3 K_M -Wert-Bestimmung für ATP

Bei diesem Experiment wurden neben den Standardpufferbedingungen innerhalb der Ansätze $50 \mu\text{M}$ InsP_3 und ATP-Konzentrationen von 0, 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6 und $3,2 \text{ mM}$ eingesetzt. Die Enzymkonzentration betrug $9,4 \mu\text{g} / \text{ml}$ bei einem Assayvolumen von $160 \mu\text{l}$. Es wurde eine kinetische Vierpunktbestimmung, wie in Kapitel 5.5.2 beschrieben, durchgeführt. Proben wurden nach 0, 30, 60 und 90 min entnommen. Die Auswertung erfolgte wie in Kapitel 5.5.2 anhand der 30-Minuten-Werte (siehe Abbildung 5-14). Der nach Michaelis Menten errechnete K_M -Wert für ATP lag bei **$0,059 \text{ mM}$** . Der ebenfalls aus der Bestimmung abzuleitende v_{max} -Wert errechnete sich mit **$0,034 \mu\text{M} / \text{min} / \text{mg}$** . Wie in der Abbildung zu sehen, findet bei ATP-Konzentrationen von mehr als $1,6 \mu\text{M}$ eine leichte Hemmung der Aktivität des Enzyms statt. Da während des Experiments mit ansteigender ATP-Konzentration nicht die Mg^{2+} -Konzentration erhöht wurde, ist die in Abbildung 5-14 auftretende Hemmung der Aktivität des Enzyms vermutlich auf eine Zunahme der Konzentration von nicht Mg^{2+} -komplexiertem freiem ATP zurückzuführen.

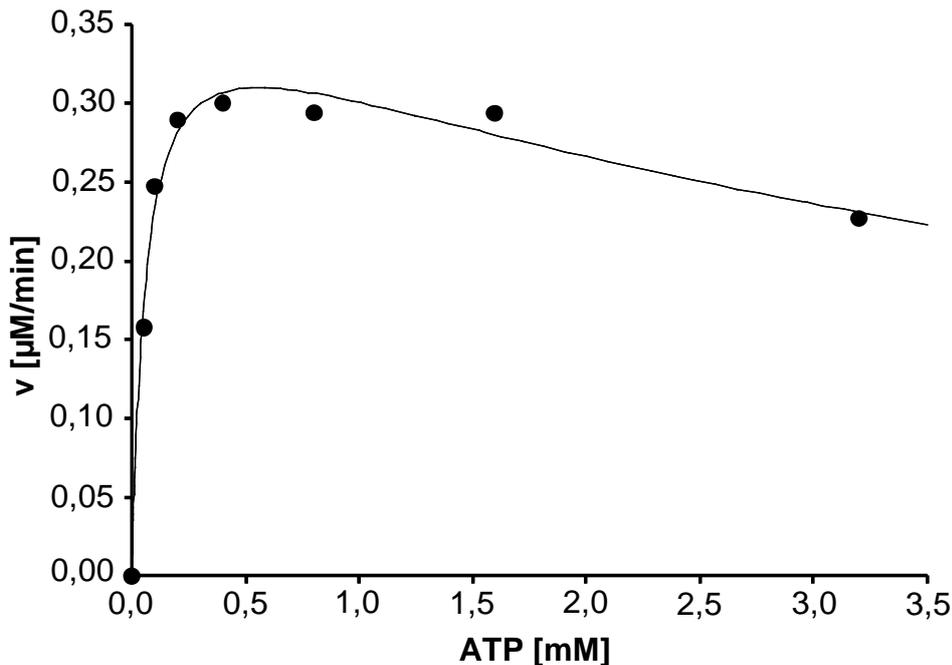


Abbildung 5-14: Bestimmung des K_M -Werts für ATP sowie des v_{max} -Werts der EhIPK-1 bei unterschiedlichen ATP-Konzentrationen, einer Enzymkonzentration von ca. 9,4 $\mu\text{g} / \text{ml}$ und einer Inkubationsphase von 30 min nach Michaelis Menten

5.6 Substratselektivität der EhIPK-1

5.6.1 Umsetzung unterschiedlicher Substrate durch EhIPK-1

Im Rahmen der Charakterisierung der EhIPK-1 wurde neben dem v_{max} -Wert und verschiedener K_M -Werte ebenfalls die Substratselektivität für verschiedene InsP_x -Isomere untersucht. Neben dem vermuteten Hauptsubstrat $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ wurden zahlreiche andere Inositolphosphatisomere als Substrat eingesetzt und die entstandenen Produkte per MDD-HPLC bestimmt. Bei den getesteten Substraten handelt es sich um InsP_3 - ($\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, $\text{Ins}(2,4,5)\text{P}_3$, $\text{Ins}(1,4,6)\text{P}_3$), InsP_4 - ($\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$, $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$, $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$, $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$) und InsP_5 -Isomere ($\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$, $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$, $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$, $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$). Zusätzlich wurde InsP_6 eingesetzt. Als Produkte konnten neben normalen Inositolphosphaten auch PP- InsP -Isomere identifiziert werden. Deren Struktur ließ sich bis auf wenige Ausnahmen nicht präzise zuordnen, da keine entsprechenden Standards zur Verfügung standen. Es wird an den entsprechenden Stellen in den Kapiteln auf die PP- InsP -Isomere eingegangen, die mit römischen Ziffern (I – VI) durchnummeriert wurden. Die Beschriftung orientierte sich an den Retentionszeiten der PP- InsP -Isomere: Früheluiierende PP- InsP -Isomere erhielten kleine, späteluiierende PP- InsP -Isomere höhere Ziffern. PP- InsP -Isomere, die den gleichen Elutionszeitpunkt hatten, wurden zusätzlich mit Kleinbuchstaben versehen.

Im Rahmen der Substratuntersuchungen wurden durch die MDD-HPLC-Analyse dieselben Zwischenprodukte von sequentiellen Phosphorylierungen an mehr als einer Stelle des

Substrats identifiziert. In den folgenden Kapiteln findet soweit möglich eine isomeren genaue Eingliederung der unterschiedlichen Phosphorylierungsreaktionen statt. Um Übersichtlichkeit gewährleisten zu können, werden bei den Substratselektivitätsstudien immer alle Produkte und Phosphorylierungsschritte angegeben. Dadurch ist es möglich, dass sich Metabolisierungsschritte in den einzelnen Kapiteln wiederholen. Bei den in den einzelnen Kapiteln aufgezeigten Reaktionsschemata handelt es sich um Modellvorschläge, die sich an den bisherigen Daten orientieren.

In den folgenden Abbildungen sind Chromatogramme der Proben in Superposition zu sehen, die durch das Hinzuaddieren von Absorption erzeugt wurden. Neben den entnommenen Proben ist eine Leersubstrataufnahme (Substratprobe) in den Abbildungen gezeigt. Außerdem ist das MDD-HPLC-Chromatogramm einer Standardmischung, die InsP_x enthält und es ermöglicht, die entstandenen Inositolphosphate anhand der Retentionszeit zu identifizieren, abgebildet.

Nahezu alle Versuche fanden unter Standardbedingungen mit 1 mM ATP und 10 μM des jeweiligen Substrats statt. Die Inkubation der Proben erfolgte zu den in den Kapiteln angegebenen Bedingungen (siehe Bildunterschriften). Die Enzymkonzentration in den Ansätzen lag bei ca. 5,2 bzw. 9,4 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Die Ansatzvolumina betragen 480 bzw. 160 μl . Bei Abweichungen wird im Text weiter unten darauf eingegangen.

Im Laufe der Arbeit zeigte sich, dass die EhIPK-1 auch in der Lage war, höher phosphorylierte Inositolphosphate als InsP_6 zu bilden. Aus diesem Grunde wurde der Gradient der MDD-HPLC angepasst: Während alle getesteten InsP_3 - und InsP_4 -Isomere mit dem selben Gradienten getestet wurden, wurde für die InsP_5 -Substrate ein Gradient verwendet, der eine genaue Unterscheidung der generierten Produkte (größtenteils PP- InsP_4 - und PP₂- InsP_3 -Isomere) ermöglichte. Die Elutionszeitpunkte gleicher Produkte unter Verwendung der unterschiedlichen Gradienten weichen aus diesem Grunde in den Chromatogrammen ab.

5.6.1.1 Umsetzung von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ durch EhIPK-1

Das Substrat war mit ca. 10 % $\text{Ins}(2,4,5)\text{P}_3$ verunreinigt. Abbildung 5-15 zeigt die entstandenen MDD-HPLC-Chromatogramme der vorhandenen und gebildeten Inositolphosphate.

Wie der Abbildung 5-15 zu entnehmen, entstehen bei der Inkubation der EhIPK-1 mit $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ nach 90 min eine Reihe von Produkten. Neben dem InsP_4 -Produkt $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ entsteht auch $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$, etwas $\text{Ins}(1,2,4,5)\text{P}_4$ sowie als zweifaches Phosphorylierungsprodukt $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ als auch eine kleine Menge $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$. Dies erinnert an die katalytischen Schritte bekannter IPMKs. Es kommt also bei der EhIPK-1 unter Einsatz von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ zunächst einmal zu einer Phosphorylierung von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ zu

Ins(1,3,4,5)P₄ und Ins(1,4,5,6)P₄. Somit scheint das Enzym sowohl 3-OH-Kinase- als auch 6-OH-Kinase-Aktivität für Ins(1,4,5)P₃ zu besitzen.

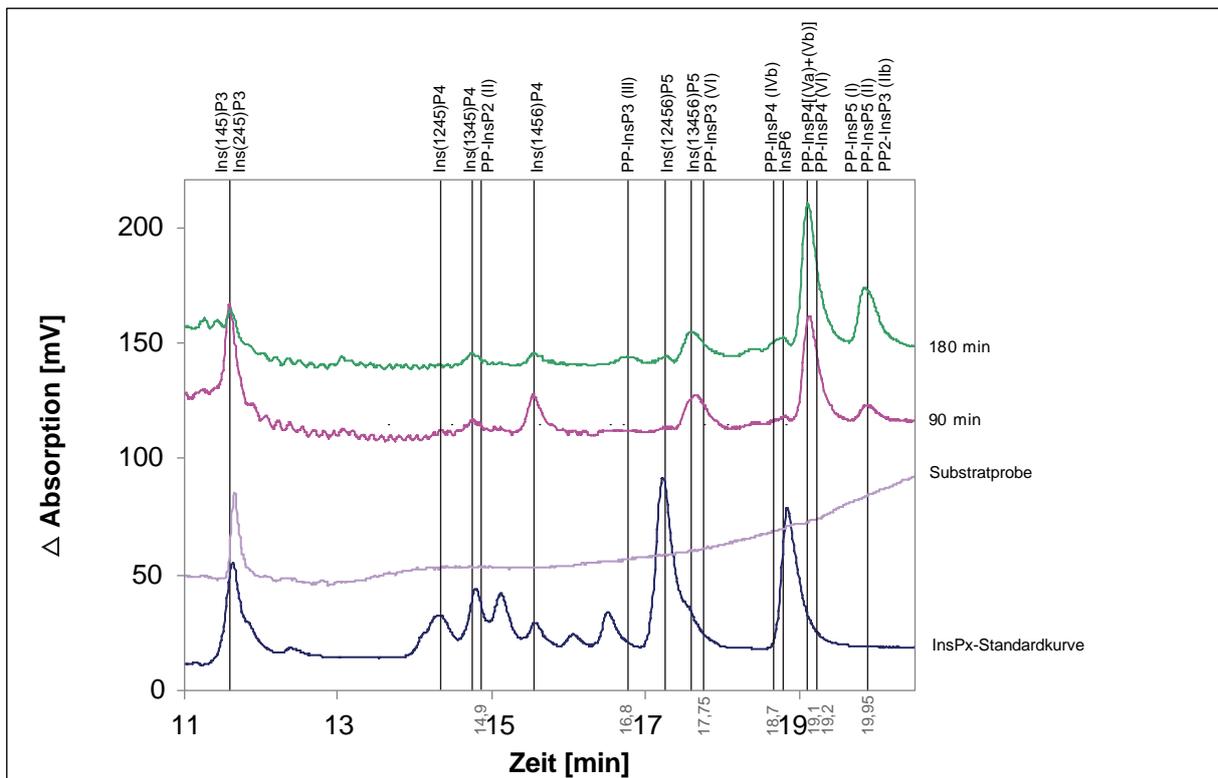


Abbildung 5-15: MDD-HPLC-Chromatogramme nach 0 min, 90 min und 180 min mit 10 μM Ins(1,4,5)P₃ unter Standardbedingungen mit 1,0 mM ATP. Die Enzymkonzentration betrug 9,4 $\mu\text{g} / \text{ml}$ bei einer Ansatzgröße von 160 μl .

Die entstandenen dominierenden InsP₄-Produkte werden in einem weiteren durch das Enzym katalysierten Phosphorylierungsschritt zu Ins(1,3,4,5,6)P₅ konvertiert, indem eine Phosphorylierung von Ins(1,3,4,5)P₄ und Ins(1,4,5,6)P₄ an der jeweils noch nicht besetzten 6- bzw. 3-Position erfolgt. Die unterschiedlichen Phosphorylierungsschritte sind in Abbildung 5-16 graphisch dargestellt. Bei dem in Abbildung 5-16 gezeigten Reaktionsmechanismus handelt es sich möglicherweise um den Hauptreaktionsweg der EhIPK-1. Die EhIPK-1 scheint also eine IPMK zu sein.

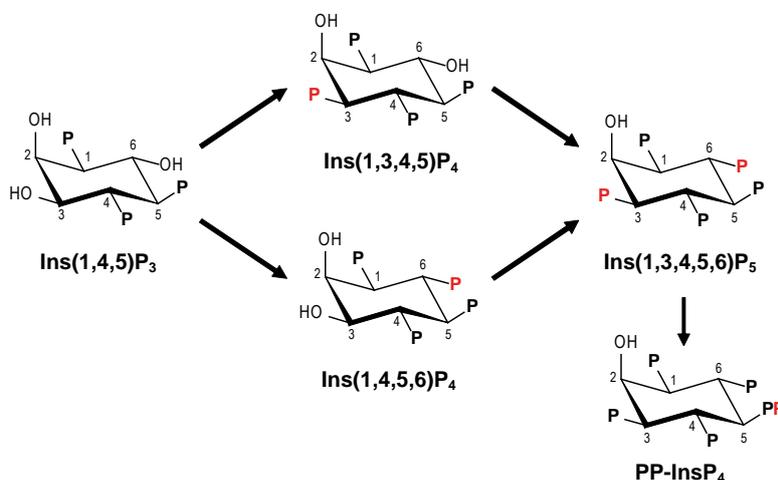


Abbildung 5-16: Vermutete Hauptreaktionswege der Phosphorylierung von Ins(1,4,5)P₃ durch EhIPK-1

Während der Reaktion wird in sehr kleinen Mengen auch $\text{Ins}(1,2,4,5)\text{P}_4$, das aus dem substratkontaminierenden (ca. 10 %) $\text{Ins}(2,4,5)\text{P}_3$ entsteht, gebildet (vgl. auch Kapitel 5.6.1.2). Den MDD-HPLC-Chromatogrammen ist weiter zu entnehmen, dass beim Umsatz von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ auch InsP_6 als Produkt generiert wird. Tierische IPMKs sind in der Lage, aus $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$ durch 3-Phosphorylierung InsP_6 zu generieren, weshalb auch hier dieser Weg zu InsP_6 angenommen wird: $\text{Ins}(1,2,4,5)\text{P}_4$ wird an der 6-OH-Gruppe zu kleinen Mengen $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$ phosphoryliert, bevor es zu InsP_6 konvertiert wird (siehe Abbildung 5-15 und Abbildung 5-19). Neben den erläuterten Produkten entstehen zusätzlich als Produkte mit 6 Phosphaten vier PP- InsP_4 -Isomere [(IVb) + (Va) + (Vb) + (VI)], zwei PP- InsP_3 -Isomere [(III) + (VI)] (siehe Kapitel 5.6.1.4) sowie aus InsP_6 generiertes PP- InsP_5 [(I) + (II)], das in den folgenden Kapiteln (siehe v.a. Kapitel 5.6.1.12) wieder auftaucht. Auch ein vermutetes PP- InsP_2 (II) wird durch Pyrophosphorylierung aus $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ gebildet. Nach jetziger Datenlage wird außerdem aus PP- InsP_4 (VI) $\text{PP}_2\text{-InsP}_3$ (IIb) gebildet. Auf das detektierte PP- InsP_3 (III) und PP- InsP_3 (VI) wird in Kapitel 5.6.1.4 eingegangen, da sie von zunächst gebildeten InsP_4 -Isomeren abstammen müssen.

Wie spätere Analysen zeigen werden (vgl. Kapitel 5.6.1.8), wird $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ zu insgesamt drei PP- InsP_4 -Isomeren [(Va) + (Vb) + (VI)] phosphoryliert. PP- InsP_4 (IVb) wird aus $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$ gebildet (siehe Kapitel 5.6.1.9). Zur Entstehung von pyrophosphorylierten Produkten und Strukturanalysen siehe auch Kapitel 6.4.

Abbildung 5-17 zeigt schematisch die soeben besprochenen Hauptreaktionen ausgehend von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ auf:

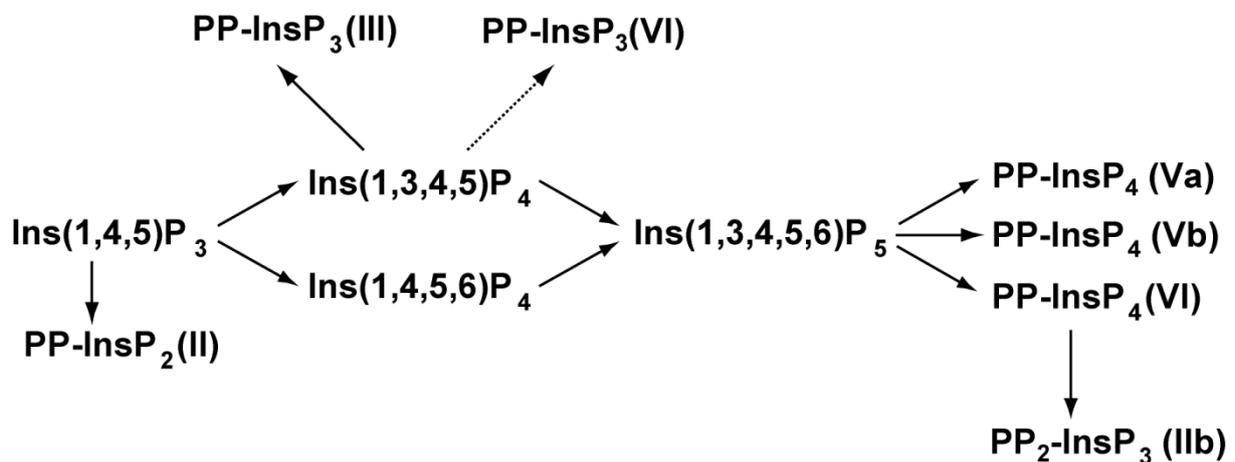
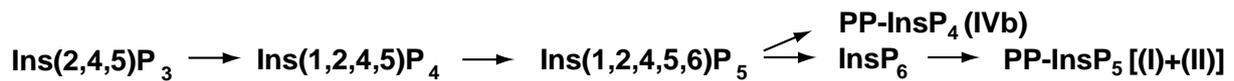


Abbildung 5-17: Umsetzung von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ durch EhIPK-1

Die Nebenreaktionen (Produktentstehung < 5 %) sind durch gestrichelte „Reaktionspfeile“ dargestellt.

In Abbildung 5-18 wird die geschilderte Nebenreaktion, hervorgerufen durch die Verunreinigung mit $\text{Ins}(2,4,5)\text{P}_3$, erläutert (vgl. Kapitel 5.6.1.2). Hierbei sind nur die Phosphorylierungsschritte angegeben, die für dieses Kapitel relevant sind (vgl. auch Abbildung 5-20):

Abbildung 5-18: Umsetzung von $\text{Ins}(2,4,5)\text{P}_3$ durch EhIPK-1

5.6.1.2 Umsetzung von $\text{Ins}(2,4,5)\text{P}_3$ durch EhIPK-1

Bei diesem Experiment wurden $20 \mu\text{M}$ $\text{Ins}(2,4,5)\text{P}_3$ eingesetzt. Das Substrat war mit einer Spur $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ kontaminiert. Abbildung 5-19 zeigt die entsprechenden MDD-HPLC-Chromatogramme.

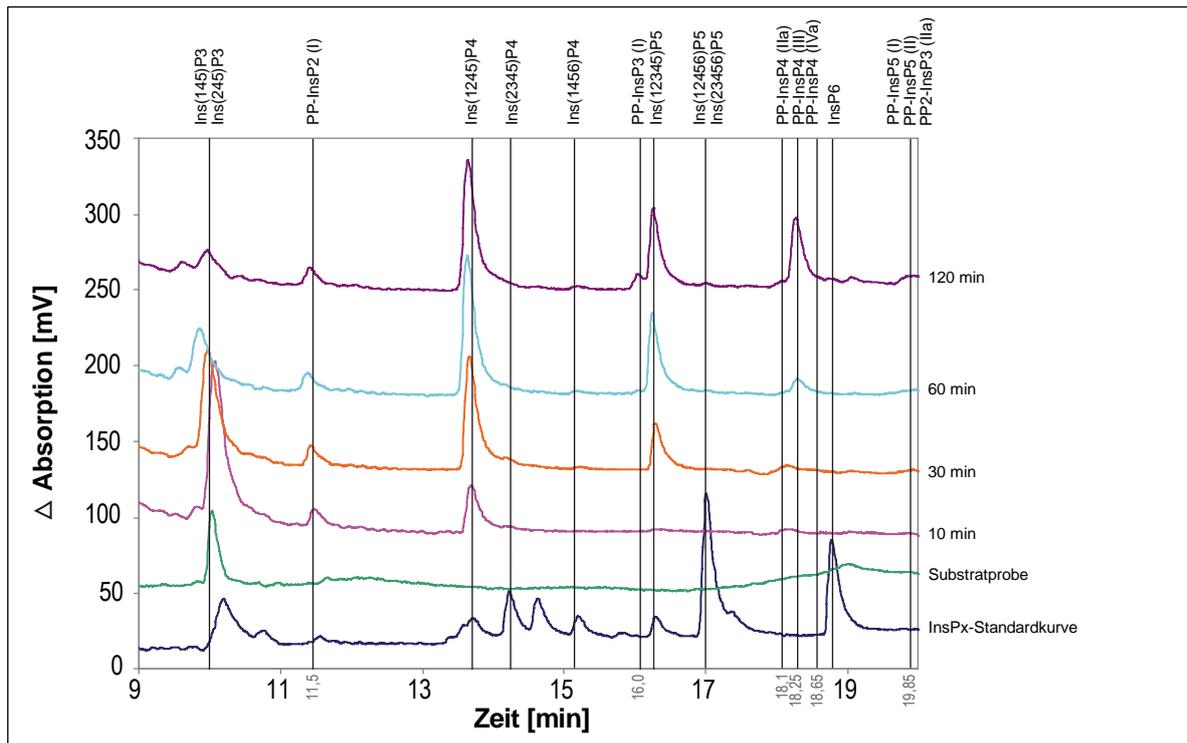
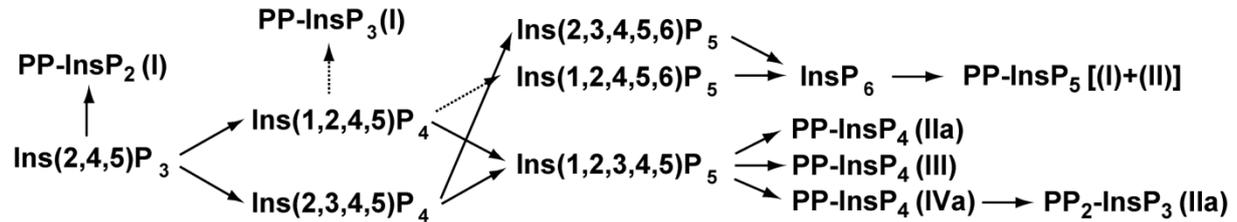


Abbildung 5-19: MDD-HPLC-Chromatogramme nach 0 min, 10 min, 30 min, 60 min und 120 min mit $20 \mu\text{M}$ $\text{Ins}(2,4,5)\text{P}_3$ unter Standardbedingungen mit 1 mM ATP. Die Enzymkonzentration betrug $5,2 \mu\text{g} / \text{ml}$ bei einer Ansatzgröße von $480 \mu\text{l}$.

$\text{Ins}(2,4,5)\text{P}_3$ wird durch 3-Phosphorylierung zu sehr wenig $\text{Ins}(2,3,4,5)\text{P}_4$ phosphoryliert. Hauptprodukt der $\text{Ins}(2,4,5)\text{P}_3$ -Phosphorylierung ist $\text{Ins}(1,2,4,5)\text{P}_4$. Diese Produkte oder eines hiervon werden zu $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$, $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ und geringen Mengen $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$ weiter phosphoryliert. Das über die Zeit zunehmende Produkt nahe dem Elutionszeitpunkt $\text{Ins}(4,5,6)\text{P}_3$ ist vermutlich ein aus $\text{Ins}(2,4,5)\text{P}_3$ entstehendes PP-InsP_2 (I). Die entstandenen PP-InsP_4 -Isomere [(IIa) + (III) + (IVa)] können nur aus dem vorhandenen $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ hervorgegangen sein. PP-InsP_3 (I) scheint von $\text{Ins}(1,2,4,5)\text{P}_4$ abgeleitet zu sein, da nur dieses InsP_4 in größeren Mengen während des Experiments als Produkt auftrat. Das in der Abbildung zu sehende $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ wird aus $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, das als Verunreinigung in geringer Menge vorlag, gebildet (siehe Kapitel 5.6.1.1). Außerdem wird PP-InsP_5 [(I) + (II)] generiert, das aus InsP_6 entsteht. InsP_6 hingegen wird durch 1- bzw. 3-Phosphorylierung aus $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ und $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$ gebildet. Das ebenfalls in der

Abbildung angegebene $PP_2\text{-InsP}_3$ (IIa) wird, wie später noch in Kapitel 5.6.1.10 gezeigt, aus $PP\text{-InsP}_4$ (IVa) gebildet.

In Abbildung 5-20 sind die angesprochenen Phosphorylierungen schematisch zusammengefasst:



Spuren von $Ins(1,4,5)P_3 \rightarrow Ins(1,4,5,6)P_4$

Abbildung 5-20: Umsetzung von $Ins(2,4,5)P_3$ / $Ins(1,4,5)P_3$ durch EhIPK-1

Die Nebenreaktionen (Produktentstehung < 5 %) sind durch gestrichelte „Reaktionspfeile“ dargestellt.

5.6.1.3 Umsetzung von $Ins(1,4,6)P_3$ durch EhIPK-1

Neben $Ins(1,4,5)P_3$ wurde auch $Ins(1,4,6)P_3$ für die EhIPK-1 untersucht. Der Test erfolgte unter Standardbedingungen mit $20 \mu\text{M}$ $Ins(1,4,6)P_3$. Die MDD-HPLC-Chromatogramme sind in Abbildung 5-21 gezeigt.

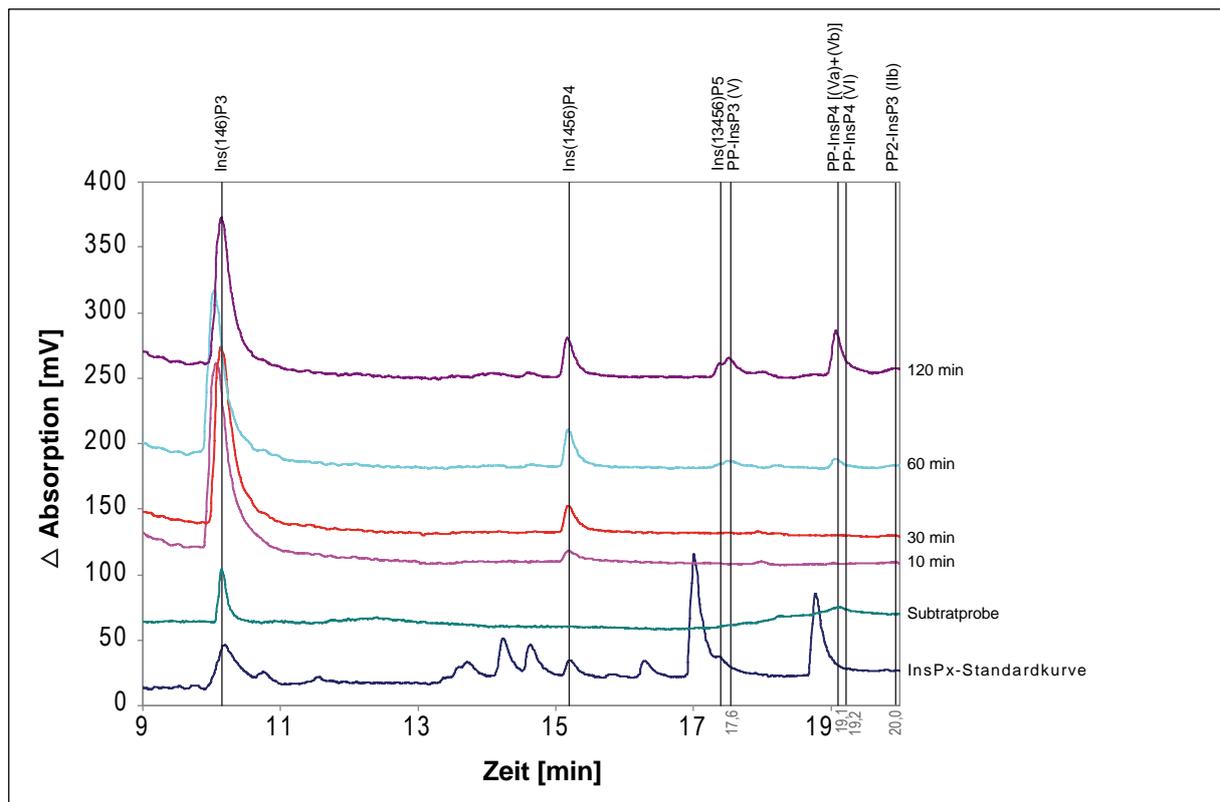


Abbildung 5-21: MDD-HPLC-Chromatogramme nach 0 min, 10 min, 30 min, 60 min und 120 min mit $20 \mu\text{M}$ $Ins(1,4,6)P_3$ unter Standardbedingungen mit 1 mM ATP. Die Enzymkonzentration betrug $5,2 \mu\text{g} / \text{ml}$ bei einer Ansatzgröße von $480 \mu\text{l}$.

Wie zu sehen, treten bei der HPLC-Analyse $Ins(1,4,5,6)P_4$, $Ins(1,3,4,5,6)P_5$ sowie ein weiteres $PP\text{-InsP}_3$ -Isomer (V), das aus dem einzigen detektierten $InsP_4$, $Ins(1,4,5,6)P_4$, hervorgegangen sein muss, auf. Es findet also eine sequentielle Phosphorylierung von

Ins(1,4,6)P₃ an 5- und 3-Position statt. Zusätzlich werden die bereits bekannten, aus Ins(1,3,4,5,6)P₅ entstehenden PP-InsP₄-Isomere [(Va) + (Vb) + (VI)] detektiert (vgl. Kapitel 5.6.1.8). Auch das aus PP-InsP₄ (VI) abgeleitete PP₂-InsP₃ (IIb) ist in der Abbildung 5-21 wiederzufinden.

Die folgende Abbildung 5-22 zeigt den für dieses Substrat postulierten Reaktionsweg der EhIPK-1 schematisch auf.

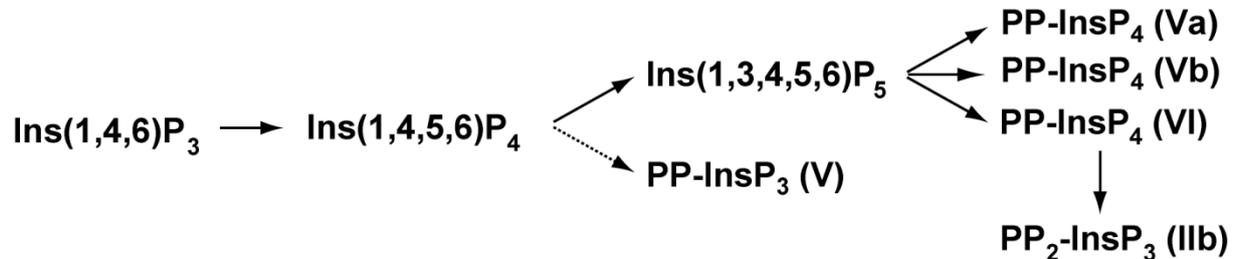


Abbildung 5-22: Umsetzung von Ins(1,4,6)P₃ durch EhIPK-1

Die Nebenreaktionen (Produktentstehung < 5 %) sind durch gestrichelte „Reaktionspfeile“ dargestellt.

5.6.1.4 Umsetzung von D/L-Ins(1,3,4,5)P₄ durch EhIPK-1

Die Substratlösung enthielt sowohl das D- als auch das L-Enantiomer. Durch die gegebenen Versuchsbedingungen war es nicht möglich, die D/L-Konformationen des Substrats zu unterscheiden. Abbildung 5-23 zeigt die MDD-HPLC-Chromatogramme der Proben.

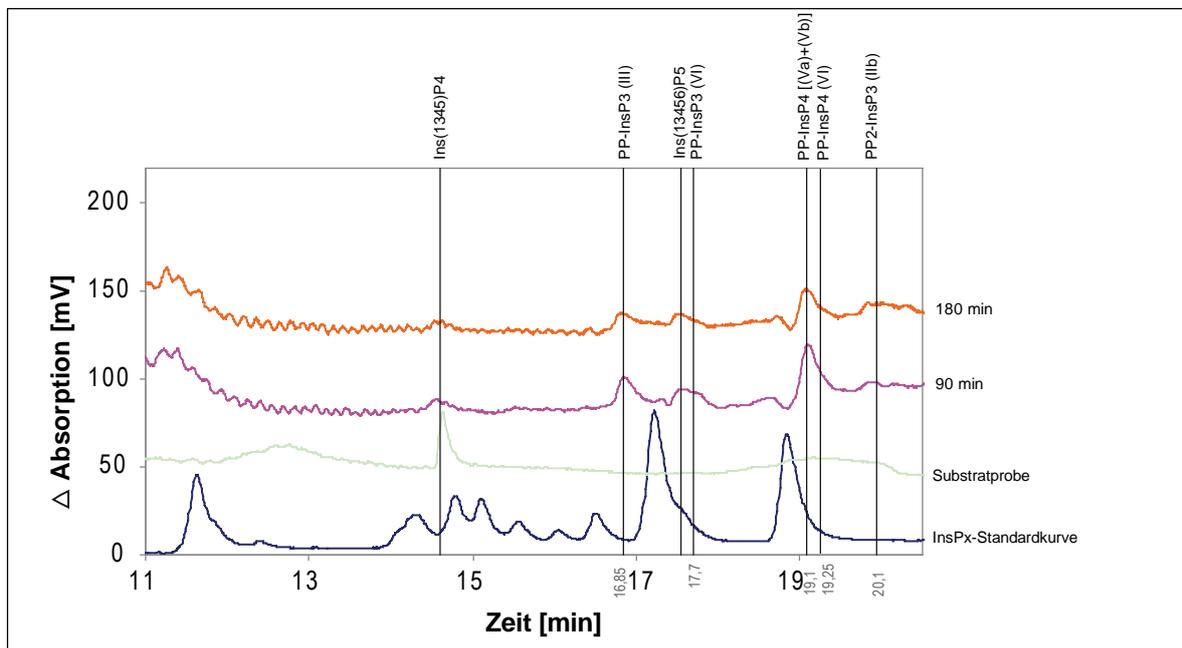


Abbildung 5-23: MDD-HPLC-Chromatogramme zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 min, 90 min und 180 min) mit 10 μM Ins(1,3,4,5)P₄ unter Standardbedingungen mit 1 mM ATP. Die Enzymkonzentration betrug 9,4 μg / ml bei einer Ansatzgröße von 160 μl.

Während des Reaktionszyklus entsteht aus Ins(1,3,4,5)P₄ durch einfache Phosphorylierung an Position 6 Ins(1,3,4,5,6)P₅. Wie in den Chromatogrammen in Abbildung 5-23 zu sehen, werden in größeren Mengen zwei PP-InsP₃-Isomere [(III) + (VI)] gebildet (vgl. Kapitel 5.6.1.1). PP-InsP₃ (III) eluiert vor, PP-Ins-P₃ (VI) eluiert nach Ins(1,3,4,5,6)P₅. Zusätzlich

entstehen die bekannten, aus $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ gebildeten Pyrophosphate PP-InsP_4 [(Va) + (Vb) + (VI)] und $\text{PP}_2\text{-InsP}_3$ (IIb). Abbildung 5-24 gibt noch einmal einen Überblick über die Phosphorylierungsschritte:

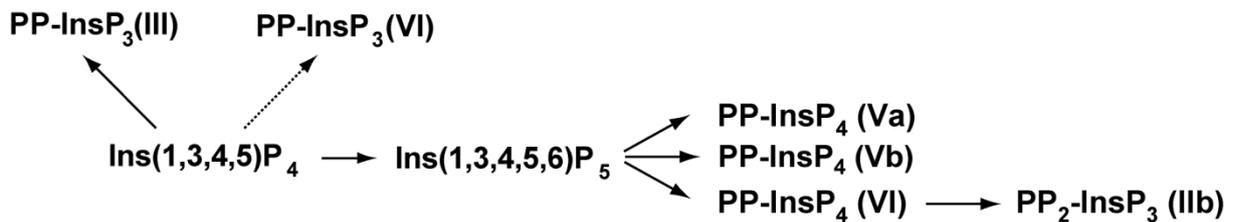


Abbildung 5-24: Umsetzung von $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ durch EhIPK-1

Die Nebenreaktionen (Produktentstehung < 5 %) sind durch gestrichelte „Reaktionspfeile“ dargestellt.

5.6.1.5 Umsetzung von $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ durch EhIPK-1

Dieses Substrat war mit ca. 20 % $\text{Ins}(2,4,5,6)\text{P}_4$ verunreinigt. Die zugehörigen MDD-HPLC-Chromatogramme nach Inkubation sind in Abbildung 5-25 zu sehen.

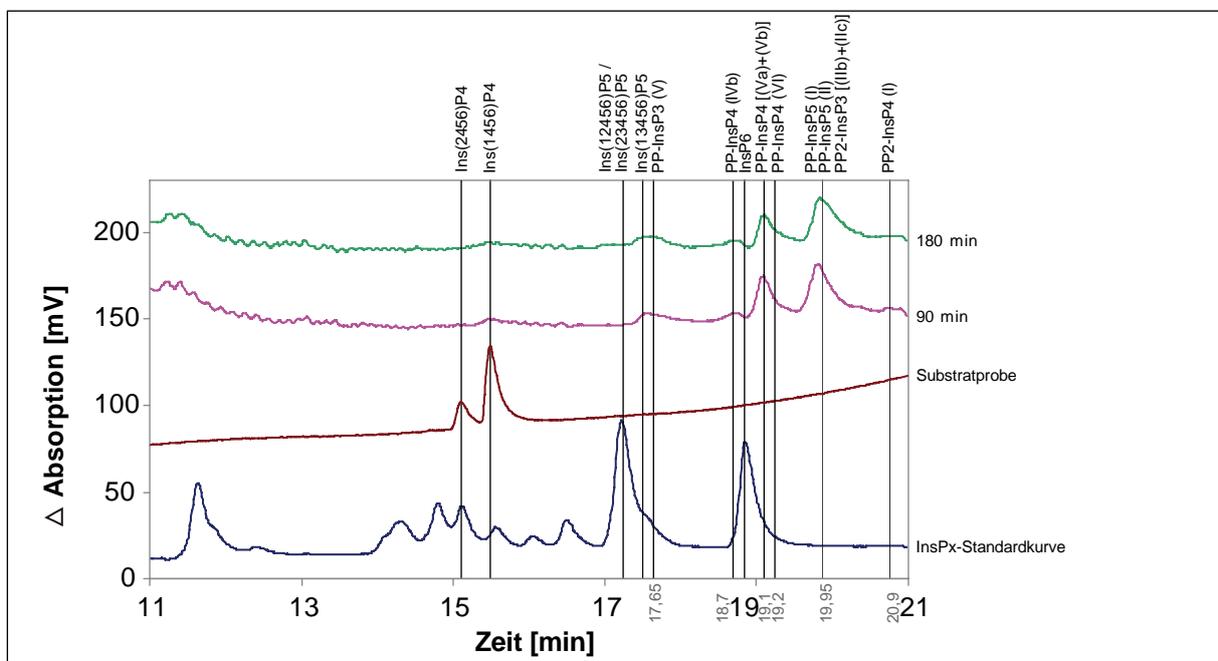


Abbildung 5-25: MDD-HPLC-Chromatogramme zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 min, 90 min und 180 min) mit 10 μM $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ unter Standardbedingungen mit 1 mM ATP. Die Enzymkonzentration betrug 9,4 μg / ml bei einer Ansatzgröße von 160 μl .

Die Umsetzung von $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ führt, wie in Abbildung 5-25 nachvollziehbar, zu kleineren Mengen $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$. Neben diesem Produkt wird $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ zu einem Pyrophosphat metabolisiert: $\text{PP-InsP}_3(\text{V})$, das in kleineren Mengen auftritt. Aus $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ entstehen die bekannten Pyrophosphorylierungsprodukte (siehe Abbildung 5-26). Zusätzlich entsteht aus $\text{Ins}(2,4,5,6)\text{P}_4$ durch Phosphorylierung an 3-Position $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ bzw. durch Phosphorylierung der 1-OH-Gruppe $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$. $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$ wird zu $\text{PP-InsP}_4(\text{IVb})$ pyrophosphoryliert, das später weiter zu $\text{PP}_2\text{-InsP}_3(\text{IIc})$ umgesetzt wird (siehe Kapitel 5.6.1.9). Dahingegen wird $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ sehr schnell zu InsP_6 phosphoryliert und ist deshalb nur in kleinen Mengen in der Abbildung zu sehen. In einem nächsten Schritt wird

InsP₆ dann schließlich in die beiden PP-InsP₅-Isomere [(I) + (II)] überführt. Für eine hypothetische Strukturanalyse wird auf die Diskussion verwiesen. Neben diesen Produkten ist auch erstmals InsP₈ [PP₂-InsP₄ (I)] zu sehen. Aller Voraussicht geht es aus den beiden PP-InsP₅-Isomeren [(I) + (II)] hervor (siehe auch Kapitel 5.6.1.12). Abbildung 5-26 zeigt die angesprochenen (Pyro-) Phosphorylierungsschritte:

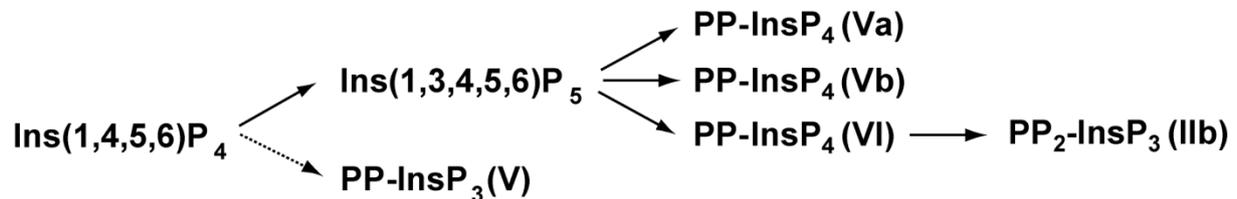


Abbildung 5-26: Umsetzung von Ins(1,4,5,6)P₄ durch EhIPK-1

Die Nebenreaktionen (Produktentstehung < 5 %) sind durch gestrichelte „Reaktionspfeile“ dargestellt.

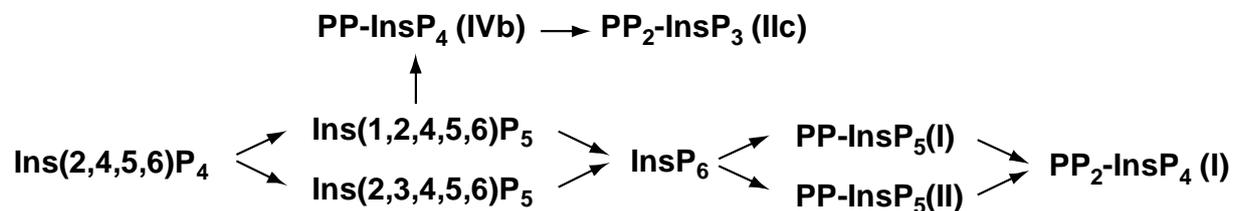


Abbildung 5-27: Umsetzung von Ins(2,4,5,6)P₄ durch EhIPK-1

5.6.1.6 Umsetzung von Ins(3,4,5,6)P₄ durch EhIPK-1

Das Substrat war mit kleinen Mengen Ins(2,4,5,6)P₄ kontaminiert. Die MDD-HPLC-Chromatogramme sind in Abbildung 5-28 gezeigt.

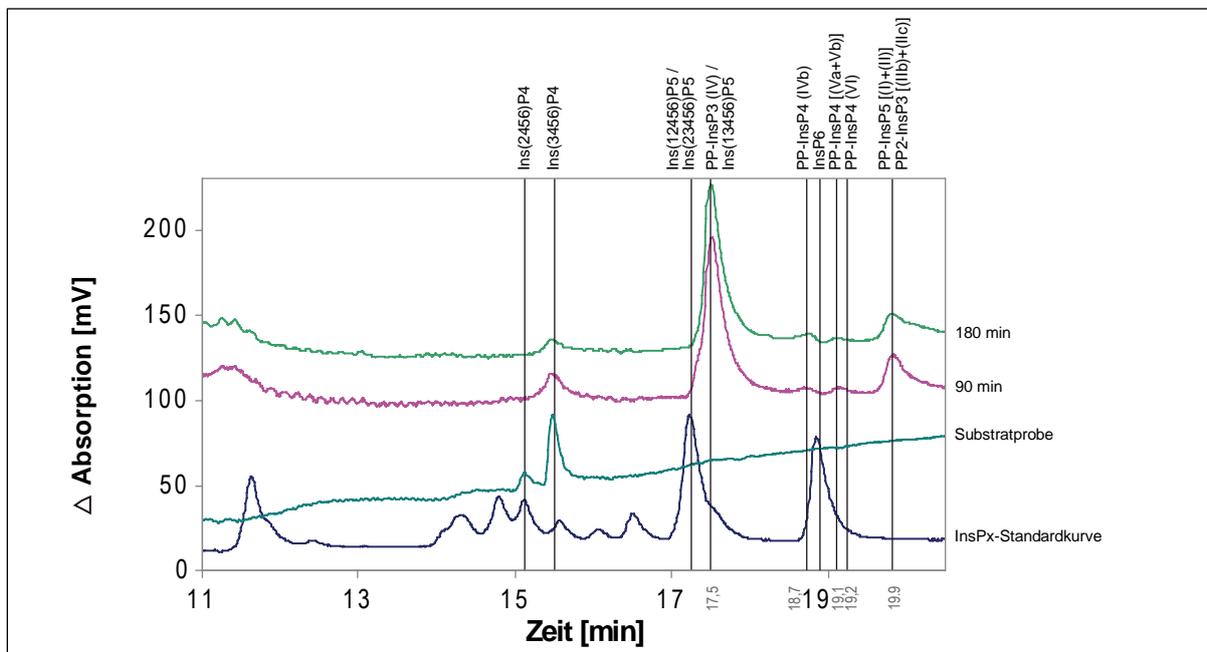


Abbildung 5-28: MDD-HPLC-Chromatogramme zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 min, 90 min und 180 min) mit 10 μM Ins(3,4,5,6)P₄ unter Standardbedingungen mit 1 mM ATP. Die Enzymkonzentration betrug 9,4 μg / ml bei einer Ansatzgröße von 160 μl.

Das detektierte Ins(1,3,4,5,6)P₅ entsteht durch eine 1-OH-Kinase-Aktivität des Enzyms, die das Substrat Ins(3,4,5,6)P₄ an der entsprechenden OH-Gruppe phosphoryliert (siehe

Abbildung 5-28). Ebenfalls entstanden die schon in anderen Kapiteln erwähnten PP-InsP₄-Isomere, die von Ins(1,3,4,5,6)P₅ abgeleitet werden. Neu zu sehen ist ein weiteres, als Hauptprodukt vorhandenes PP-InsP₃ (IV), das auf Höhe von Ins(1,3,4,5,6)P₅ eluiert. Das detektierte PP-InsP₄ (IVb) wird wie Kapitel 5.6.1.9 zeigt ebenfalls von Ins(1,2,4,5,6)P₅ abgeleitet. PP₂-InsP₃ (IIc), das aus dem PP-InsP₄-Isomer (IVb) gebildet wird, wurde auch durch die MDD-HPLC-Analysen detektiert. Außerdem entstehen kleine Mengen InsP₆ aus dem vorhandenen, aus Ins(2,4,5,6)P₄ generiertem Ins(1,2,4,5,6)P₅ und Ins(2,3,4,5,6)P₅. InsP₆ wird schließlich pyrophosphoryliert zu PP-InsP₅ [(I) und (II)].

Abbildung 5-29 und Abbildung 5-30 fassen die Phosphorylierungsschritte zusammen:

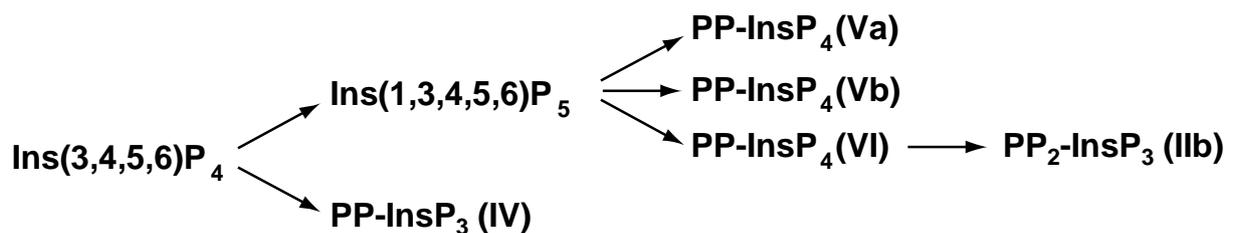


Abbildung 5-29: Umsetzung von Ins(3,4,5,6)P₄ durch EhIPK-1

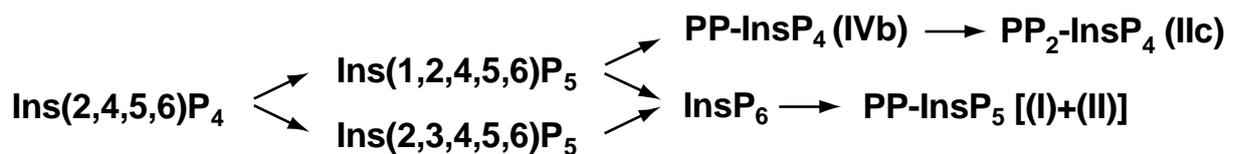


Abbildung 5-30: Umsetzung von Ins(2,4,5,6)P₄ durch EhIPK-1 (vgl. auch Abbildung 5-27)

5.6.1.7 Umsetzung von Ins(1,3,4,6)P₄ durch EhIPK-1

Das Substrat ist ein für die InsP₅-Biosynthese bedeutsames InsP₄-Isomer in tierischen Zellen. Ins(1,3,4,6)P₄ war mit Ins(1,2,3,4)P₄ verunreinigt. Die entsprechenden Chromatogramme sind in Abbildung 5-31 zu sehen.

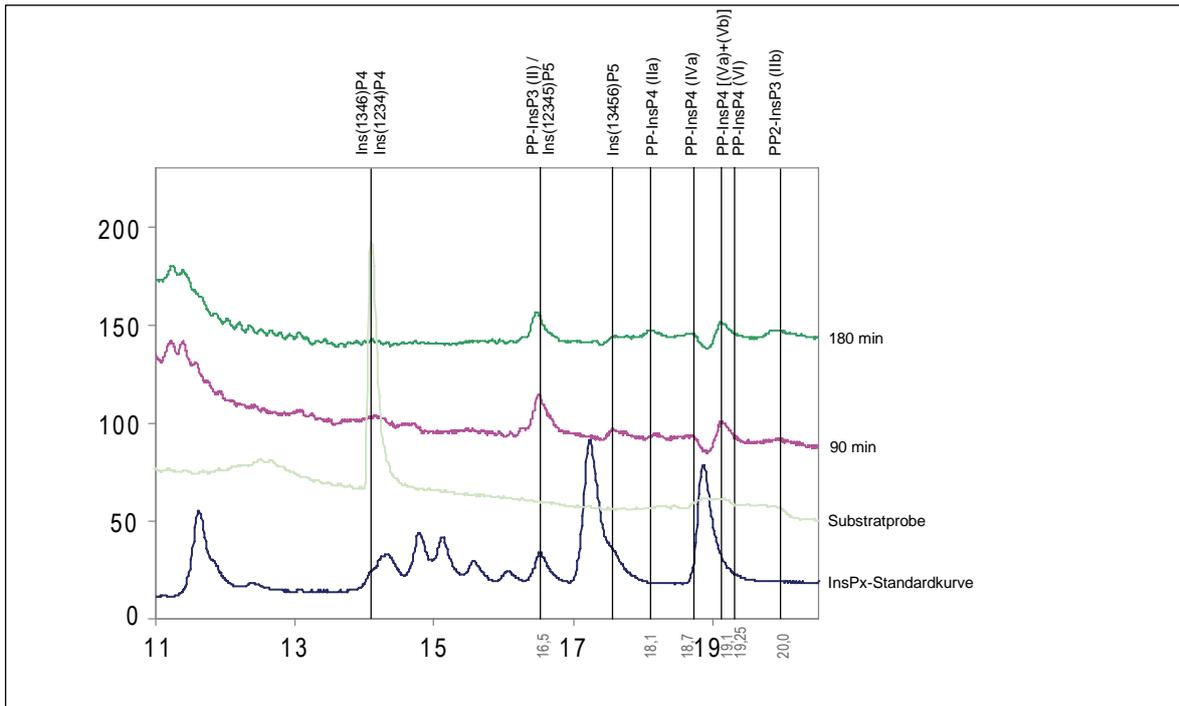


Abbildung 5-31: MDD-HPLC-Chromatogramme zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 min, 90 min und 180 min) mit 10 μM $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$ unter Standardbedingungen mit 1 mM ATP. Die Enzymkonzentration betrug 9,4 $\mu\text{g} / \text{ml}$ bei einer Ansatzgröße von 160 μl .

Aufgrund der Kontamination von $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$ mit $\text{Ins}(1,2,3,4)\text{P}_4$ entsteht auch hier $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$. Das entstehende $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ wird, wie in Kapitel Kapitel 5.6.1.10 bewiesen, nicht weiter zu InsP_6 phosphoryliert. Das Substrat $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$ wird an 5-Position phosphoryliert, wodurch als weiteres Produkt $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ mit den Folgeprodukten generiert wird. Auch unter Einsatz dieses Substrats entsteht als Hauptprodukt ein PP- InsP_3 -Isomer (II). Daneben entsteht, durch Verunreinigung des Substrats bedingt, aus $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ PP- InsP_4 (IIa) und (IVa), auf das nochmals in Kapitel 5.6.1.10 eingegangen wird.

Abbildung 5-32 und Abbildung 5-33 fassen die besprochenen Phosphorylierungsschritte bezogen auf $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$ und $\text{Ins}(1,2,3,4)\text{P}_4$ zusammen:

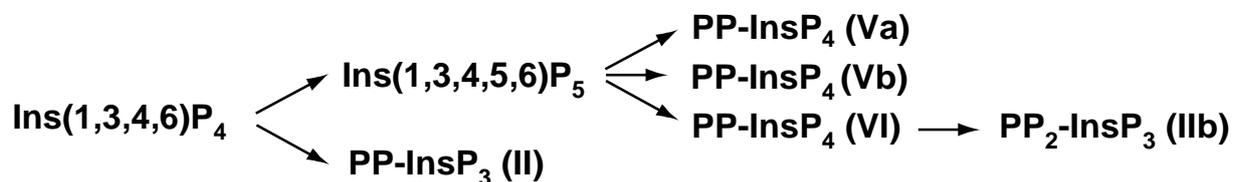


Abbildung 5-32: Umsetzung von $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$ durch EhIPK-1



Abbildung 5-33: Umsetzung von $\text{Ins}(1,2,3,4)\text{P}_4$ durch EhIPK-1

5.6.1.8 Umsetzung von Ins(1,3,4,5,6)P₅ durch EhIPK-1

Bei Ins(1,3,4,5,6)P₅ handelt es sich um ein weiteres getestetes Substrat mit biologischer Bedeutung bei *Metazoen*. Neben Ins(1,3,4,5,6)P₅ enthielt das eingesetzte Substrat auch in geringen Mengen Ins(1,2,4,5,6)P₅.

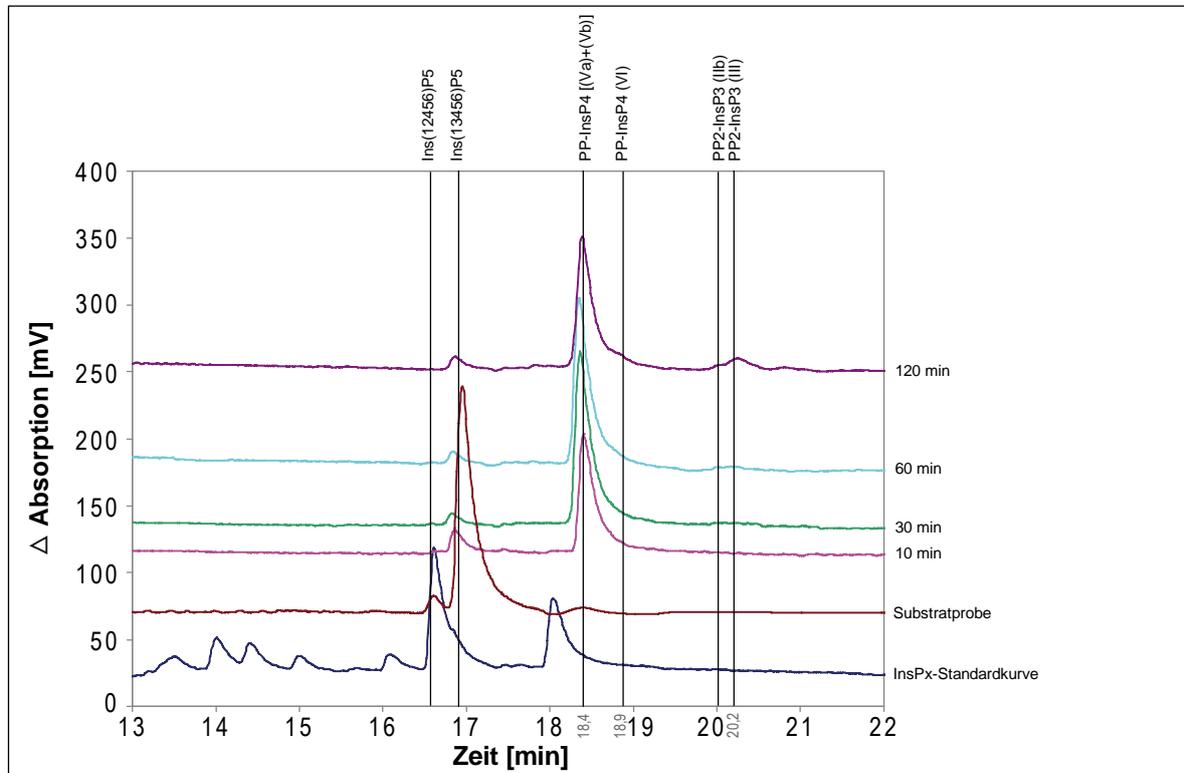


Abbildung 5-34: MDD-HPLC-Chromatogramme zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 min, 10 min, 30 min, 60 min und 120 min) mit 10 µM Ins(1,3,4,5,6)P₅ unter Standardbedingungen mit 1 mM ATP. Die Enzymkonzentration betrug 5,2 µg / ml bei einer Ansatzgröße von 480 µl.

Ins(1,3,4,5,6)P₅ wird bei *Metazoen* durch eine mit der EhIPK-1 nicht homologen IP52K zu InsP₆ phosphoryliert. Das Hauptprodukt der Phosphorylierung ist bei der EhIPK-1 jedoch nicht InsP₆ sondern in erster Linie zwei PP-InsP₄-Isomere [(Va) + (Vb)], die nahezu den selben Elutionszeitpunkt besitzen (siehe Abbildung 5-34). Ein drittes PP-InsP₄-Isomer (VI) wird, wie in den vorangegangenen Kapiteln schon gezeigt, auch von Ins(1,3,4,5,6)P₅ abgeleitet. InsP₆ konnte nicht detektiert werden, wodurch gezeigt wird, dass die EhIPK-1 nicht in der Lage ist, InsP₆ aus Ins(1,3,4,5,6)P₅ zu bilden. Es muss sich also bei den weiteren Produkten in Form von InsP₇-Isomeren um Produkte handeln, die InsP₆ als Intermediat nicht benötigen. Aus diesem Grunde handelt es sich wohl am ehesten um zweifach pyrophosphorylierte InsP₅-Derivate, also PP₂-InsP₃-Isomere [(Iib) + (Iii)]. PP₂-InsP₃ (Iib), das in kleinen Mengen aus einem einzelnen PP-InsP₄ (VI) gebildet wird, wurde, wie auch PP₂-InsP₃ (Iii), das aus den PP-InsP₄-Isomeren (Va) und (Vb) abgeleitet ist, in der Abbildung detektiert.

Dadurch, dass aus Ins(1,3,4,5,6)P₅ neben einem dritten PP-InsP₄- (VI) auch zwei weitere PP-InsP₄-Isomere [(Va) + (Vb)] generiert werden, die an unterschiedlicher Position eine Pyrophosphatgruppe tragen und in einem nächsten Schritt die noch nicht besetzte Position

des jeweilig anderen PP-InsP₄-Isomers „nachträglich“ pyrophosphoryliert wird, ist es möglich, dass aus beiden Isomeren schließlich das selbe Produkt [PP₂-InsP₃ (III)] entsteht (siehe auch Kapitel 6.4).

Die folgende Abbildung 5-35 gibt schematisch Aufschluss über die hypothetischen Phosphorylierungsschritte der EhIPK-1:

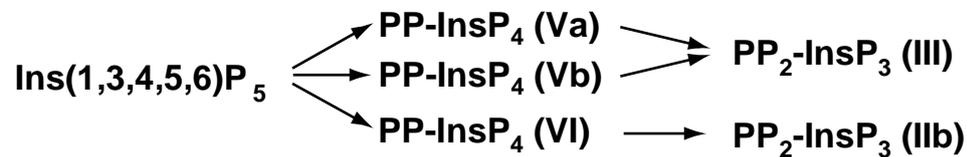


Abbildung 5-35: Umsetzung von Ins(1,3,4,5,6)P₅ durch EhIPK-1

5.6.1.9 Umsetzung von D/L-Ins(1,2,4,5,6)P₅ durch EhIPK-1

Das Substrat war verunreinigt mit Ins(1,3,4,5,6)P₅ und vermutlich einem weiteren InsP₅-Isomer (Ins(1,2,3,4,5)P₅). Die MDD-HPLC-Chromatogramme wurden durch Analysen der Proben erstellt (siehe Abbildung 5-36).

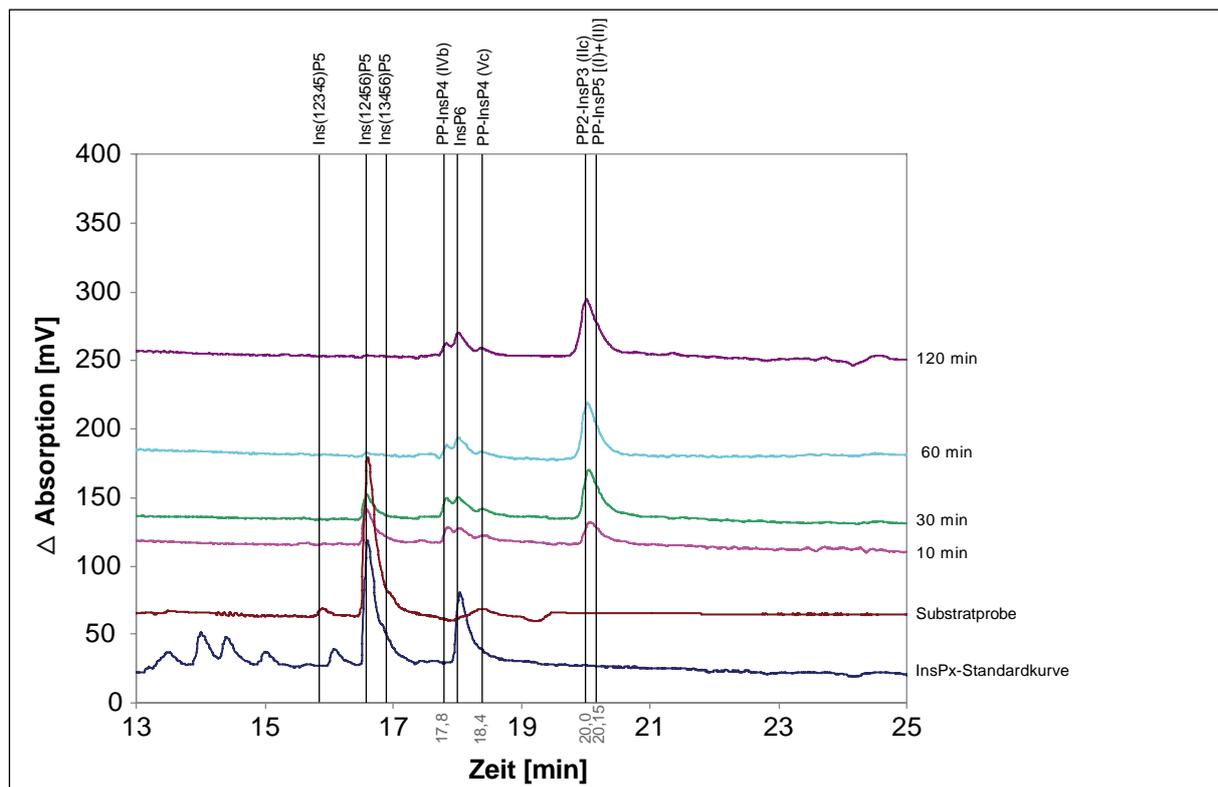


Abbildung 5-36: MDD-HPLC-Chromatogramme zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 min, 10 min, 30 min, 60 min und 120min) mit 10 µM Ins(1,2,4,5,6)P₅ unter Standardbedingungen mit 1 mM ATP. Die Enzymkonzentration betrug 5,2 µg / ml bei einer Ansatzgröße von 480 µl.

Das Hauptprodukt dieser Reaktion ist eindeutig PP₂-InsP₃ (IIc). Dieses Produkt wird analog zum vorangegangenen Kapitel aus den beiden entstehenden PP-InsP₄-Isomeren (IVb), dicht vor InsP₆ eluierend, und (Vc), das kurz nach InsP₆ detektiert wurde, abgeleitet. Die Retentionszeit von PP₂-InsP₃ (IIc) stimmt mit dem aus PP-InsP₄ (VI) gebildeten PP₂-InsP₃ (IIb) und PP₂-InsP₃ (IIa), abgeleitet aus PP-InsP₄ (IVa), überein (vgl. Kapitel 5.6.1.8 und

5.6.1.10). Es handelt sich jedoch um Produkte, die sich strukturell unterscheiden. Es wird auch hier trotz des entstehenden InsP_6 davon ausgegangen, dass es sich bei dem InsP_7 -Isomer um ein $\text{PP}_2\text{-InsP}_3$ -Isomer handelt. Das ebenfalls detektierte InsP_6 entsteht durch vollständige Phosphorylierung des Substrats an der noch freien OH-Gruppe des $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$. InsP_6 wird später zu PP-InsP_5 [(I) + (II)] umgesetzt.

Abbildung 5-37 zeigt die Phosphorylierungen noch einmal zusammengefasst:

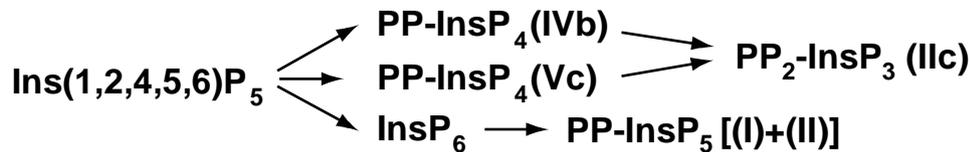


Abbildung 5-37: Umsetzung von $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$ durch EhIPK-1

5.6.1.10 Umsetzung von D/L- $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ durch EhIPK-1

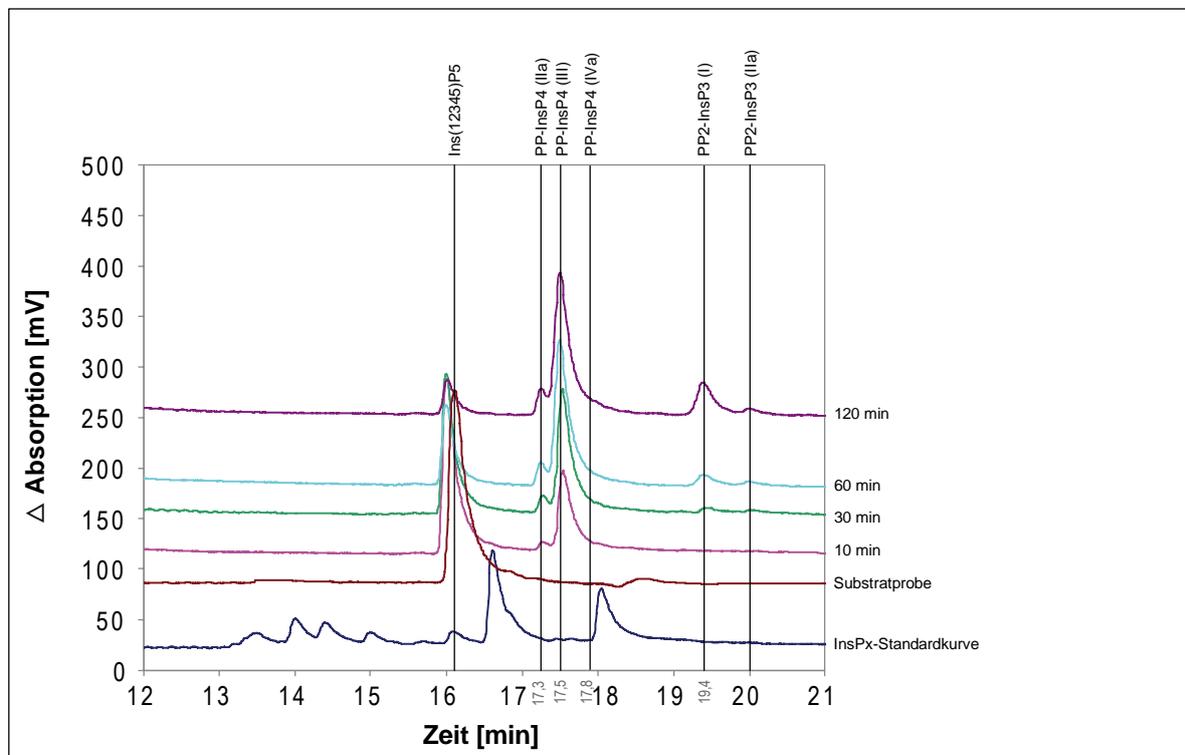


Abbildung 5-38: MDD-HPLC-Chromatogramme zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 min, 10 min, 30 min, 60 min, 120min) mit $10 \mu\text{M}$ $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ unter Standardbedingungen mit 1 mM ATP. Die Enzymkonzentration betrug $5,2 \mu\text{g} / \text{ml}$ bei einer Ansatzgröße von $480 \mu\text{l}$.

Wie in den MDD-HPLC-Chromatogrammen zu sehen, sind mehrere Produkte detektierbar, die jeweils nur Phosphoester tragenden InsP_x entsprechen. Es wurden insgesamt drei PP-InsP_4 -Isomere [(IIa) + (III) + (IVa)] sowie zwei $\text{PP}_2\text{-InsP}_3$ -Isomere [(I) + (IIa)] gefunden. Hauptprodukte der Reaktion scheinen das PP-InsP_4 -Isomer (III) und $\text{PP}_2\text{-InsP}_3$ (I) zu sein.

Das in kleineren Mengen auftretende $\text{PP}_2\text{-InsP}_3$ (IIa) leitet sich daher vermutlich nur von einem „Vorläuferprodukt“, dem PP-InsP_4 (IVa), ab. Weiterhin wird angenommen, dass auch hier zwei PP-InsP_4 -Isomere [(IIa) + (III)] zu einem $\text{PP}_2\text{-InsP}_3$ -Isomer (I) metabolisiert werden.

Die folgende Darstellung in Abbildung 5-39 fasst das Postulierte noch einmal schematisch zusammen:

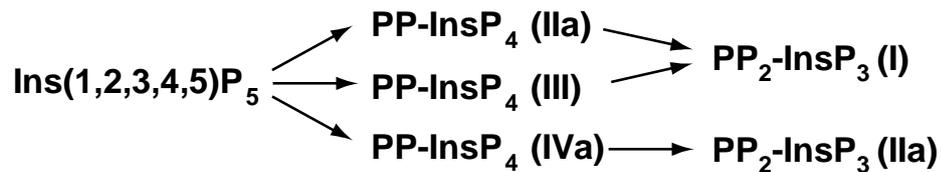


Abbildung 5-39: Umsetzung von Ins(1,2,3,4,5)P₅ durch EhIPK-1

5.6.1.11 Umsetzung von Ins(1,2,3,4,6)P₅ durch EhIPK-1

Auch dieses Substrat konnte nicht isoliert eingesetzt werden und war mit einer Spur Ins(1,2,3,4,5)P₅ verunreinigt. Nach der Inkubation der Proben erfolgte eine Analyse mittels HPLC (siehe Abbildung 5-40).

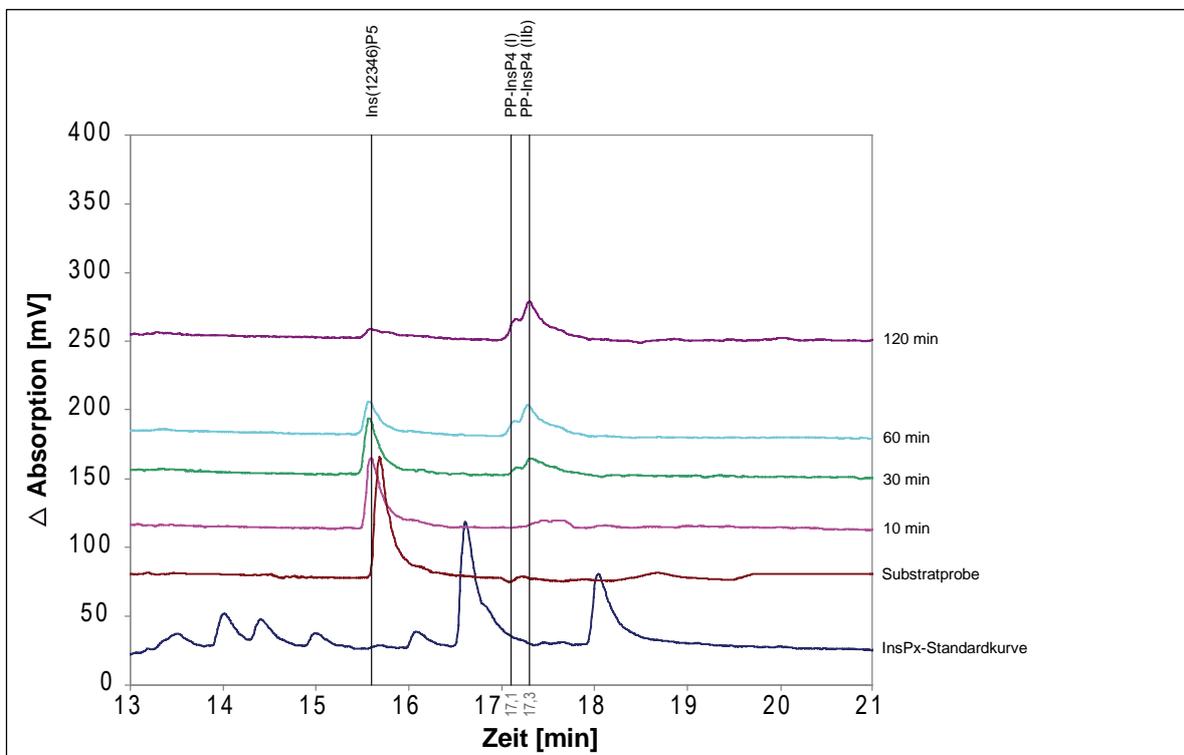


Abbildung 5-40: MDD-HPLC-Chromatogramme zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 min, 10 min, 30 min, 60 min und 120 min) mit 10 µM Ins(1,2,3,4,6)P₅ unter Standardbedingungen mit 1 mM ATP. Die Enzymkonzentration betrug 5,2 µg / ml bei einer Ansatzgröße von 480 µl.

Die MDD-HPLC-Chromatogramme in Abbildung 5-40 zeigen insgesamt nur zwei Produkte: PP-InsP₄-Isomer [(I) + (IIb)]. Beide Isomere müssen aus dem Substrat Ins(1,2,3,4,6)P₅ gebildet worden sein. Abbildung 5-41 zeigt die Pyrophosphorylierungen der Reaktion:

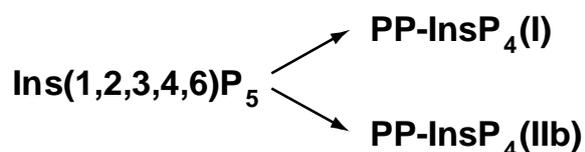


Abbildung 5-41: Umsetzung von Ins(1,2,3,4,6)P₅ durch EhIPK-1

5.6.1.12 Umsetzung von InsP_6 durch EhIPK-1

Der Versuch erfolgte mit $10 \mu\text{M}$ des Substrats InsP_6 . In Abbildung 5-42 sind die MDD-HPLC-Chromatogramme gezeigt.

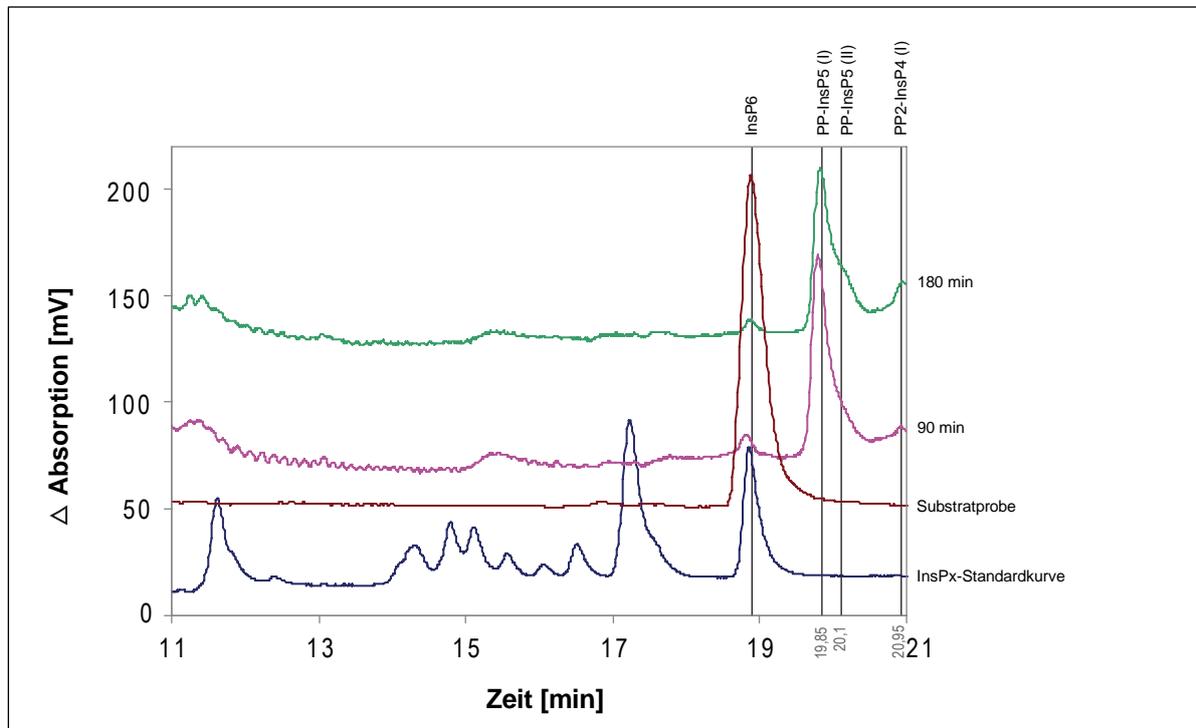


Abbildung 5-42: MDD-HPLC-Chromatogramme bei den Zeitpunkten 0 min, 90 min und 180 min mit $10 \mu\text{M}$ InsP_6 unter Standardbedingungen mit 1 mM ATP. Die Enzymkonzentration betrug $5,2 \mu\text{g} / \text{ml}$ bei einer Ansatzgröße von $480 \mu\text{l}$.

Die Chromatogramme dieses reinen Substrats zeigen neben teils immer noch vorhandenem InsP_6 entstandenes PP-InsP_5 , das an bisher nicht identifizierter Position pyrophosphoryliert vorliegt. Aufgrund einer zu vermutenden Schulter hinter dem dominanten PP-InsP_5 (I)-Peak sowohl beim 90 min- als auch noch stärker beim 180 min-Chromatogramm handelt es sich hier um zwei unterschiedliche PP-InsP_5 -Isomere [(I)+(II)], die aufgrund der ähnlichen Elution mit entsprechenden Standards vermutlich 5PP-InsP_5 und 1- oder 3PP-InsP_5 (Enantiomere) darstellen. Zusätzlich ist im Chromatogramm InsP_8 [$\text{PP}_2\text{-InsP}_4$ (I)] zu erkennen, dessen Struktur (möglicherweise PPP-InsP_5 oder $\text{PP}_2\text{-InsP}_4$; vgl. auch Diskussion) unbekannt ist.

Das Reaktionsschema ist in Abbildung 5-43 dargestellt:

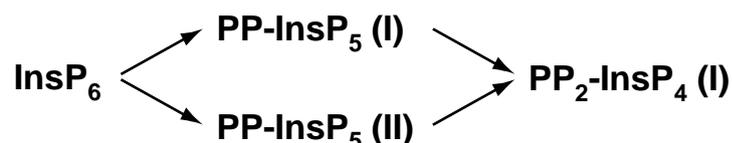


Abbildung 5-43: Umsetzung von InsP_6 durch EhIPK-1

5.6.2 Limitierte Hydrolyse von PP-InsP-Isomeren durch Trichloressigsäure [TCA]-Behandlung

Bei den Substratuntersuchungen wurde durch HPLC-Analysen eine Vielzahl von PP-InsP-Isomeren als Produkte gefunden. Um sicherzustellen, dass es sich tatsächlich um pyrophosphorylierte Inositolringe handelt, wurde für Phosphorylierungsansätze eine limitierte Hydrolyse mit 50 % Trichloressigsäure [TCA] durchgeführt. Durch diese Inkubation kommt es fast nur zu einer Spaltung von Pyrophosphatgruppen und kaum zur Spaltung der Phosphomonoester am Inositolring. Durch diese Methode wird also verifiziert, dass es sich bei den fraglichen PP-InsP-Isomeren tatsächlich um Pyrophosphate handelt. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass es zu einem gewissen Prozentsatz zu intramolekularen Umlagerungen von Phosphatgruppen kommen kann, insbesondere im Bereich der cis-ständigen OH-Gruppen 1,2 und 3. Es ließen sich mit dieser Methode zwar Rückschlüsse auf die Isomerie der zugrunde liegenden nicht phosphorylierten Substrate, die so überwiegend regeneriert werden, ziehen, jedoch keine Rückschlüsse auf die Positionen der Pyrophosphatgruppen.

Beispielhaft ist eine limitierte Hydrolyse in Abbildung 5-44 gezeigt: Für die später partiell zu hydrolysierenden Ansätze wurde zunächst das Substrat $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ für 120 min bei 30 °C unter Standardpufferbedingungen phosphoryliert. Die Hydrolyse erfolgte danach durch Zugabe von TCA auf 50 % (10 min Inkubation bei 95 °C). Kontrollen wurden direkt für die HPLC-Analyse aufgearbeitet, ohne hydrolysiert worden zu sein.

Wie in Abbildung 5-44 zu sehen, sind neben der unbehandelten Kontrolle auch die hydrolysierte Probe sowie die schon bekannte Standardmischung von InsP_x aufgetragen. Um die Identifizierung der PP-InsP-Isomere zu erleichtern, wurde der Standardmischung noch ein Gemisch, bestehend aus InsP_6 und $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$, dazugegeben. Das Gemisch ist außerdem noch als zusätzliche Probe isoliert aufgetragen worden.

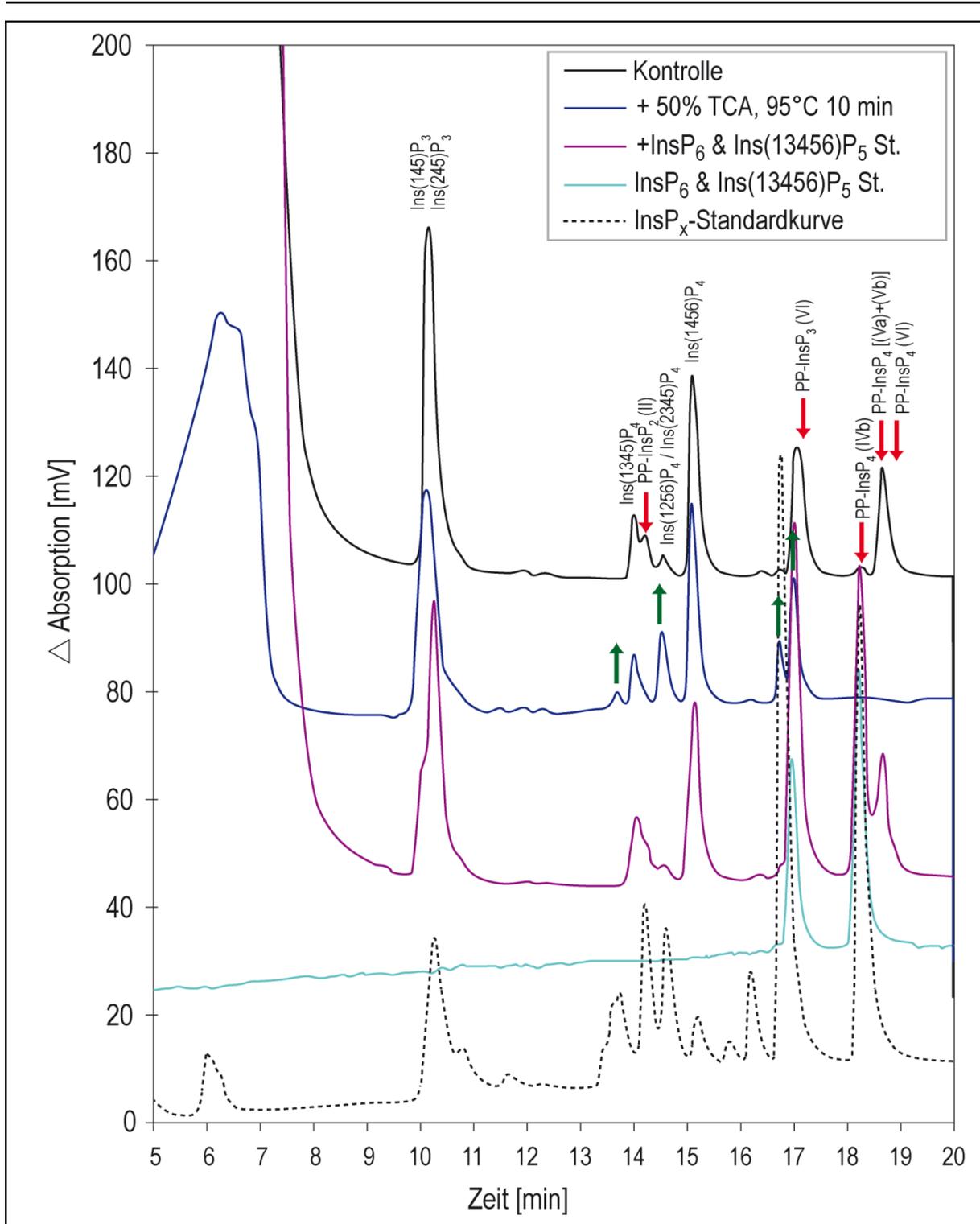


Abbildung 5-44: Partielle Hydrolyse von PP-InsP-Isomeren durch Trichloressigsäure [TCA]

Die Abnahme der Flächen der PP-InsP-Isomere ist mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Die Zunahme der Flächen, die durch die hydrolysierten PP-InsP-Isomere entsteht, ist mit grünen Pfeilen farblich illustriert.

Wie sehr gut zu sehen, findet eine relativ selektive Hydrolyse der hier gebildeten Pyrophosphate $PP\text{-InsP}_3$ (VI) und $PP\text{-InsP}_4$ [(IVb) + (Va) + (Vb) + (VI)] statt. Zusätzlich ist in der Abbildung ein Peak, ähnlich eluierend wie $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ zu sehen, der in der Höhe ebenso abnimmt (vgl. auch Abbildung 5-15 bzw. Kapitel 5.6.1.1). Vermutlich handelt es sich hierbei um das $PP\text{-InsP}_2$ -Isomer (II). In der Abbildung sind die Flächenveränderungen

(Abnahme der Peaks mit roten Pfeilen, Zunahme der Peaks mit grünen Pfeilen) farblich illustriert. Es wurde mit dieser Methode der Beweis erbracht, dass es sich bei den Produkten tatsächlich um PP-InsP-Isomere handelt.

5.6.3 Zusammenfassung der Substratselektivität der EhIPK-1

Die MDD-HPLC-Analysen haben gezeigt, dass die EhIPK-1 eine Vielzahl von Substraten umsetzen kann. Neben einer InsP_x-OH-Kinase-Fähigkeit besitzt die IPK offensichtlich auch InsP_x-Phosphokinase- (=Pyrophosphatsynthase-) Aktivität. Die IPK ist also in der Lage, OH-Gruppen am Inositolring zu phosphorylieren und bereits vorhandene Phosphatgruppen zu pyrophosphorylieren.

Wie Tabelle 5-2 zu entnehmen ist, besitzt die Inositolphosphatkinase nicht nur die Funktionsvielfalt von bisher bekannten IPMKs (siehe Abbildung 5-16) mit einer ausgeprägten InsP_x-Phosphokinase-Aktivität, sondern sie ist auch an der Bildung extrem hoch phosphorylierter Inositole aus InsP₅-Isomeren und InsP₆ beteiligt bis hin zu InsP₈.

Das Enzym kann Inositolphosphate offensichtlich an der 1- und 3-OH-Gruppe phosphorylieren. Außerdem verfügt die EhIPK-1 über die Fähigkeit, eine Phosphorylierung von OH-Gruppen an Position 5 und 6 vorzunehmen. Dies variiert und hängt letztlich von der schon vorhandenen Phosphorylierung des eingesetzten Substrats ab.

Die EhIPK-1 ist fähig, ein breites Spektrum von Inositolphosphatisomeren zu pyrophosphorylieren. Diese Eigenschaft ist nicht auf InsP₅-Isomere und InsP₆ beschränkt, sondern kann auch schon sehr früh bei InsP₃- und InsP₄-Isomeren auftreten. Man stellt eine Pyrophosphorylierung bis hin zu InsP₈-Isomeren fest. Um die genauen Strukturen der entstandenen PP-InsP_x-Pyrophosphate aufzuklären, sind weitere Analysen außerhalb dieser Arbeit notwendig. Einen Überblick über die Substrat- und Gruppenspezifitäten (Hydroxy-Kinase bzw. Phosphokinase mit Bildung von Phosphoestern bzw. Pyrophosphaten) der EhIPK-1 gibt zusammenfassend Tabelle 5-2 bzw. das Schema in Abbildung 5-45. In Tabelle 5-2 ist zusätzlich der prozentuale Anteil der jeweiligen Produkte (auf 5 % gerundet) angegeben, die aus dem Substrat bzw. einem „Zwischenprodukt“ durch Phosphorylierung gebildet werden.

Substrat	Produkt(e)	Kinase-Selektivität
Ins(1,4,5)P ₃	Ins(1,3,4,5)P₄ (ca. 15 %) Ins(1,4,5,6)P₄ (ca. 35 %) PP-InsP ₂ (II) (ca. 5 %)	Ins(1,4,5)P ₃ -3-OH-Kinase Ins(1,4,5)P ₃ -6-OH-Kinase Ins(1,4,5)P ₃ -x-P-Kinase
Ins(1,4,6)P ₃	Ins(1,4,5,6)P₄ (> 55 %)	Ins(1,4,6)P ₃ -5-OH-Kinase
Ins(2,4,5)P ₃	Ins(1,2,4,5)P₄ (ca. 70 %) Ins(2,3,4,5)P ₄ (ca. 10%) PP-InsP ₂ (I) (ca. 10 %)	Ins(2,4,5)P ₃ -1-OH-Kinase Ins(2,4,5)P ₃ -3-OH-Kinase Ins(2,4,5)P ₃ -x-P-Kinase
Ins(1,2,3,4)P ₄	Ins(1,2,3,4,5)P₅ (> 90%)	Ins(1,2,3,4)P ₄ -5-OH-Kinase
Ins(1,2,4,5)P ₄	Ins(1,2,3,4,5)P₅ (ca. 50 %) Ins(1,2,4,5,6)P ₅ (ca. 5 %) PP-InsP ₃ (I) (< 5 %)	Ins(1,2,4,5)P ₄ -3-OH-Kinase Ins(1,2,4,5)P ₄ -6-OH-Kinase Ins(1,2,4,5)P ₄ -x-P-Kinase
Ins(1,3,4,5)P ₄	Ins(1,3,4,5,6)P₅ (ca. 65 %) PP-InsP₃ (III) (ca. 25 %) PP-InsP ₃ (VI) (< 5 %)	Ins(1,3,4,5)P ₄ -6-OH-Kinase Ins(1,3,4,5)P ₄ -x-P-Kinase Ins(1,3,4,5)P ₄ -y-P-Kinase
Ins(1,3,4,6)P ₄	Ins(1,3,4,5,6)P₄ (> 60 %) PP-InsP₃ (II) (ca. 30 %)	Ins(1,3,4,6)P ₄ -5-OH-Kinase Ins(1,3,4,6)P ₄ -x-P-Kinase
Ins(1,4,5,6)P ₄	Ins(1,3,4,5,6)P₅ (> 90 %) PP-InsP ₃ (V) (< 5 %)	Ins(1,4,5,6)P ₄ -3-OH-Kinase Ins(1,4,5,6)P ₄ -x-P-Kinase
Ins(2,3,4,5)P ₄	Ins(1,2,3,4,5)P₅ (ca. 50 %) Ins(2,3,4,5,6)P₅ (ca. 50 %)	Ins(2,3,4,5)P ₄ -1-OH-Kinase Ins(2,3,4,5)P ₄ -6-OH-Kinase
Ins(2,4,5,6)P ₄	Ins(1,2,4,5,6)P ₅ (ca. 20 %) Ins(2,3,4,5,6)P₅ (ca. 80 %)	Ins(2,4,5,6)P ₄ -1-OH-Kinase Ins(2,4,5,6)P ₄ -3-OH-Kinase
Ins(3,4,5,6)P ₄	Ins(1,3,4,5,6)P₅ (ca. 30 %) PP-InsP₃ (IV) (ca. 60 %)	Ins(3,4,5,6)P ₄ -1-OH-Kinase Ins(3,4,5,6)P ₄ -x-P-Kinase
Ins(1,2,3,4,5)P ₅	PP-InsP ₄ (IIa) (ca. 15 %) PP-InsP₄ (III) (> 70 %) PP-InsP ₄ (IVa) (ca. 10 %)	Ins(1,2,3,4,5)P ₅ -x-P-Kinase Ins(1,2,3,4,5)P ₅ -y-P-Kinase Ins(1,2,3,4,5)P ₅ -z-P-Kinase
Ins(1,2,3,4,6)P ₅	PP-InsP₄ (I) (ca. 35 %) PP-InsP₄ (IIb) (ca. 65 %)	Ins(1,2,3,4,6)P ₅ -x-P-Kinase Ins(1,2,3,4,6)P ₅ -y-P-Kinase
Ins(1,2,4,5,6)P ₅	InsP₆ (ca. 65 %) PP-InsP ₄ (IVb) (ca. 15 %) PP-InsP ₄ (Vc) (ca. 15 %)	Ins(1,2,4,5,6)P ₅ -3-OH-Kinase Ins(1,2,4,5,6)P ₅ -x-P-Kinase Ins(1,2,4,5,6)P ₅ -y-P-Kinase

Tabelle 5-2: Umsetzung von Inositolphosphaten durch EhIPK-1

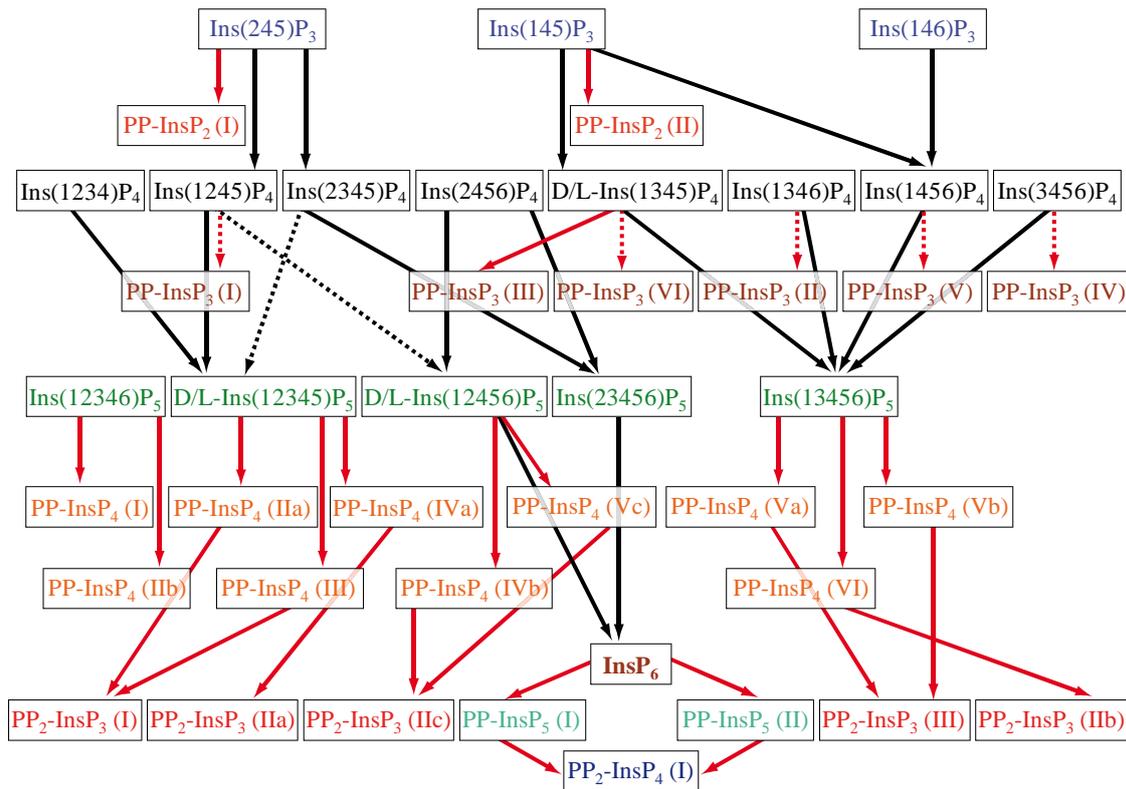
Es ist neben dem prozentualen Anteil der Produkte auch die entsprechende Kinasefähigkeit des Enzyms angegeben. Die **Hauptprodukte** sind in der Tabelle fett gehalten.

Substrat	Produkt(e)	Kinase-Selektivität
Ins(1,3,4,5,6)P ₅	PP-InsP₄ (Va) (> 35 %)	Ins(1,3,4,5,6)P ₅ -x-P-Kinase
	PP-InsP₄ (Vb) (> 35 %)	Ins(1,3,4,5,6)P ₅ -y-P-Kinase
	PP-InsP ₄ (VI) (< 30 %)	Ins(1,3,4,5,6)P ₅ -z-P-Kinase
Ins(2,3,4,5,6)P ₅	InsP ₆ (> 10 %)	Ins(2,3,4,5,6)P ₅ -1-OH-Kinase
InsP ₆	PP-InsP₅ (I) (> 70 %)	InsP ₆ -x-P-Kinase
	PP-InsP ₅ (II) (> 25 %)	InsP ₆ -y-P-Kinase
PP-InsP ₄ (IIa)	PP₂-InsP₃ (I) (ca. 50 %)	PP-InsP ₄ (IIa)-x-P-Kinase
PP-InsP ₄ (III)	PP ₂ -InsP ₃ (I) (ca. 20 %)	PP-InsP ₄ (III)-x-P-Kinase
PP-InsP ₄ (IVa)	PP₂-InsP₃ (IIa) (ca. 50 %)	PP-InsP ₄ (IVa)-x-P-Kinase
PP-InsP ₄ (IVb)	PP₂-InsP₃ (IIc) (ca. 80 %)	PP-InsP ₄ (IVb)-x-P-Kinase
PP-InsP ₄ (Vc)	PP₂-InsP₃ (IIc) (ca. 80 %)	PP-InsP ₄ (Vc)-x-P-Kinase
PP-InsP ₄ (Va)	PP₂-InsP₃ (III) (ca. 50 %)	PP-InsP ₄ (Va)-x-P-Kinase
PP-InsP ₄ (Vb)	PP₂-InsP₃ (III) (ca. 50 %)	PP-InsP ₄ (Vb)-x-P-Kinase
PP-InsP ₄ (VI)	PP₂-InsP₃ (IIb) (ca. 50 %)	PP-InsP ₄ (VI)-x-P-Kinase
PP-InsP ₅ (I)	PP ₂ -InsP ₄ (I) (ca. 10 %)	PP-InsP ₅ (I)-x-P-Kinase
PP-InsP ₅ (II)	PP ₂ -InsP ₄ (I) (ca. 5 %)	PP-InsP ₅ (II)-y-P-Kinase

Tabelle 5-2, Fortsetzung: Umsetzung von Inositolphosphaten durch EhIPK-1

Es ist neben dem prozentualen Anteil der Produkte auch die entsprechende Kinasefähigkeit des Enzyms angegeben. Die durch die EhIPK-1 generierten **Hauptprodukte** sind in der Tabelle fett gehalten.

In Abbildung 5-45 wird anhand der Datenlage dieser Arbeit ein Modell der Spezifitäten und der dadurch möglichen anabolen Reaktionen der EhIPK-1 illustriert. Neben den eingesetzten Substraten und gebildeten Produkten zeigt die Abbildung 5-45 auch Zwischenprodukte, die anschließend von der Kinase weiterphosphoryliert werden. Dadurch ist es möglich den Inositolphosphatmetabolismus, der von der EhIPK-1 gesteuert wird, zusammenfassend darzustellen. Hierbei ist zu beachten, dass die Pyrophosphate wie in der Tabelle 5-2 nur allgemein mit den römischen Ziffern I-VI und ggf. den zugehörigen Kleinbuchstaben bezeichnet werden.

EhIPK-1**Abbildung 5-45: Modell der Kinasefähigkeiten der EhIPK-1**

Soweit nicht anders angegeben handelt es sich um Isomere in der D-Konfiguration. Um ein Durchkreuzen der Produkte und Substrate durch Pfeile, die den Übergang vom Substrat zum Produkt darstellen, zu verhindern und um Übersichtlichkeit gewährleisten zu können, verlaufen die „Reaktionspfeile“ teilweise „hinter“ den entsprechenden „Substrat- / Produktkästen“. Im Falle von gestrichelten „Reaktionspfeilen“ handelt es sich um Nebenreaktionen, während der nur sehr geringe Mengen (siehe Tabelle 5-2) des Produkts gebildet werden. Rote Pfeile entsprechen einer Phosphokinase-, schwarze Pfeile einer Hydroxykinase-Aktivität.

5.7 Aktivitätsbestimmung der EhIPK-1 für die eingesetzten Substrate

Neben der K_M -Wert-Bestimmung für das Substrat $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ war es möglich, anhand der gesammelten Daten z.T. Aktivitätsbestimmungen für die weiteren eingesetzten Substrate durchzuführen, die auch die Berechnung von v_{\max} -Werten, in den übrigen Fällen von „Pseudo-Erster-Ordnung“ Geschwindigkeiten bei definierten initialen Substratkonzentrationen, ermöglichten. Hierfür wurden (Ausnahme $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, da hier Messungen über vier Zeitpunkte existierten) die Daten der Substratselektivitätsstudien verwendet. Es wurden zunächst, wie in Abbildung 5-46 bis Abbildung 5-57 zu sehen, kinetische Diagramme erstellt, die die umgesetzte Substratmenge aufgetragen über die Zeit zeigen.

Die Versuchsbedingungen wurden in den Bildunterschriften der Diagramme zusammengefasst.

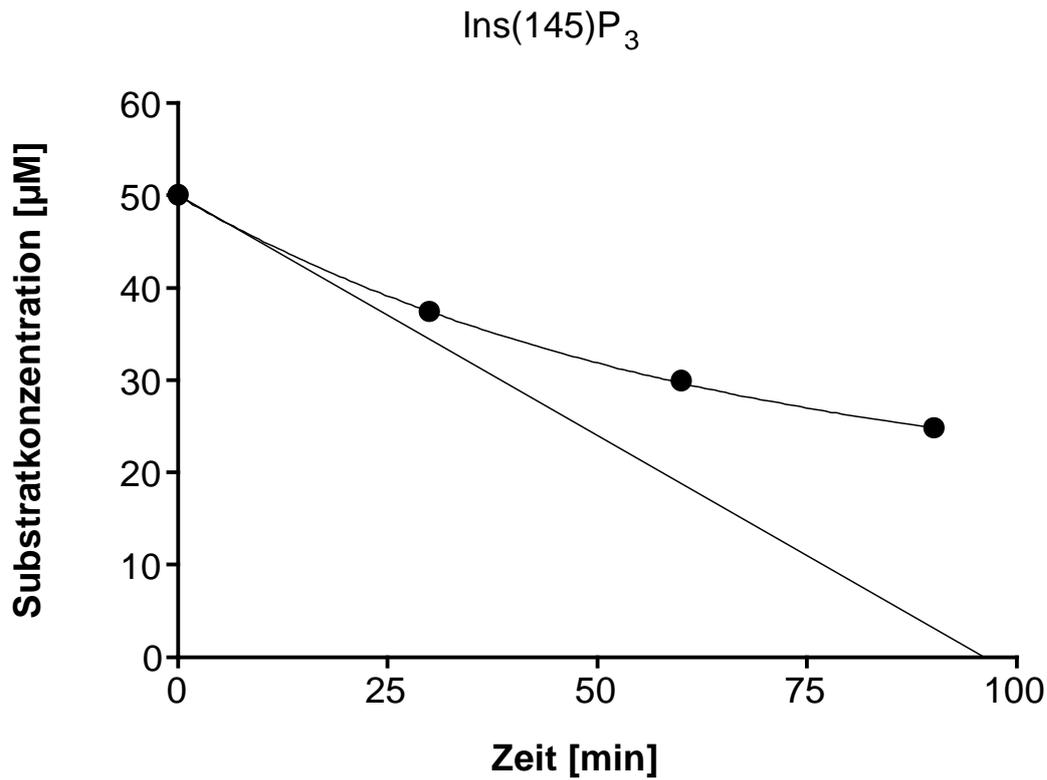


Abbildung 5-46: Kinetik der Umsetzung von Ins(1,4,5)P₃, durch EhIPK-1 bei einem Assayvolumen von 160 µl und einer Enzymkonzentration von ca. 9,4 µg / ml

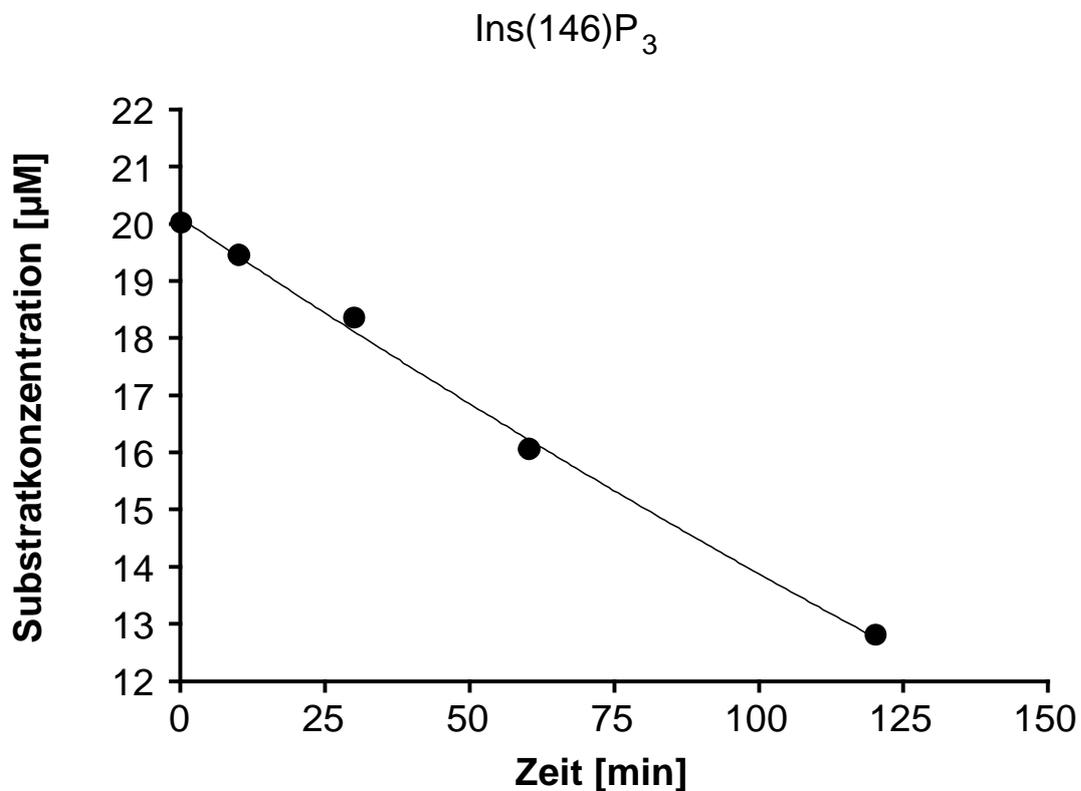


Abbildung 5-47: Kinetik der Umsetzung von Ins(1,4,6)P₃ durch EhIPK-1 bei einem Assayvolumen von 480 µl und einer Enzymkonzentration von ca. 5,2 µg / ml

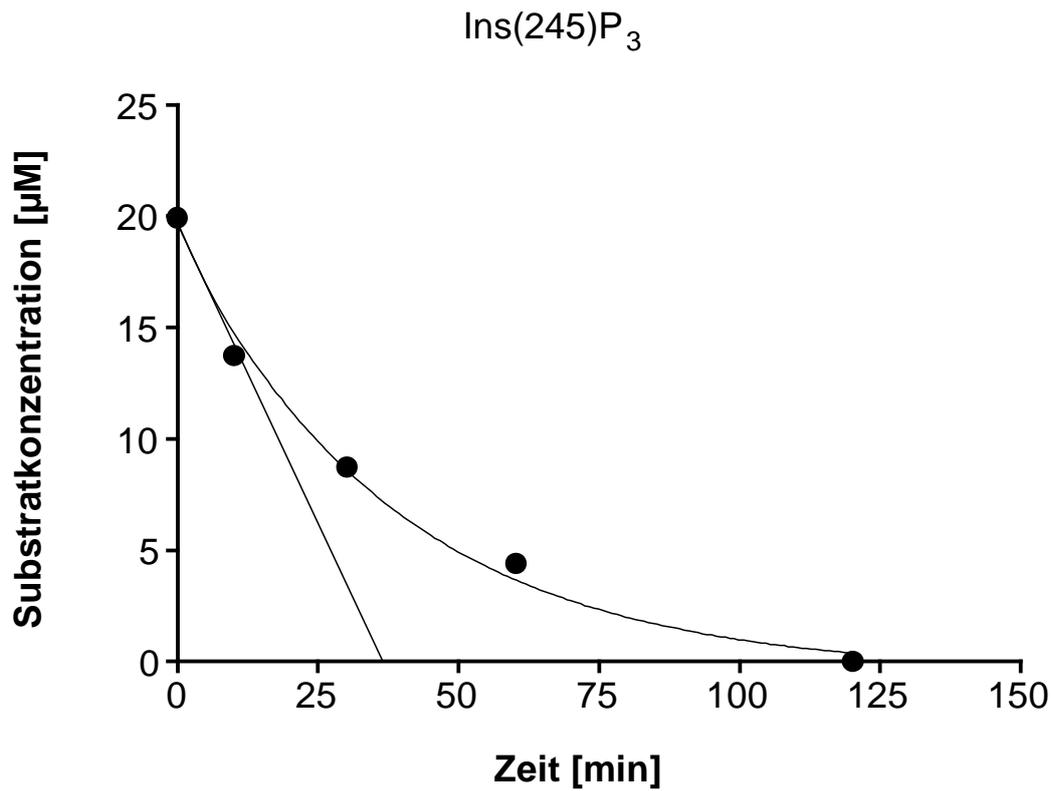


Abbildung 5-48: Kinetik der Umsetzung von Ins(2,4,5)P₃ durch EhIPK-1 mit bei einem Assayvolumen von 480 µl und einer Enzymkonzentration von ca. 5,2 µg / ml

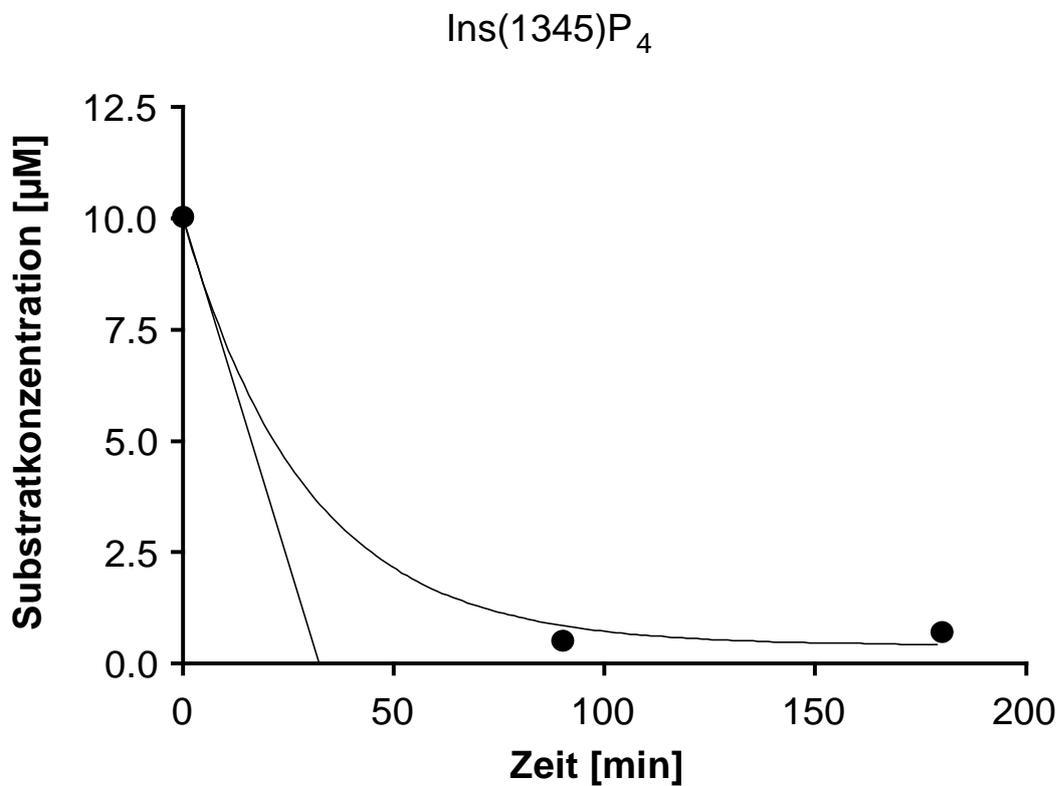


Abbildung 5-49: Kinetik der Umsetzung von Ins(1,3,4,5)P₄ durch EhIPK-1 bei einem Assayvolumen von 160 µl und einer Enzymkonzentration von ca. 9,4 µg / ml

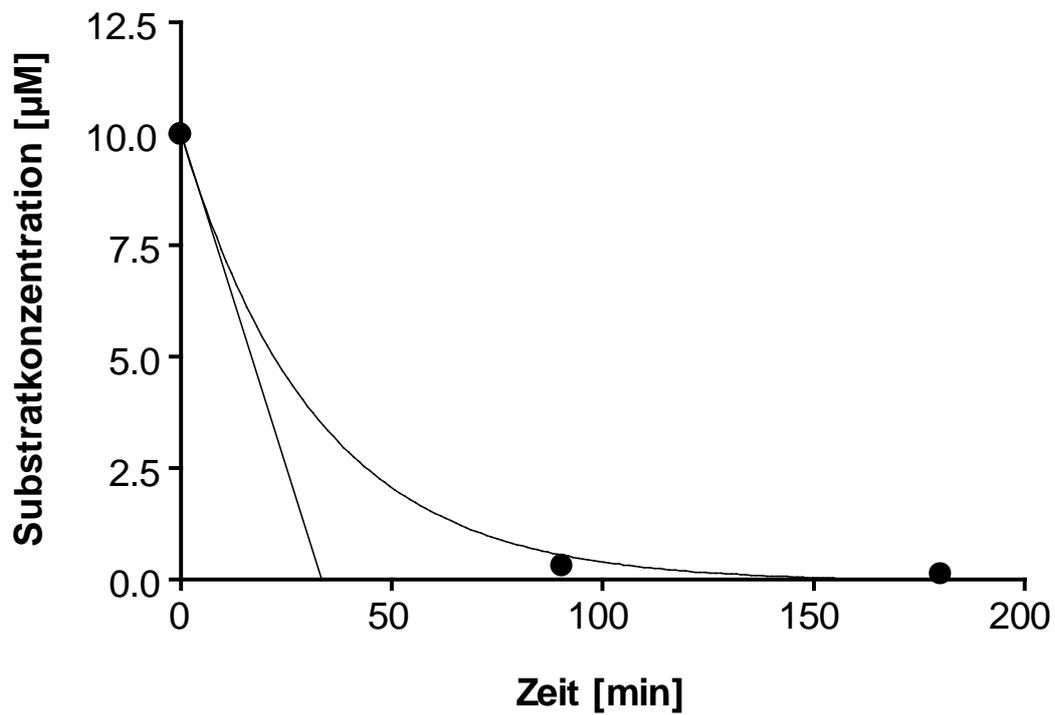
Ins(1456)P₄

Abbildung 5-50: Kinetik der Umsetzung von Ins(1,4,5,6)P₄ durch EhIPK-1 bei einem Assayvolumen von 160 µl und einer Enzymkonzentration von ca. 9,4 µg / ml

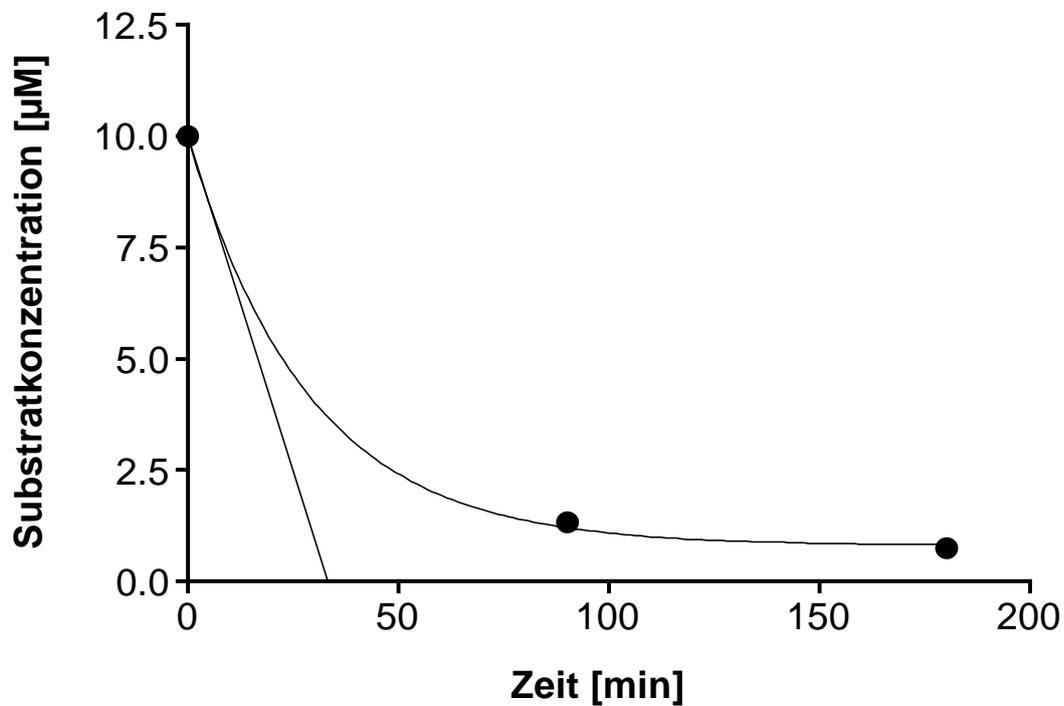
Ins(1346)P₄

Abbildung 5-51: Kinetik der Umsetzung von Ins(1,3,4,6)P₄ durch EhIPK-1 bei einem Assayvolumen von 160 µl und einer Enzymkonzentration von ca. 9,4 µg / ml

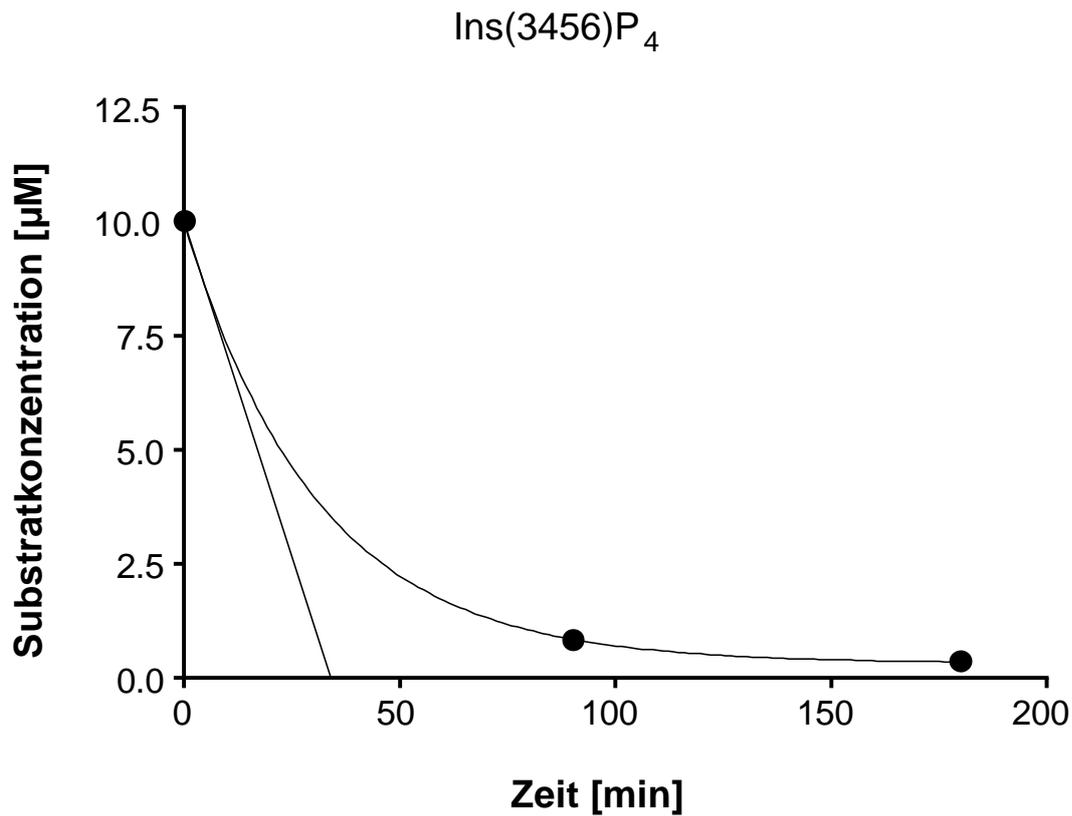


Abbildung 5-52: Kinetik der Umsetzung von Ins(3,4,5,6)P₄ durch EhIPK-1 bei einem Assayvolumen von 160 µl und einer Enzymkonzentration von ca. 9,4 µg / ml

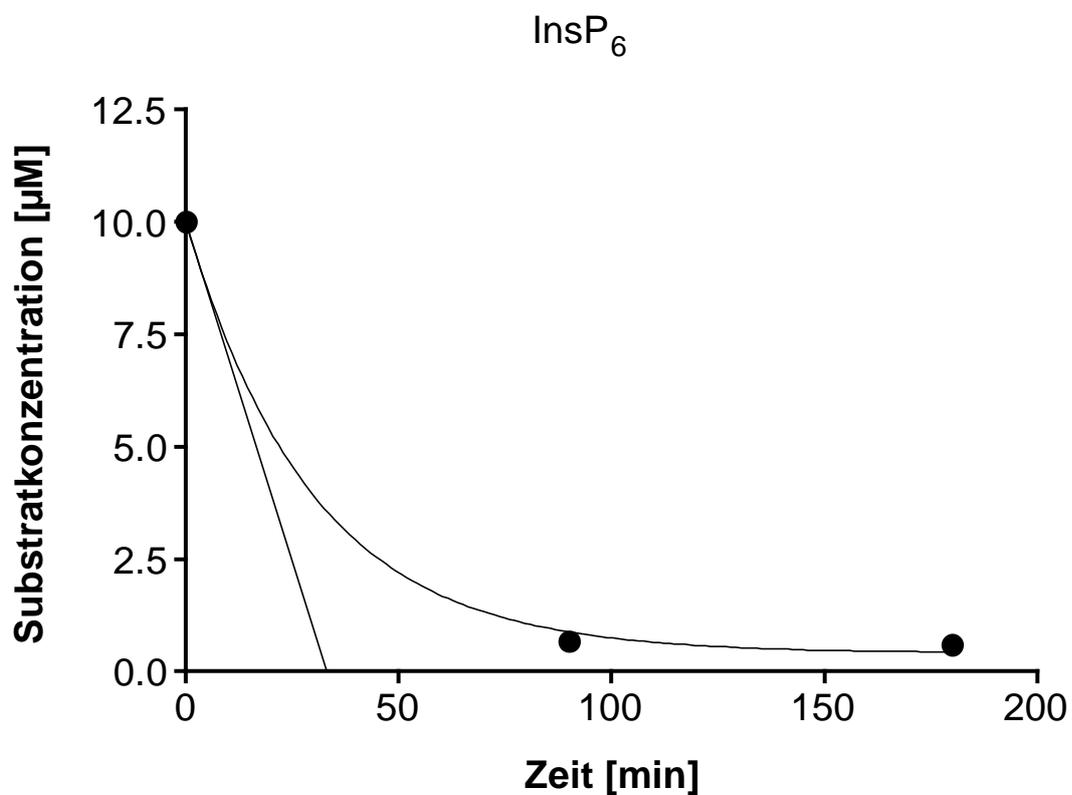


Abbildung 5-53: Kinetik der Umsetzung von InsP₆ durch EhIPK-1 bei einem Assayvolumen von 480 µl und einer Enzymkonzentration von ca. 5,2 µg / ml

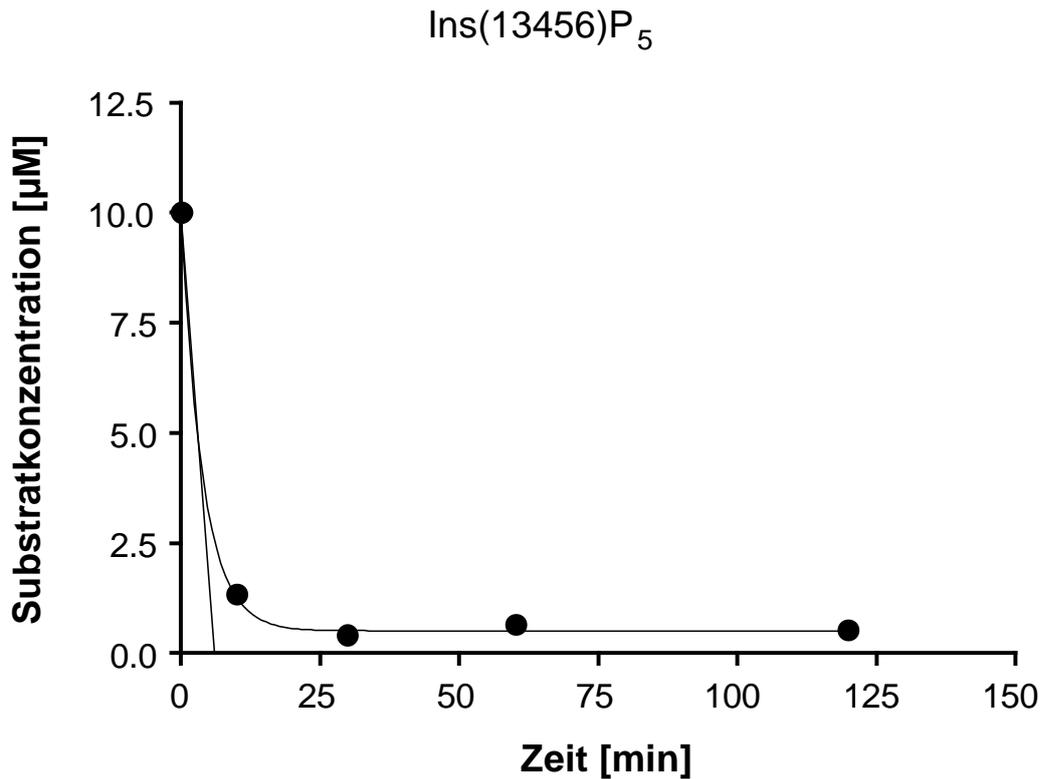


Abbildung 5-54: Kinetik der Umsetzung von $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ durch EhIPK-1 bei einem Assayvolumen von 480 μl und einer Enzymkonzentration von ca. 5,2 $\mu\text{g} / \text{ml}$

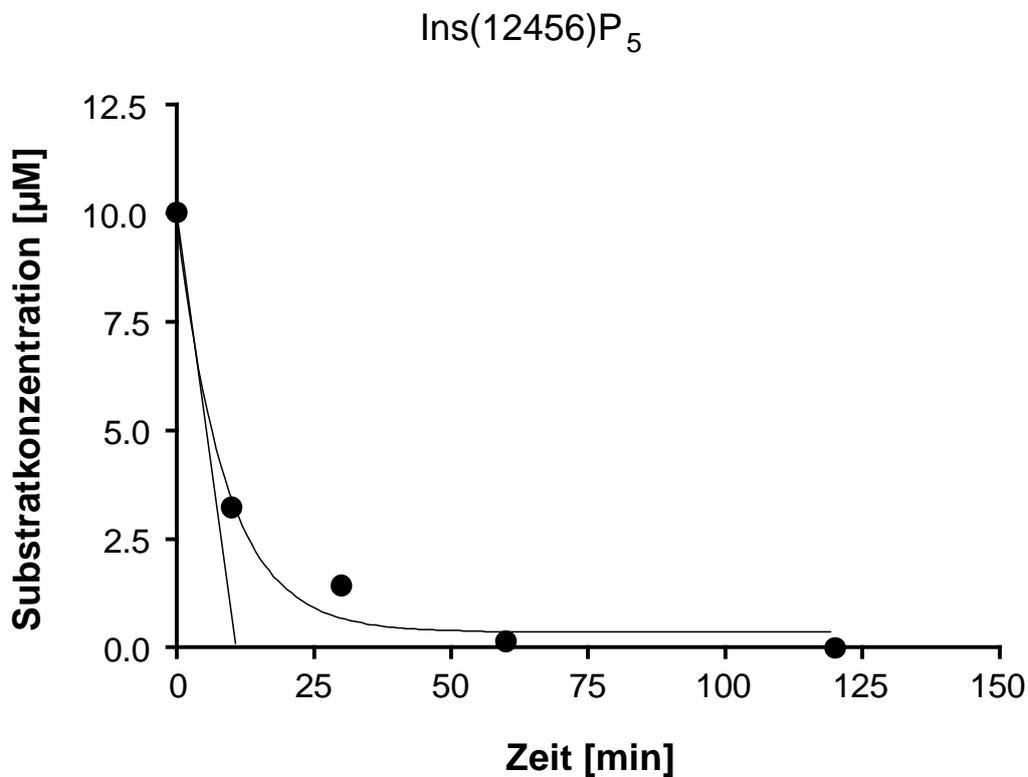


Abbildung 5-55: Kinetik der Umsetzung von $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$ durch EhIPK-1 bei einem Assayvolumen von 480 μl und einer Enzymkonzentration von ca. 5,2 $\mu\text{g} / \text{ml}$

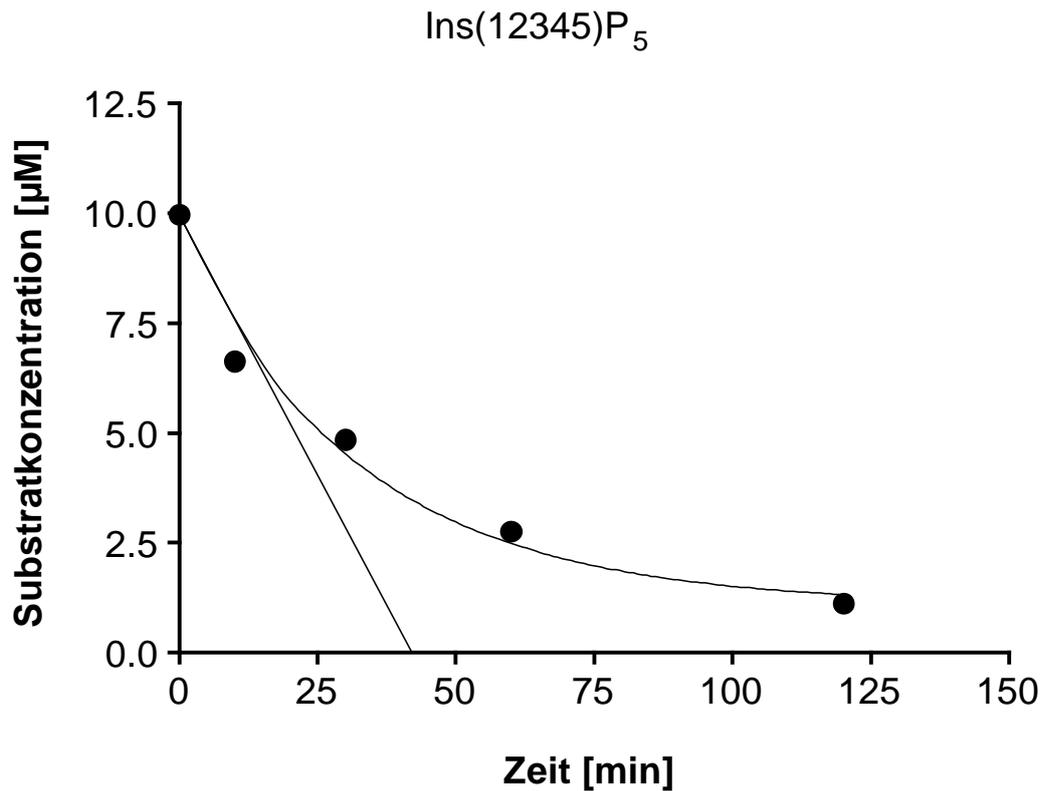


Abbildung 5-56: Kinetik der Umsetzung von Ins(1,2,3,4,5)P₅ durch EhIPK-1 bei einem Assayvolumen von 480 µl und einer Enzymkonzentration von ca. 5,2 µg / ml

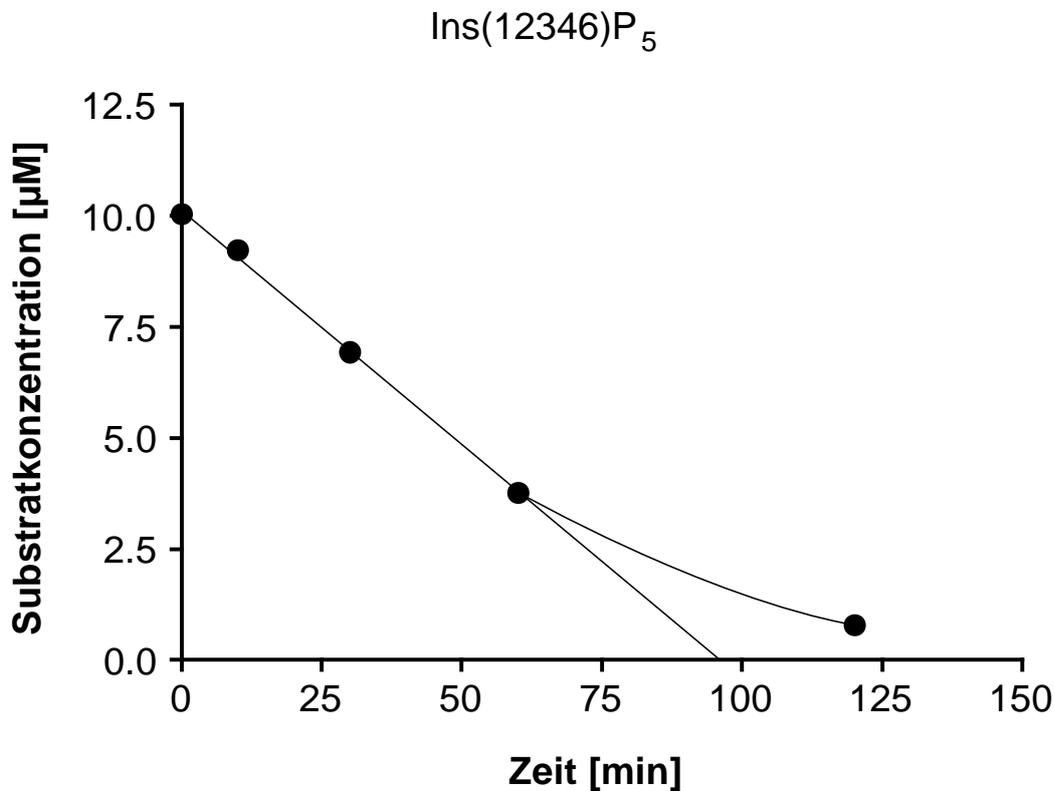


Abbildung 5-57: Kinetik der Umsetzung von Ins(1,2,3,4,6)P₅ durch EhIPK-1 bei einem Assayvolumen von 480 µl und einer Enzymkonzentration von ca. 5,2 µg / ml

Leitet man aus den dargestellten Diagrammen eine initiale Geschwindigkeit ab, und ist diese über längere Zeit linear oder 0. Ordnung, d.h. nicht abhängig von der Substratkonzentration, so lässt sich diese Rate gleich v_{\max} setzen. Ist die initiale Geschwindigkeit nicht linear über

die Zeit, sondern fällt mit der abnehmenden Substratkonzentration ab, so ist v_{initial} 1. Ordnung (d.h. abhängig von der Substratkonzentration) und muss damit unter v_{max} liegen (siehe auch Abbildung 5-58).

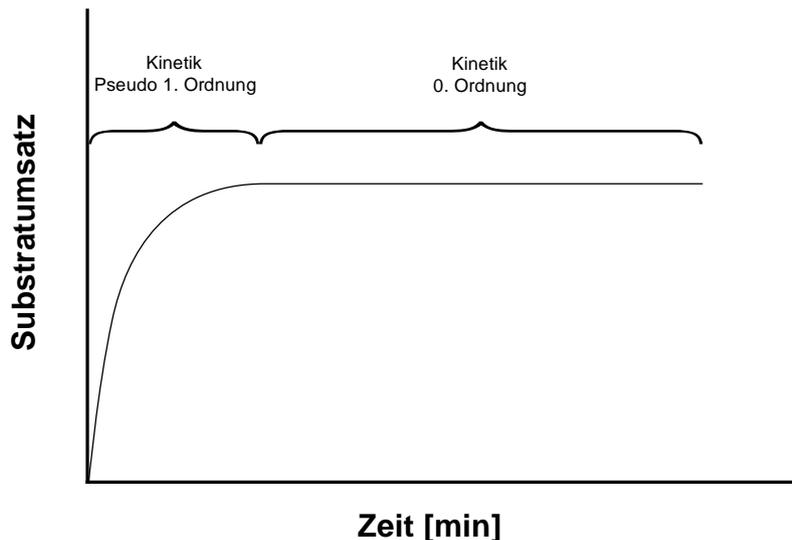


Abbildung 5-58: Kinetik Pseudo 1. Ordnung und Kinetik 0. Ordnung graphisch dargestellt

In den Fällen, in denen das Substrat schon beim ersten gemessenen Zeitpunkt maximal umgesetzt ist, lässt sich nur ein minimaler Wert v_{initial} 1. Ordnung aus einer exponentiellen Assoziationsfunktion grob abschätzen.

Die so geschätzten bzw. bestimmten Werte sind in Tabelle 5-3 gezeigt. Bei den Messungen handelt es sich lediglich um Annäherungen an die tatsächliche Aktivität des Enzyms. Lediglich für das Substrat $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ wurde eine v_{max} -Bestimmung nach Michaelis-Menten durchgeführt (siehe Kapitel 5.5.2).

Wie in Abbildung 5-46 bis Abbildung 5-57 zu sehen, konnten z.T. exponentielle Abnahmefunktionen abgeleitet werden. Die Datenlage bei den getesteten InsP_4 -Isomeren ist aufgrund der nur vorhandenen zwei Messpunkte nicht ausreichend, um den Substratumsetzungen Funktionen zuzuordnen: Bereits beim ersten Messpunkt ist das Substrat nahezu vollständig umgesetzt. Es drängt sich die Vermutung auf, dass die fast vollständige Metabolisierung der Substrate durch die EhIPK-1 schon weit vor dem ersten Messpunkt stattgefunden hat. Es wird hier jeweils annäherungsweise davon ausgegangen, dass der Umsetzung der InsP_4 -Isomere ebenfalls exponentielle Abnahmefunktionen zugrunde liegen.

In der Abbildung 5-47 und Abbildung 5-57 zeigt die Umsetzung von $\text{Ins}(1,4,6)\text{P}_3$ und $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$ am ehesten eine lineare Phase, erlauben also v_{max} -Bestimmungen.

Im Gegensatz hierzu zeigen die Substratumsetzungen der anderen InsP_5 -Isomere (ausgenommen $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$, das zum Zeitpunkt 10 min größtenteils umgesetzt worden war und aus diesem Grunde keine präzise exponentielle Anstiegsfunktion bestimmt werden konnte) und von $\text{Ins}(2,4,5)\text{P}_3$ die zu erwartenden exponentiellen Funktionen. Tabelle 5-3

zeigt die ermittelten Werte v_{\max} -Werte bzw. die minimal anzunehmenden v_{initial} -Werte im Überblick:

Substrat	Substrat [μM]	v_{initial}, spez. [$\mu\text{M}/\text{min}/\mu\text{g}$]	v_{\max}, spez. [$\mu\text{M}/\text{min}/\mu\text{g}$]
Ins(1,4,5)P ₃	50	0,35	-
Ins(1,4,6)P ₃	20	-	0,24
Ins(2,4,5)P ₃	20	0,19	-
Ins(1,3,4,5)P ₄	10	> 0,21	-
Ins(1,4,5,6)P ₄	10	> 0,20	-
Ins(3,4,5,6)P ₄	10	> 0,20	-
Ins(1,3,4,6)P ₄	10	> 0,20	-
Ins(1,2,3,4,5)P ₅	10	0,10	-
Ins(1,2,3,4,6)P ₅	10	-	0,25
Ins(1,2,4,5,6)P ₅	10	0,37	-
Ins(1,3,4,5,6)P ₅	10	0,66	-
InsP ₆	10	> 0,12	-

Tabelle 5-3: Bestimmte v_{\max} -Werte für die Umsetzung der getesteten Substrate der EhIPK-1

Vergleicht man die Daten der Tabelle 5-3 miteinander, so lässt sich feststellen, dass die EhIPK-1 die höchste Aktivität für die InsP₅-Isomere Ins(1,2,4,5,6)P₅ und Ins(1,3,4,5,6)P₅ besitzt. Es handelt sich also bei Ins(1,4,5)P₃ anscheinend nicht um das Hauptsubstrat der EhIPK-1. Vielmehr scheint die EhIPK-1 vor allem InsP₅-Isomere als Substrate zu bevorzugen und hierbei wiederum bevorzugt eine Pyrophosphorylierung durchzuführen. Dieser Sachverhalt wird in der Diskussion erneut aufgegriffen.

Für die InsP₄-Isomere und InsP₆ wurden ähnlich hohe Phosphorylierungsgeschwindigkeiten berechnet, die zwischen die v_{\max} -Werte für Ins(1,4,5)P₃ und die getesteten InsP₅-Isomere einzuordnen sind.

5.8 Identifizierung von Inhibitoren der EhIPK-1

Nach erfolgter Substrattestung und Bestimmung von Phosphorylierungsgeschwindigkeiten wurden polyphenolische Substanzen, basierend auf den Ergebnissen von Mayr et al. [2005], auf ihr inhibitorisches Potential bei der EhIPK-1 untersucht. Hierbei wurden in erster Linie Substanzen getestet, die bei IP3Ks als auch bei der IPMK einen inhibitorischen Effekt aufwiesen. Bei den getesteten Substanzen handelt es sich, wie in Kapitel 4.3.7.1.2 schon erwähnt, um Aurintricarbonsäure [ATA] ($M = 422,35 \text{ g / mol}$), Bengalrosa ($M = 1017,65 \text{ g / mol}$), Chlorogensäure ($M = 354,31 \text{ g / mol}$), Gossypol ($M = 518,6 \text{ g / mol}$), Methylenblau ($M = 319,8 \text{ g / mol}$), Quercetin ($M = 338,27 \text{ g / mol}$), Rottlerin ($M = 516,5 \text{ g / mol}$) und Robinetin ($M = 302,23 \text{ g / mol}$). Die Strukturen dieser Substanzen sind in Abbildung 5-59 bis Abbildung 5-65 dargestellt.

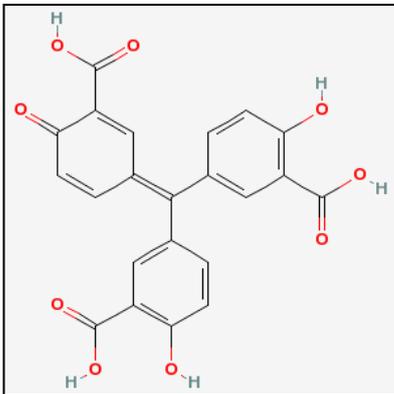


Abbildung 5-59: Struktur von Aurintricarbonsäure [ATA] ($C_{22}H_{14}O_9$)
ATA ist ein synthetisches Triphenylmethan-Analogon. Es handelt sich um einen potenten Inhibitor der *humanen* IPMK und der Isoform A der IP3K [Mayr et al., 2005].

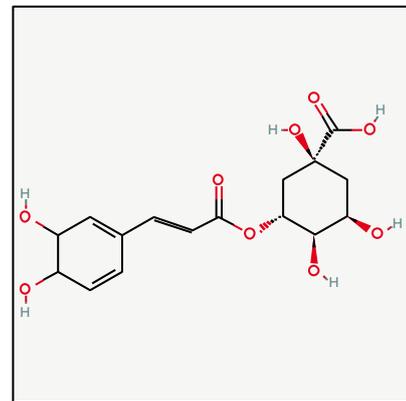


Abbildung 5-60: Struktur von Chlorogensäure ($C_{16}H_{18}O_9$)
Es handelt sich um einen spezifischen Hemmer der IPMK pflanzlichen Ursprungs [Mayr et al., 2005].

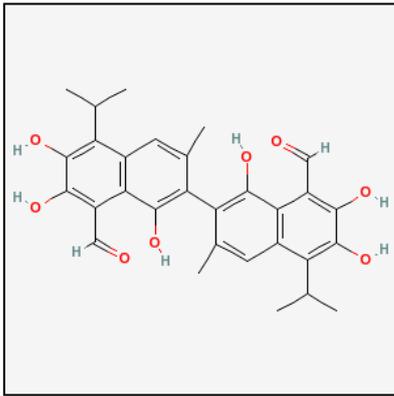


Abbildung 5-61: Struktur von Gossypol ($C_{30}H_{30}O_8$)

Es handelt sich um ein dimeres Triterpen pflanzlichen Ursprungs und um einen guten Inhibitor der *humanen* IP3K-A.

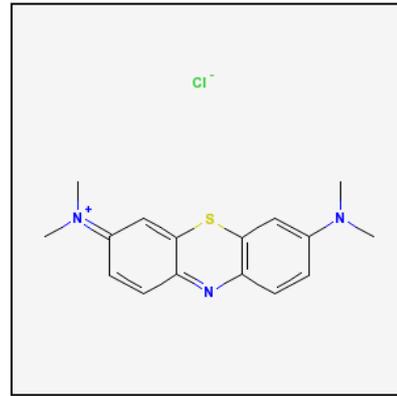


Abbildung 5-64: Struktur von Methyleneblau ($C_{16}H_{18}ClN_3S$)

Es wird u.a. als therapeutischer Ansatz bei Plasmodieninfektionen verwendet.

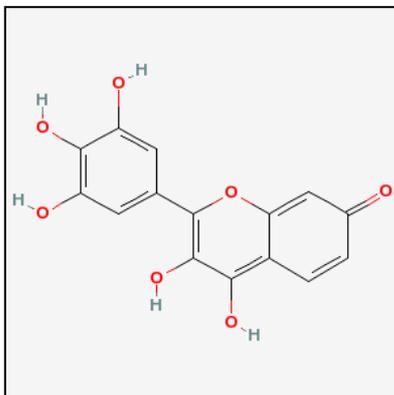


Abbildung 5-62: Struktur von Robinetin ($C_{15}H_{10}O_7$)

Es handelt sich um ein hoch hydroxyliertes pflanzliches Flavonol, das keinen bisher nachgewiesenen Effekt auf IPKs besitzt.

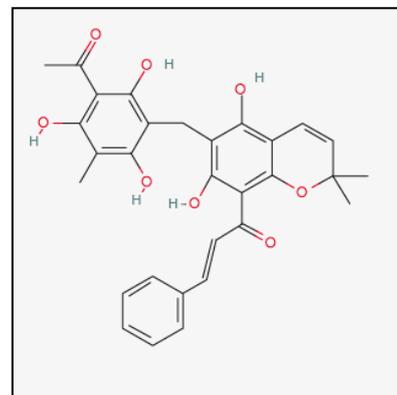


Abbildung 5-65: Struktur von Rottlerin ($C_{30}H_{28}O_8$)

Gschwendt et al. [1994] berichteten über ein inhibitorisches Potential bei Proteinkinasen (PKC).

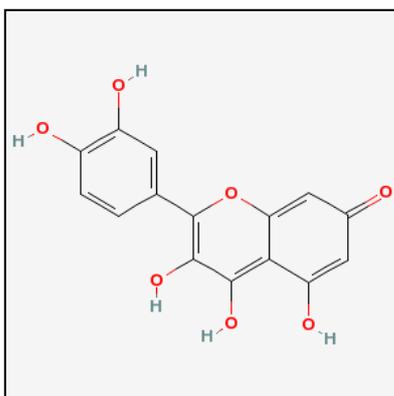


Abbildung 5-63: Struktur von Quercetin ($C_{15}H_{10}O_7$)

Quercetin erwies sich als potenter pflanzlicher Inhibitor bei der *humanen* IP3K-A [Mayr et al., 2005].

5.8.1 Bestimmung der IC₅₀-Werte für ausgewählte Hemmstoffe

Um in dieser Arbeit eine Aussage über die Potenz der getesteten Hemmstoffe machen zu können, wurden für die Inhibitoren IC₅₀-Werte ermittelt. Durch den **IC₅₀-Wert** wird die halbmaximale Hemmkonzentration von Inhibitoren für zelluläre oder makromolekulare Targets angegeben. Bei der Hemmung von Enzymen wird ermittelt, welche Konzentration des Hemmstoffs notwendig ist, um eine Reduktion der Enzymaktivität um 50 % zu erreichen. Je geringer der IC₅₀-Wert ist, desto potenter ist der inhibitorische Effekt des Hemmstoffs auf das untersuchte Enzym.

Die Bestimmung der IC₅₀-Werte erfolgte unter Standardbedingungen mit 25 µM Ins(1,4,5)P₃ und 1 mM ATP. Die Analyse wurde mittels Bestimmung des Substratverbrauchs durch MDD-HPLC-Analysen durchgeführt. Die Proben wurden zu den Zeitpunkten 60 min und 120 min entnommen. Die Auswertung erfolgte anhand der 120 min-Werte.

Es wurden Hemmstoffkonzentrationen von 0,1 µM bis 100 µM (in DMSO gelöst) eingesetzt und der Rückgang der Aktivität des Enzyms bzw. der Rückgang der Umsetzung des Substrats Ins(1,4,5)P₃ untersucht. Die Inkubationsphase erfolgte bei 30 °C nach einer Vorinkubation der 1,5 ml Eppendorf-Tubes (10 min). Bei Kontrollen mit DMSO bzw. ddH₂O wurde die Aktivität des Enzyms gemessen und mit 100 % bewertet. Die meist bei den zunehmenden Hemmstoffkonzentrationen abnehmende Aktivität der EhIPK-1 wurde ermittelt und in Relation zur Ausgangsaktivität der Kontrolle gesetzt. Die fraktionelle Abnahme der Aktivität des Enzyms spiegelte zugleich das inhibitorische Potential der eingesetzten Substanz wieder. In einem letzten Schritt wurde die abnehmende Aktivität der EhIPK-1 gegen die Hemmstoffkonzentration logarithmisch aufgetragen. Hierdurch ließen sich die IC₅₀-Werte bestimmen.

5.8.1.1 Effekte unterschiedlicher Polyphenole auf die Enzymaktivität der EhIPK-1

Alle oben genannten Substanzen wurden auf ihre enzymhemmende Wirkung getestet. Inhibitorische Effekte wurden allerdings nur mit den Substanzen Aurintricarbonsäure [ATA] (**IC₅₀-Wert = 2,45 µM**), Quercetin (**IC₅₀-Wert = 2,56 µM**), Bengalrosa (**IC₅₀-Wert = 3,20 µM**) und Gossypol (**IC₅₀-Wert = 9,11 µM**) erzielt. Die semilogarithmischen Dosis-Wirkungskurven sind im Folgenden dargestellt:

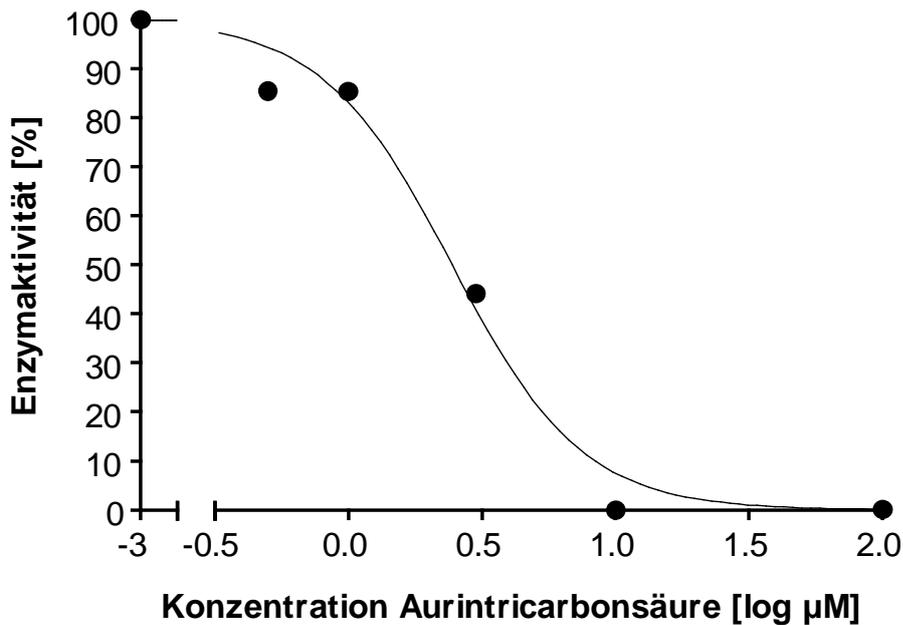


Abbildung 5-66: Dosis-Wirkungskurve von Aurintricarbonsäure [ATA]

Der Test fand unter Standardbedingungen mit 25 µM Ins(1,4,5)P₃ statt. Die Inkubationszeit betrug 120 min bei 30 °C.

In Abbildung 5-66 ist die Dosis-Wirkungskurve von ATA abgebildet. ATA besitzt ein sehr gutes inhibitorisches Potential. Der **IC₅₀-Wert** liegt bei ca. **2,45 µM**. Verglichen mit den anderen Hemmstoffen handelt es sich um den besten aufgespürten Inhibitor der EhIPK-1.

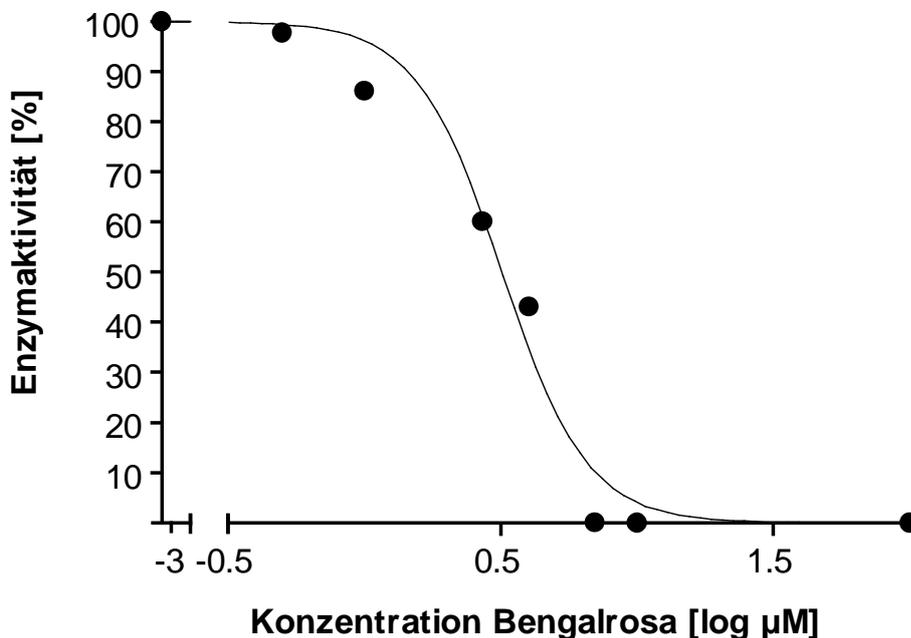


Abbildung 5-67: Dosis-Wirkungskurve von Bengalrosa

Der Test fand unter Standardbedingungen mit 25 µM Ins(1,4,5)P₃ statt. Die Inkubationszeit betrug 120 min bei 30 °C.

Abbildung 5-67 zeigt die Konzentrations-Wirkungskurve von Bengalrosa. Bengalrosa gehört auch zu den Hemmstoffen mit einer sehr guten Inhibierung der EhIPK-1. Der **IC₅₀-Wert** wurde mit **3,20 µM** bestimmt. Die Hemmung ist vergleichbar mit Quercetin und ATA, die

ebenfalls einen IC_{50} -Wert in diesem Bereich aufweisen.

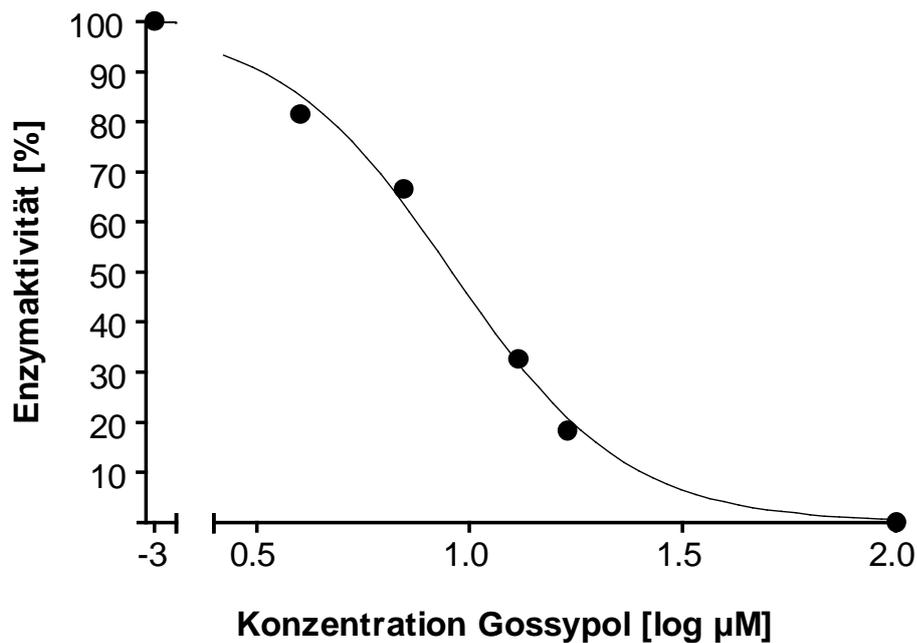


Abbildung 5-68: Dosis-Wirkungskurve von Gossypol

Der Test fand unter Standardbedingungen mit $25 \mu\text{M}$ Ins(1,4,5) P_3 statt. Die Inkubationszeit betrug 120 min bei 30°C .

Gossypol weist einen IC_{50} -Wert von $9,11 \mu\text{M}$ auf. Somit ist es der schwächste Inhibitor der EhIPK-1. Die Abbildung 5-68 zeigt die zugehörige Konzentrations-Wirkungskurve:

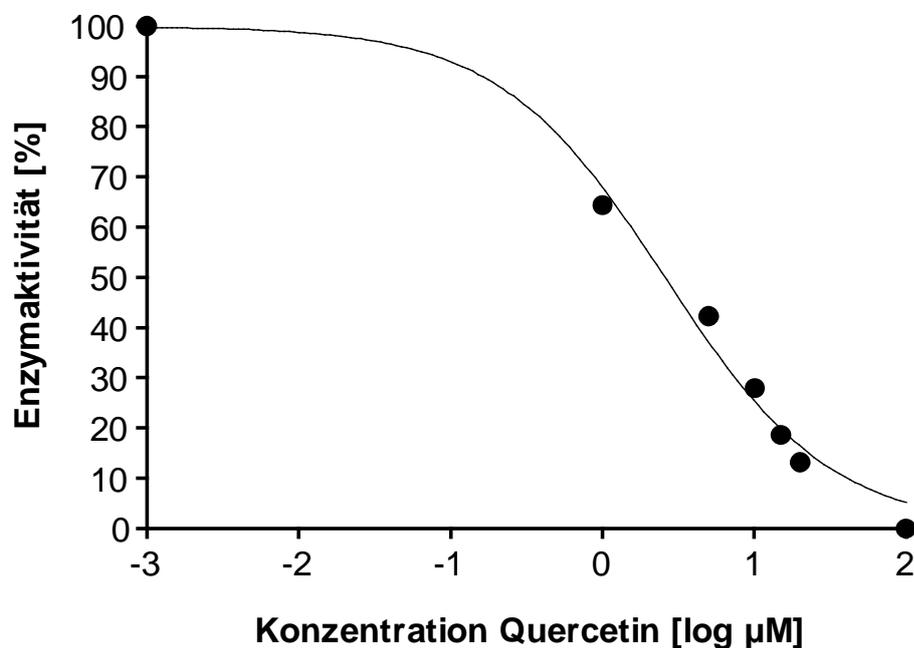


Abbildung 5-69: Konzentrations-Wirkungskurve von Quercetin

Der Test fand unter Standardbedingungen mit $25 \mu\text{M}$ Ins(1,4,5) P_3 statt. Die Inkubationszeit betrug 120 min bei 30°C .

Die Untersuchungen von Quercetin ergaben einen IC_{50} -Wert von $2,56 \mu\text{M}$. Quercetin war somit der zweitstärkste in dieser Arbeit aufgespürte Hemmstoff (siehe Abbildung 5-69).

Abschließend werden die potenten Inhibitoren in Tabelle 5-4 zusammengefasst:

Name des Inhibitors	IC₅₀-Werte potenter Inhibitoren der EhIPK-1 [μM]
ATA	2,45
Quercetin	2,56
Bengalrosa	3,20
Gossypol	9,11

Tabelle 5-4: Potente Inhibitoren der EhIPK-1

5.9 Klonierung einer IPK aus *Trichomonas vaginalis* [TvIPK-1] in den bakteriellen Expressionsvektor *pASK-IBA 5*

Neben der enzymatischen Untersuchung der EhIPK-1 wurde in einem zweiten Projekt eine ebenfalls von Prof. Dr. med. Mayr präparierte, bezogen auf das Molekulargewicht, kleinere IPK aus *Trichomonas vaginalis* [TvIPK-1] erfolgreich kloniert, exprimiert und enzymatisch untersucht. Hierfür wurde von Genscript ein *pUC 57*-Vektor mit der DNA-Sequenz der putativen IPK (vgl. Kapitel 5.2) geliefert. Auch diesmal wurde die Codon-Usage der zu exprimierenden DNA optimal an die anstehende Expression angepasst. Mit der Restriktionsendonuklease *Eco 31 I* wurde der *pASK-IBA 5*-Expressionsvektor geschnitten, um im nächsten Schritt die ebenfalls mit *Eco 31 I* geschnittene TvIPK-1-DNA in den Expressions-Vektor einzuligieren. Es schloss sich eine vollständige Insert-Sequenzierung an, um sicherzustellen, dass keinerlei Mutationen während des Schneidens und der Ligation aufgetreten waren. Nach der Sequenzidentitätsbestätigung durch Sequenzierung wurde die Expression durchgeführt (siehe Kapitel 5.10).

Das exprimierte Protein besteht aus 266 Aminosäuren mit einem theoretischen Molekulargewicht von 30,03 kDa. Die verschiedenen Aminosäuren mit ihrem prozentualen und absoluten Anteil sind in Tabelle 5-5 aufgeführt.

Aminosäure	Anzahl	Anteil [%]
Alanin [Ala (A)]	10	3,76
Cystein [Cys (C)]	5	1,88
Asparaginsäure [Asp (D)]	23	8,65
Glutaminsäure [Glu (E)]	15	5,64
Phenylalanin [Phe (F)]	12	4,51
Glycin [Gly (G)]	16	6,02
Histidin [His (H)]	7	2,63
Isoleucin [Ile (I)]	21	7,89
Lysin [Lys (K)]	19	7,14
Leucin [Leu (L)]	25	9,40
Methionin [Met (M)]	8	3,01
Asparagin [Asn (N)]	14	5,26
Prolin [Pro (P)]	11	4,14
Glutamin [Gln (Q)]	11	4,14
Arginin [Arg (R)]	11	4,14
Serin [Ser (S)]	20	7,52
Threonin [Thr (T)]	18	6,77
Valin [Val (V)]	12	4,51
Tryptophan [Trp (W)]	1	0,38
Tyrosin [Tyr (Y)]	7	2,63

Tabelle 5-5: Prozentualer und absoluter Anteil unterschiedlicher Aminosäuren an der TvIPK-1

Eine graphische Aufbereitung der Daten ist in Abbildung 5-70 zu sehen:

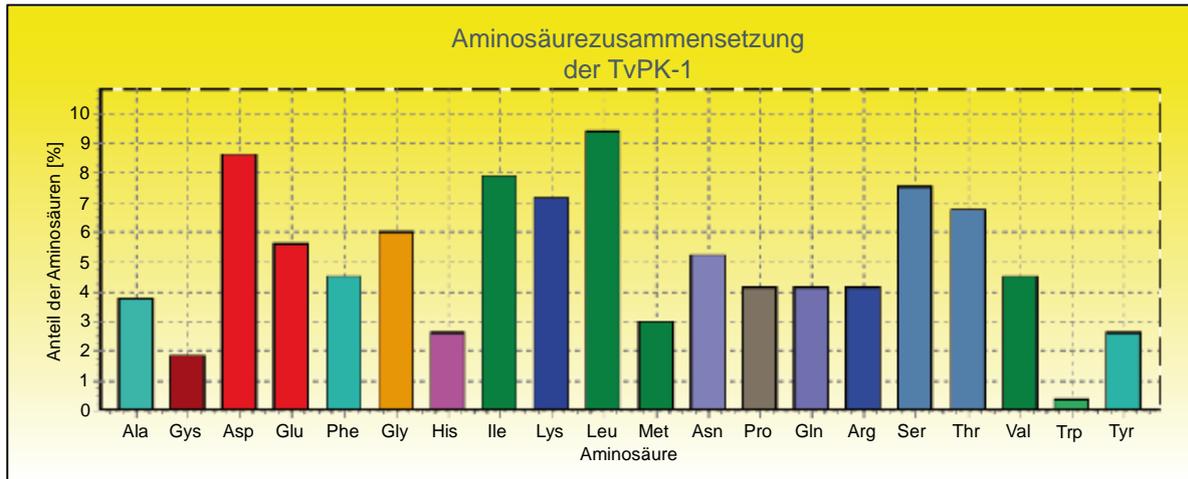


Abbildung 5-70: Prozentualer Anteil der Aminosäuren an der TvIPK-1

Betrachtet man die unterschiedlich geladenen Aminosäuren genauer und addiert man die Ladungen (vgl. auch Kapitel 5.2), handelt es sich bei der TvIPK-1 um ein stark negativ geladenes Enzym (-8 Ladungen), das im Bereich der Substratbindungstelle jedoch +6 Ladungen aufweist (siehe Abbildung 5-71).

Im Verlauf der Arbeit wurde von Carlton et al. [2007] das Genom von *Trichomonas vaginalis* vorgestellt. Unter der Accession-Nummer XP_001323250, in Abbildung 5-71 als TvIPK A bezeichnet, ist ein Gen beschrieben, das für eine putative Inositolhexakisphosphatkinase codiert. Die Aminosäuresequenz stimmt mit der in dieser Arbeit verwendeten und exprimierten IPK vollständig überein (siehe Abbildung 5-71).



Abbildung 5-71: Alignment der TvIPK-1 mit hoch homologen identifizierten Genen aus *Trichomonas vaginalis*

Außerdem konnten mit Hilfe von Alignments zwei weitere Gene gefunden werden, bei denen es sich anscheinend um Isoformen der selben Kinase handelt (siehe Abbildung 5-71). Es handelt es sich um die Gene TvIPK B (Accession-Nummer: XP_001312736.1) und TvIPK C (Accession-Nummer: XP_001302264.1).

5.10 Bakterielle Expression der TvIPK-1

Nach Klonierung wurde die Expression der TvIPK-1 in *E. coli* durchgeführt. Im Gegensatz zur Expression der EhIPK-1 wurde diesmal der bakterielle Expressionsvektor *pASK-IBA 5* verwendet. Die Expression bei diesem Vektor wurde durch Zugabe von Anhydrotetracyclin [AHT] induziert. Nach abgeschlossener Expression erfolgte eine Analyse des Expressionsversuchs mit einer SDS-PAGE. Die während der Expression entnommenen Aliquots (vor, 1 h nach Induktion, 2 h nach Induktion) wurden neben dem LMW-Marker auf das Gel in Abbildung 5-72 aufgetragen. Auf der SDS-PAGE ist eine Überexpression des Proteins zu erkennen (Spur 2 und 3). Man sieht eine Verstärkung der Bande etwas über der Höhe der 30 kDa-Bande des LMW-Markers. Somit deckt sich das theoretisch errechnete Gewicht des Enzyms mit dem auf der SDS-PAGE in Spur 2 und Spur 3 neu hinzugekommenen Protein.

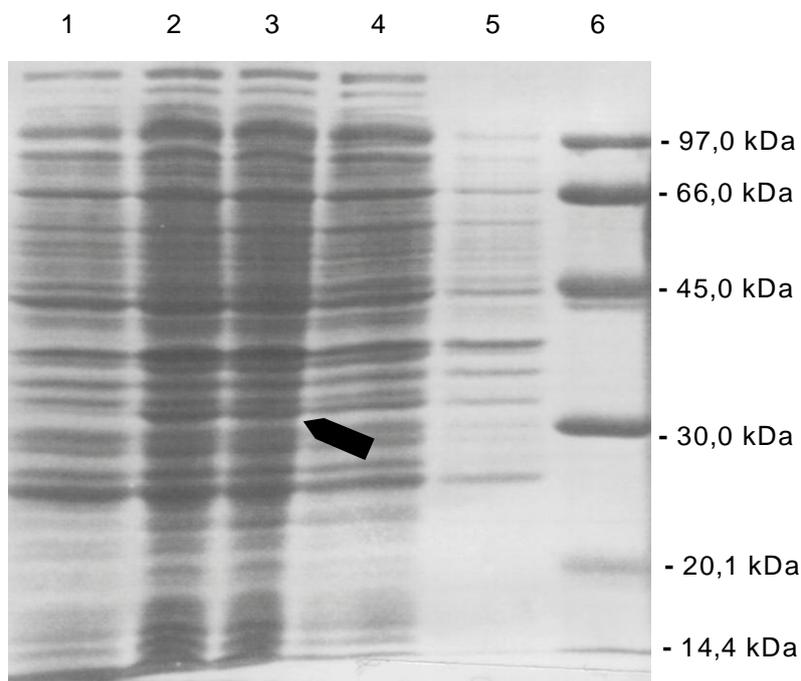


Abbildung 5-72: Analytische SDS-PAGE nach Überexpression der TvIPK-1

In der Abbildung sind die Spuren durchnummeriert: 1: Aliquot vor Induktion; 2: Aliquot 1 h nach Induktion; 3: Aliquot 2 h nach Induktion; 4: Lysat der Testlyse; 5: Pellet der Testlyse; 6: LMW; Der Pfeil zeigt die bei der Expression neu entstandene Bande.

5.11 Partielle Aufreinigung des Bakterienlysats der TvIPK-1 durch die P11- Phosphocellulose-Säule

Nach Lyse der Bakterien durch Sonifizierung (siehe Kapitel 4.3.2) wurde durch P11-Phosphocellulose-Chromatographie das Enzym aufgereinigt (siehe Kapitel 4.3.3.2 und Kapitel 5.4.1). Die SDS-PAGE (siehe Abbildung 5-73) nach der Aufreinigung enthält neben verschiedenen Wasch- und Eluatfraktionen auch den LMW-Marker.

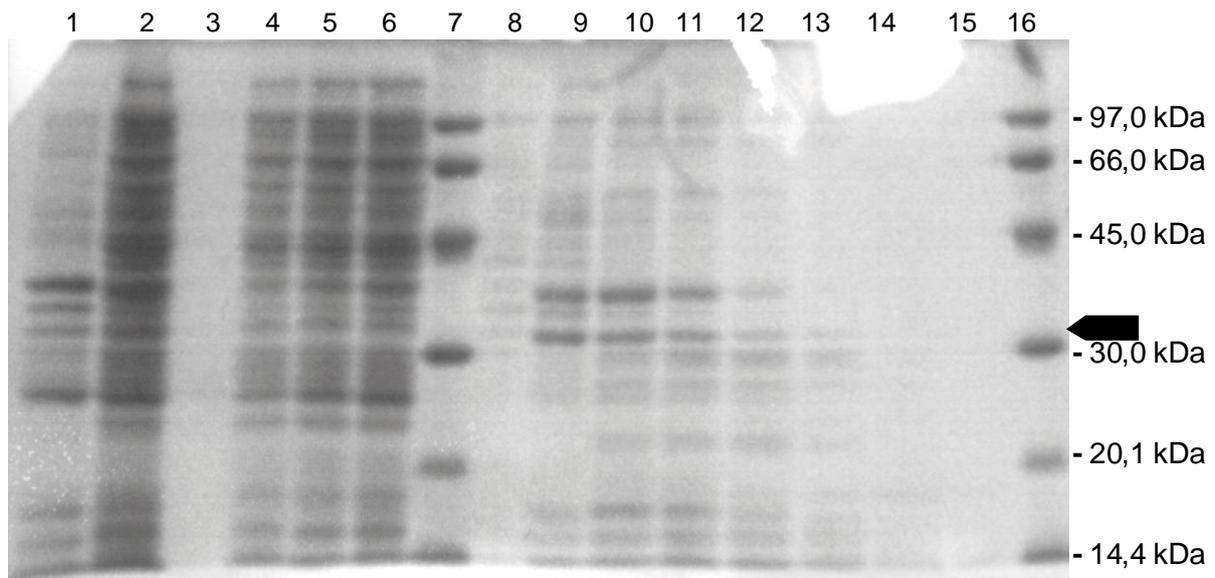


Abbildung 5-73: Analytische SDS-PAGE nach Aufreinigung der TvIPK-1 mit einer P11-Phosphocellulose-Säule

Die Spuren sind durchnummeriert: 1: Pellet-Probe; 2: Lysat der Testlyse; 3: Waschfraktion 1; 4: Waschfraktion 2; 5: Waschfraktion 3; 6: Waschfraktion 4; 7: LMW; 8: Eluatfraktion 1; 9: Eluatfraktion 2; 10: Eluatfraktion 3; 11: Eluatfraktion 4; 12: Eluatfraktion 5; 13: Eluatfraktion 6; 14: Eluatfraktion 7; 15: Eluatfraktion 8; Der Pfeil hebt das aufgereinigte Protein mit der höchsten Konzentration in Spur 9 hervor.

Zu sehen ist vor allem in den Eluatfraktionen 2,3 und 4 zwei verstärkte Banden über 30 kDa. Die späteren enzymatischen Untersuchungen zeigten, dass es sich hierbei tatsächlich um eine aktive IPK handelt.

5.12 Erste enzymatische Untersuchungen der TvIPK-1

Wie bereits erwähnt stand die EhIPK-1 im Mittelpunkt der Betrachtungen. Aus diesem Grunde wurden lediglich zwei Inositolphosphatsubstrate getestet: $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ zur Klärung, ob das Enzym eine IPMK ist und InsP_6 , das bevorzugt von IP6Ks umgesetzt wird. Weiterführende Experimente, um die volle Funktionsfähigkeit der TvIPK-1 zu untersuchen, könnten Bestandteil einer weiteren Arbeit sein.

5.12.1 Bestimmung der Substrateigenschaften von InsP_6

Dieser Versuch fand bei 30 °C unter Standardpufferbedingungen, einer eingesetzten ATP-Konzentration von 1 mM und einer Enzymkonzentration von ca. 6,8 µg / ml der TvIPK-1 statt.

Als Substrat diente InsP_6 (siehe auch Kapitel 5.12.3). Die Konzentrationen von InsP_6 wurde in diesem Versuch initial auf 1, 2, 5, 10 und 20 μM festgelegt. Die Ansatzvolumina variierten zwischen 180 μl und 1440 μl . Es erfolgte eine Vierpunktbestimmung: Aliquots aus dem Reaktionsansatz wurden nach 0 min, 30 min, 60 min und 120 min entnommen und mittels MDD-HPLC analysiert (siehe Kapitel 4.3.7). Die Auswertung erfolgte auch hier wieder anhand der 30 min-Werte (vgl. Kapitel 5.5.2), da hier der Substratumsatz über die Zeit noch annähernd linear und maximal war. Abbildung 5-74 zeigt ein klar kooperatives Verhalten des Enzyms für InsP_6 mit sigmoidalem Verlauf der Kurve. Aus diesem Verlauf ließ sich ein $S_{0,5}$ -Wert für das Substrats InsP_6 von **ca. 10 μM** abschätzen. Als spezifischer v_{max} -Wert wurde **> 0,6 $\mu\text{M} / \text{min}$** bzw. **> 0,088 $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$** geschätzt. Eine Approximation der v versus $[\text{S}]$ Beziehung ergab einen Hill-Koeffizienten von 1,8, was für ein mindestens dimeres Enzym mit 2 Substratbindungsstellen beim Umsatz von InsP_6 spricht.

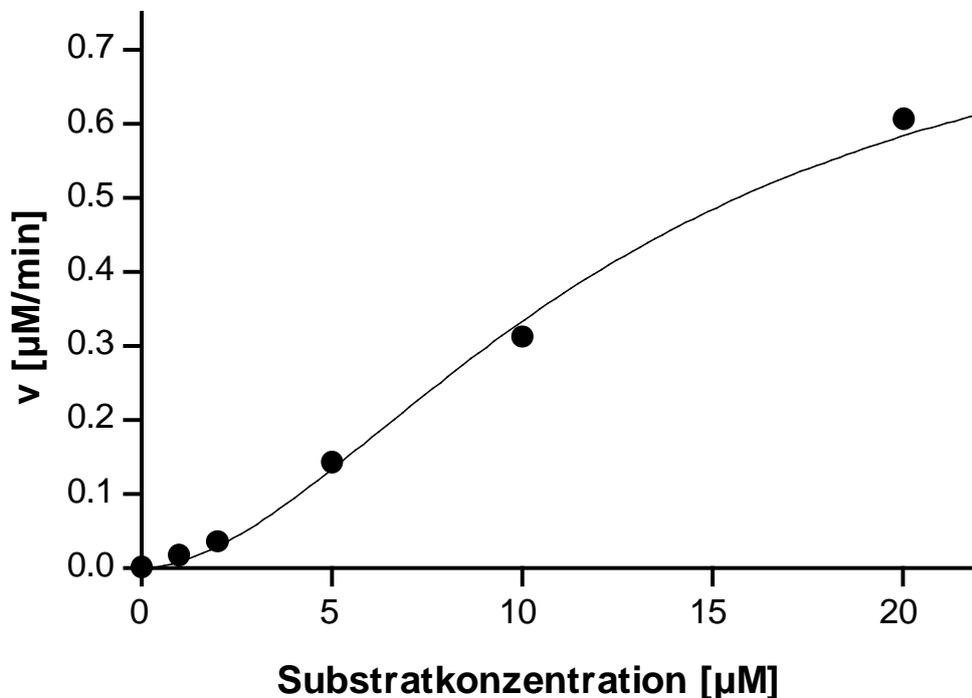


Abbildung 5-74: $S_{0,5}$ -Wert-Bestimmung für das vermutete Hauptsubstrat InsP_6 mit einer Enzymkonzentration von ca. 6,8 $\mu\text{g} / \text{ml}$ nach einer Inkubationsphase von 30 min. Verwendete Hill-Funktion: $y=(v_{\text{max}}*X^n)/(K+X^n)$ mit $n=1,8$

5.12.2 K_M -Wert-Bestimmung für ATP

Das Experiment wurde unter Standardpufferbedingungen mit einer Enzymkonzentration von ca. 10,25 $\mu\text{g} / \text{ml}$ des Enzyms durchgeführt. Die Ansatzvolumina betragen 80 μl . Die ATP-Konzentrationen wurden zwischen 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,75, 1,0 und 2,0 mM variiert. Als Substrat diente InsP_6 in einer Konzentration von 25 μM . Die Inkubation erfolgte bei 30 $^{\circ}\text{C}$ für 120 min. Der Versuch für die K_M -Wertbestimmung für ATP ergab einen K_M -Wert für **ATP** von **0,059 mM** (siehe Abbildung 5-75) und ist vergleichbar mit dem K_M -Wert der EhIPK-1 (siehe Kapitel 5.5.3). Als apparenter v_{max} -Wert wurde hier nur **> 0,20 $\mu\text{M} / \text{min}$** bzw. **> 0,020 $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$** gefunden, da InsP_6 nicht in Sättigungskonzentrationen > 100 μM eingesetzt

wurde und die Entnahme der Proben erst nach 120 min erfolgte. Auch bei der TvIPK-1 ist davon auszugehen, dass der v_{\max} -Wert bedeutend höher liegt als hier berechnet. In Verbindung mit der v_{\max} -Bestimmung aus Kapitel 5.12.1 wird der v_{\max} -Wert für InsP_6 auf mindestens $0,045 \pm 0,025 \mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$ geschätzt.

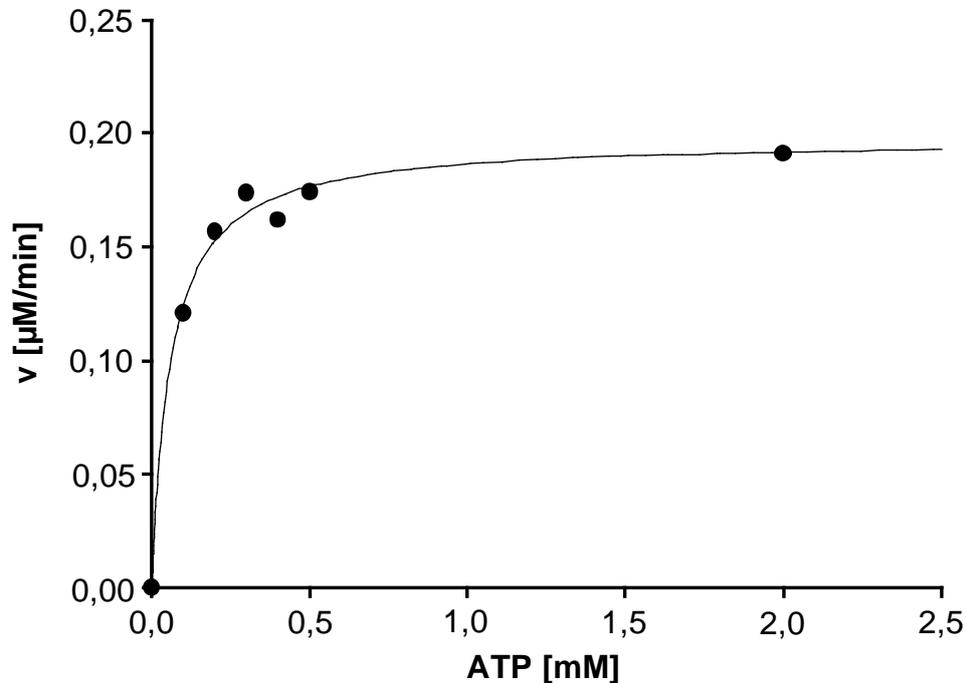


Abbildung 5-75: Bestimmung des K_M -Werts für ATP sowie des v_{\max} -Werts der TvIPK-1 ($10,25 \mu\text{g} / \text{ml}$) bei unterschiedlichen ATP-Konzentrationen und einer Inkubationsphase von 120 min mit initial $25 \mu\text{M} \text{InsP}_6$

5.12.3 Substratselektivität der TvIPK-1

Abbildung 5-76 zeigt die MDD-HPLC-Analyse der beim Einsatz von InsP_6 gefundenen Produkte. Das Experiment wurde unter Standardbedingungen mit 1mM ATP und $25 \mu\text{M}$ InsP_6 durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug 120 min bei 30°C .

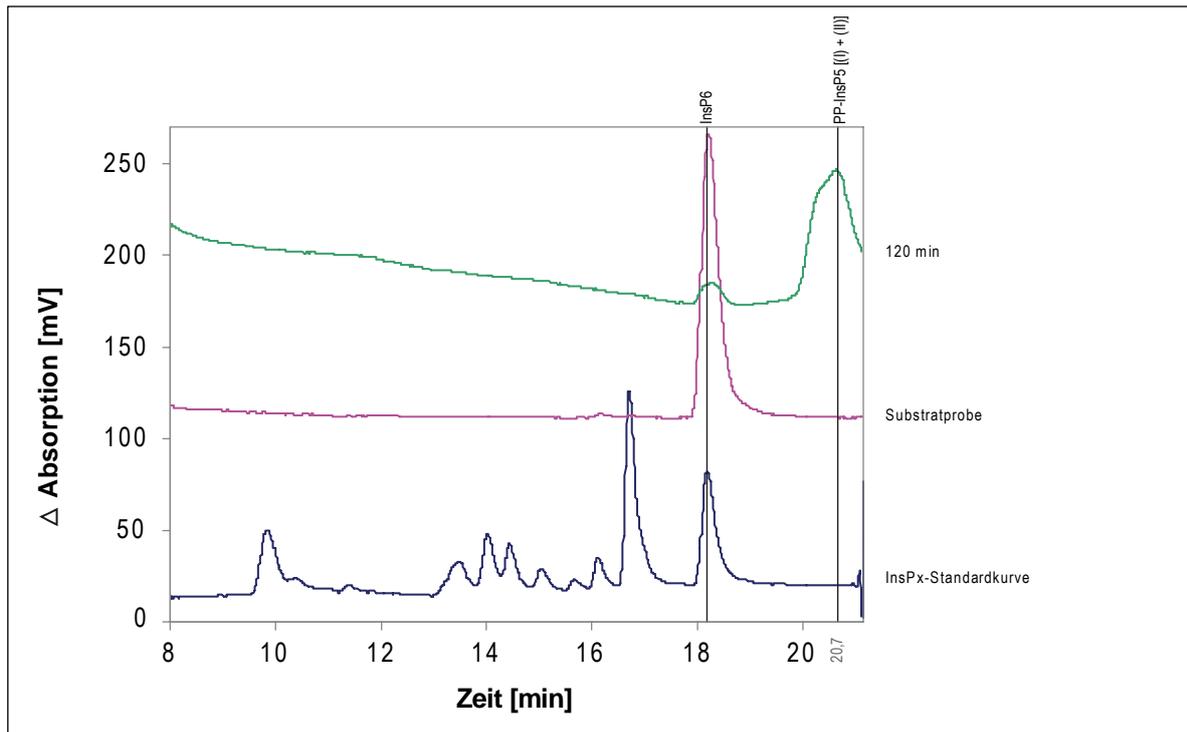


Abbildung 5-76: MDD-HPLC-Chromatogramm der TvIPK-1 nach einer Inkubationsphase von 120 min mit initial $25 \mu\text{M}$ InsP_6 , 1 mM ATP und einer Enzymkonzentration von ca. $10,25 \mu\text{g} / \text{ml}$

Als Produkt entsteht aus InsP_6 mindestens ein PP-InsP_5 -Isomer. Wahrscheinlich handelt es sich aber auch hier um zwei strukturell unterschiedliche PP-InsP_5 -Isomere [(I) + (II)].

Als zweites Substrat, um einen ersten Hinweis auf IPMK-Aktivität zu finden, wurden auch $25 \mu\text{M}$ $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ eingesetzt. Unter Einsatz dieses Substrats konnte keinerlei Aktivität des Enzyms nachgewiesen werden.



Abbildung 5-77: Umsetzung von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ und InsP_6 durch TvIPK-1

Es handelt sich also bei der TvIPK-1 offensichtlich um eine klassische InsP_6 -Kinase. Es kann zum jetzigen Zeitpunkt keine Differenzierung bezüglich der strukturellen Isomerie des entstandenen PP-InsP_5 -Isomers vorgenommen werden. Möglicherweise ist die TvIPK-1 auch in der Lage, ähnlich wie die EhIPK-1, InsP_8 zu bilden. Dies müsste mit einem angepassten Gradienten für die MDD-HPLC bewiesen werden.

6 Diskussion

6.1 Phylogenese der EhIPK-1 und TvIPK-1

In dieser Arbeit wurden zwei IPKs aus den Protozoen *Entamoeba histolytica* und *Trichomonas vaginalis* exprimiert und charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei der EhIPK-1 um eine atypische IPMK, bei der TvIPK-1 um eine IP6K handelt. Für die EhIPK-1 wurden außerdem spezifische Inhibitoren identifiziert.

Da sich IPKs im Laufe der Evolution der *Eukaryoten* stark verändert, verschiedene Substratselektivitäten und unterschiedliche Regulationsmechanismen entwickelt haben, ist es interessant, Aussagen über die phylogenetische Ähnlichkeit der EhIPK-1 und TvIPK-1 zu machen. Hierfür können Vergleiche von DNA- bzw. von Aminosäuresequenzen (vgl. auch Abbildung 5-1 und 5-2) herangezogen bzw. erstellt werden (sog. Genontologien). Hierbei wird ein Alignment paraloger (Isoformen / homologer Proteine innerhalb einer Spezies) bzw. orthologer (Isoformen / homologer Proteine zwischen Spezies) Sequenzen erstellt, um einen Genontologiebaum aufbauen zu können. Ziel der Erstellung phylogenetischer Bäume ist es, die Evolution möglichst detailliert zu erklären.

Prof. Dr. med. Mayr gelang es, neben einer Prädiktion von Strukturmodellen der EhIPK-1 (siehe Kapitel 6.3) auch phylogenetische Studien bezüglich der EhIPK-1 und TvIPK-1 anzustellen, die in Form eines Genontologiebaums (siehe Abbildung 6-1 und Abbildung 6-2) die Homologien bzw. Unterschiede zwischen den Isoformen / homologen Proteinen der beiden IPKs darstellen (vgl. auch Abbildung 5-1 und 5-2). Hierfür wurde vor allem das Programm Clustal X (<http://bips.u-strasbg.fr/fr/documentation/clustalx/>) benutzt ([Higgins und Sharp, 1988], [Higgins und Sharp, 1989], [Higgins et al., 1992], [Higgins et al., 1996], [Jeanmougin et al., 1998], [Thompson et al., 1994], [Thompson et al., 1997]).

Bei dem in den Abbildungen angegebenen phylogenetischen „Score“ handelt es sich um den sog. „Pairwise Distance Score“. Diese Methode evaluiert alle Sequenzpaare und transformiert die gefundenen Unterschiede in einen Score. Der Maßstab entspricht dem prozentualen Sequenzunterschied zweier verglichener Aminosäure-Sequenzen. Hierbei entspricht der Score von 1,0 einem Sequenzunterschied von 100 %. Der Score wird als Ergebnis einer durch die sog. „neighbor joining Methode“ errechneten phylogenetischen Stammbaumkonstruktion ermittelt ([N. Saitou und M.Nei, 1987], [Studier und Keppler, 1988]). Die Neighbor-Joining-Methode wird vor allem bei DNA- oder Proteinsequenzen angewendet, um durch die vorhandenen Merkmalsunterschiede der Datensätze, Rückschlüsse auf Abstammungs- oder Verwandtschaftsverhältnisse machen und schließlich einen phylogenetischen Baum erstellen zu können.

In diesem Zusammenhang wurde eine Korrektur sowohl für „multiple hits“ (mehrere gleichzeitige Mutationen pro Zeiteinheit) als auch für „back mutations“ (Mutationssequenz führt wieder zurück zur Ausgangs-Aminosäure) vorgenommen.

In Abbildung 6-1 und Abbildung 6-2 sind die Scores zwischen den Knoten (Verzweigungspunkt zweier Äste oder Stämme) bzw. dem Ende eines Astes, wenn es sich um einen am weitesten außen gelegenen Knoten handelt, angegeben. Um den Sequenzunterschied bzw. den phylogenetischen Score berechnen zu können, summiert man die Scores der einzelnen Knoten bis zum Astende.

Die angegebenen „Distance Scores“ können wegen der Errechnung durch paarweisen Sequenzvergleich auch in der Summe (innerster Knoten oder sog. Wurzel im radialen Stammbaum bis Ende eines Astes) größer als 1 sein. Grund ist vor allem, dass die prozentualen Sequenzunterschiede größer als erwartet werden. Bspw. ist dies dann der Fall, wenn zwei verglichene Sequenzen Insertionen oder Deletionen besitzen oder unterschiedlich lang sind. Derartige Sequenzen sind in der Abbildung 6-1 und Abbildung 6-2 gezeigt.

Die Zeitkalibrierung der phylogenetischen „Distance Scores“ geschieht unter der Annahme einer sog. neutralen Evolution (d.h. dem Fehlen sowohl einer positiven als auch einer negativen Selektion bestimmter Sequenzabschnitte in der Gesamtsequenz), die fast nie erfüllt sein dürfte. Für DNA-Sequenzen wurde eine neutrale Mutationsfrequenz geschätzt, die etwa 0,6 - 0,7 % der Sequenz in einem Zeitraum von 1 My (1 Megajahr = 1 Million Jahre) verändert. Legt man dieselbe Mutationsfrequenz für Aminosäuren zugrunde, so lässt man die stummen Mutationen außer Acht. 61 verschiedene Codons codieren für 20 verschiedene Aminosäuren, also ändert im Mittel nur jede dritte DNA-Sequenzänderung die Aminosäure-Sequenz. Daher kann geschätzt werden, dass bei Aminosäure Sequenzen 1 Megajahr zu ca. 0,2 bis 0,25 % Aminosäure-Sequenzunterschieden führt. Eine Skalengröße von 0,1 in den Stammbäumen entspricht, wie zuvor erklärt, 10 %. Dies ist zu vergleichen mit ca. 50 My phylogenetischer Distanz. Die Skalengröße 1 entspricht somit ca. 500 Mio Jahren oder ca. $\frac{1}{3}$ des Zeitraums der Existenz der Protisten und 50 % des Zeitraums der *Fungi* / *Metazoa*-Gruppe. Ein Score von 1,0 entspricht dann ca. 0,5 Gy (0,5 Gigajahre = 1 Milliarde Jahre).

Die Nomenklatur wurde in der Abbildung 6-1 und Abbildung 6-2 so gewählt, dass die „echten“ Isoformen / homologen Proteine, die sowohl Insertionen als auch Deletionen aufweisen können oder sich grundlegend anhand der Aminosäuresequenz unterscheiden (vgl. Abbildung 5-1 und 5-2), aufsteigend durchnummeriert wurden und sich an der Namensgebung der EhIPK-1 bzw. TvIPK-1 orientieren. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Alignments aus dem Ergebnisteil wurde nach Erstellung der phylogenetischen Bäume die Nomenklatur der EhIPK-1- bzw. TvIPK-1-Isoformen entsprechend ihrer phylogenetischen Verwandtschaft zueinander angepasst (vgl. Abbildung 5-1, Abbildung 5-2, Abbildung 6-1 und Abbildung 6-2). Hierbei kam es durchaus vor, dass die

maschinellen Prädiktionen in den Datenbanken nicht mehr mit den hier gezeigten Ergebnissen korrelierten.

Die sich sehr stark ähnelnden Isoformen / homologen Proteine erhalten neben der aufsteigenden Nummerierung noch zusätzlich Kleinbuchstaben, um die große Verwandtschaft bzw. Homologie kenntlich zu machen. Die kleinen Unterschiede bei den so gekennzeichneten Isoformen / homologen Proteinen können sowohl durch einige wenige abweichende Aminosäuren als auch durch divergente Enden (sog. „ragged ends“) entstehen.

In Abbildung 6-1 existieren drei Äste: Im oberen Drittel sind die sich gegenüber der TvIPK-1 verhältnismäßig stark unterscheidenden („echten“) Isoformen / homologen Proteine (TvIPK-5 bis TvIPK-8) abgebildet. Im mittleren Drittel sind neben der untersuchten TvIPK-1 (farblich in blau hervorgehoben) drei weitere sich verhältnismäßig stark unterscheidende Isoformen / homologen Proteine abgebildet (TvIPK-2 bis TvIPK-4). Zwei Isoformen / homologen Proteinen (TvIPK-2 und TvIPK-3) wurde eine weitere stark homologe Isoform / homologes Protein zugeordnet (TvIPK-2a und TvIPK-2b sowie TvIPK-3a und TvIPK-3b). Bei diesen a- und b-Formen könnte es sich um multiple allelische Sequenzunterschiede handeln, die aufgrund von Polyploidie in *Entamoeba*-Arten ([Das und Lohia, 2002], [Lohia, 2003]) vorhanden sind.

Die Isoformen / homologen Proteine der EhIPK-1 sind im letzten Drittel der Abbildung vertreten. Die charakterisierte EhIPK-1 ist farblich in rot hervorgehoben. Hierzu gibt es neben der EhIPK-1a noch eine weitere sehr homologe Form EhIPK-2 sowie eine deutlich distantere Form im selben Ast, EhIPK-3. Hiervon sind noch noch distantere „echte“ Isoformen / homologe Proteine, möglicherweise IP6Ks (EhIPK-4a, EhIPK-4b), von der ersten Gruppe EhIPK-1 bis EhIPK-3 zu differenzieren. Der Unterschied zur EhIPK-4a und EhIPK-4b beruht auf einer offensichtlich unvollständigen Sequenz.

In der Abbildung 6-1 wird deutlich, dass große phylogenetische Unterschiede zwischen den IPKs der beiden Protozoen existieren. Das Alignment der EhIPK-1 und TvIPK-1 mit anderen bereits bekannten IPKs (siehe Abbildung 5-3) zeigt, dass es kaum möglich ist, anhand von Aminosäuresequenzen eine korrekte Prädiktion des Funktionsumfangs der IPKs durchzuführen. Aus den Stammbäumen geht hervor, dass die Unterschiede derselben IPKs zwischen den Spezies größer sind, als die Unterschiede von verschiedenen IPKs innerhalb einer Spezies. Es handelt sich bei den beiden IPKs phylogenetisch gesehen vermutlich um sehr alte Inositolphosphatkinasen, die sich in ihrer Entwicklung schon früh voneinander getrennt haben.

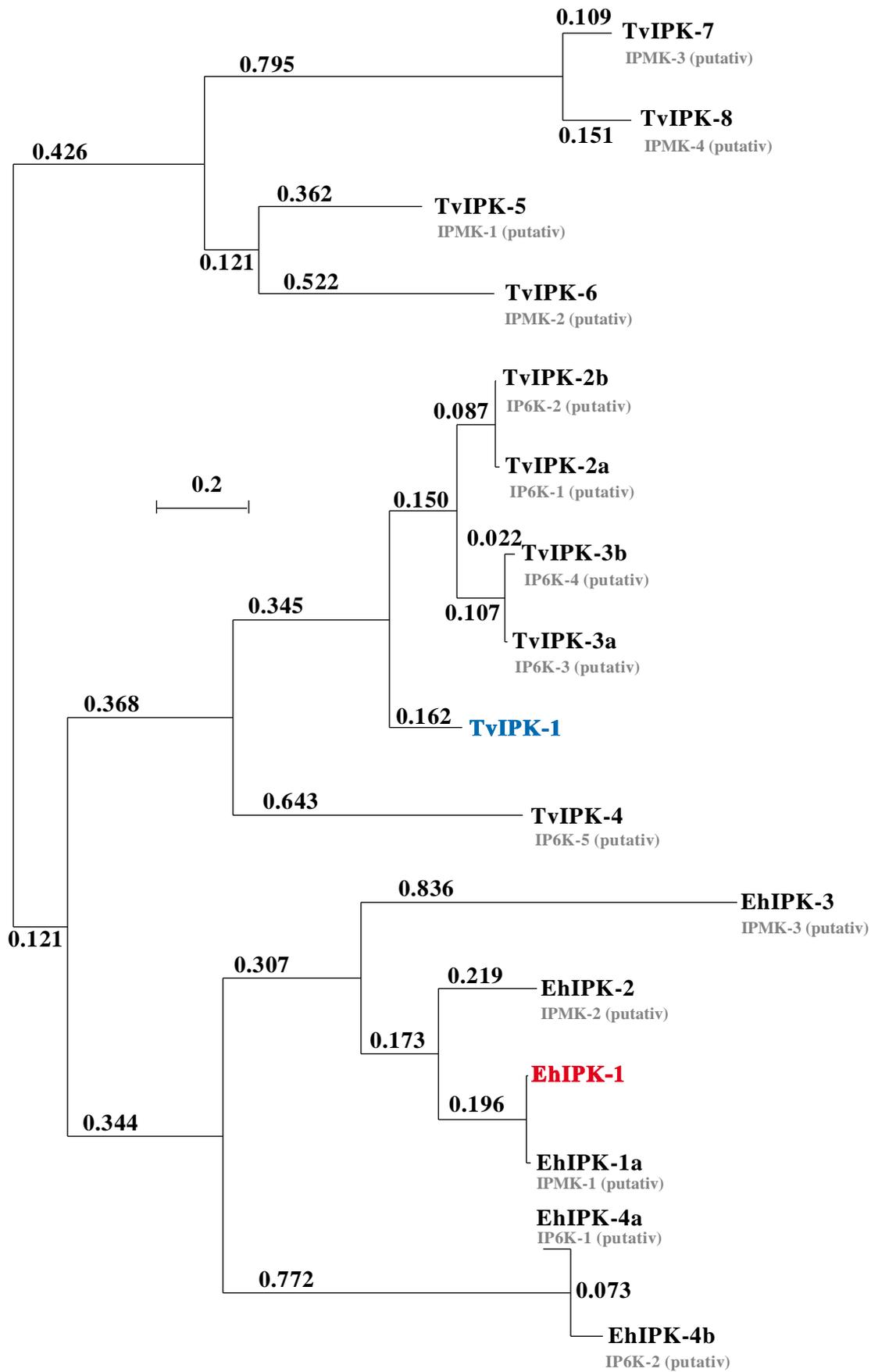


Abbildung 6-1: Phylogenetischer Stammbaum der Isoformen / homologen Proteine der EhIPK-1 und TvIPK-1
 Die untersuchten IPKs aus *Entamoeba histolytica* und *Trichomonas vaginalis* sind farblich hervorgehoben.

Abbildung 6-2 zeigt den oben besprochenen phylogenetischen Baum zum besseren Verständnis nochmals in radialer Form. Ausgehend vom Ursprung findet eine Aufspaltung des Baumes in zwei große Äste statt. Hierbei besteht der sich weiter verzweigende obere Ast aus den Isoformen der TvIPK. Dessen Unterteilung unterscheidet die putativen IP6K-Isoformen mit der TvIPK-1 von den putativen IPMK-Isoformen. Der untere Anteil des Baumes zeigt die Isoformen der EhIPK-1. Auch hier zeigt sich eine erneute Verzweigung, die die putativen IPMK-Isoformen inklusive der EhIPK-1 von den übrigen Isoformen der EhIPK (putative IP6Ks) trennt. Durch die Abbildung 6-2 wird ebenfalls deutlich, dass sich die Isoformen der EhIPK und TVIPK, auch wenn es sich hierbei möglicherweise um Kinasen mit identischer Substratspezifität handelt (z.B. IP6Ks), grundlegend in ihrer Phylogenese voneinander unterscheiden (s.o.).

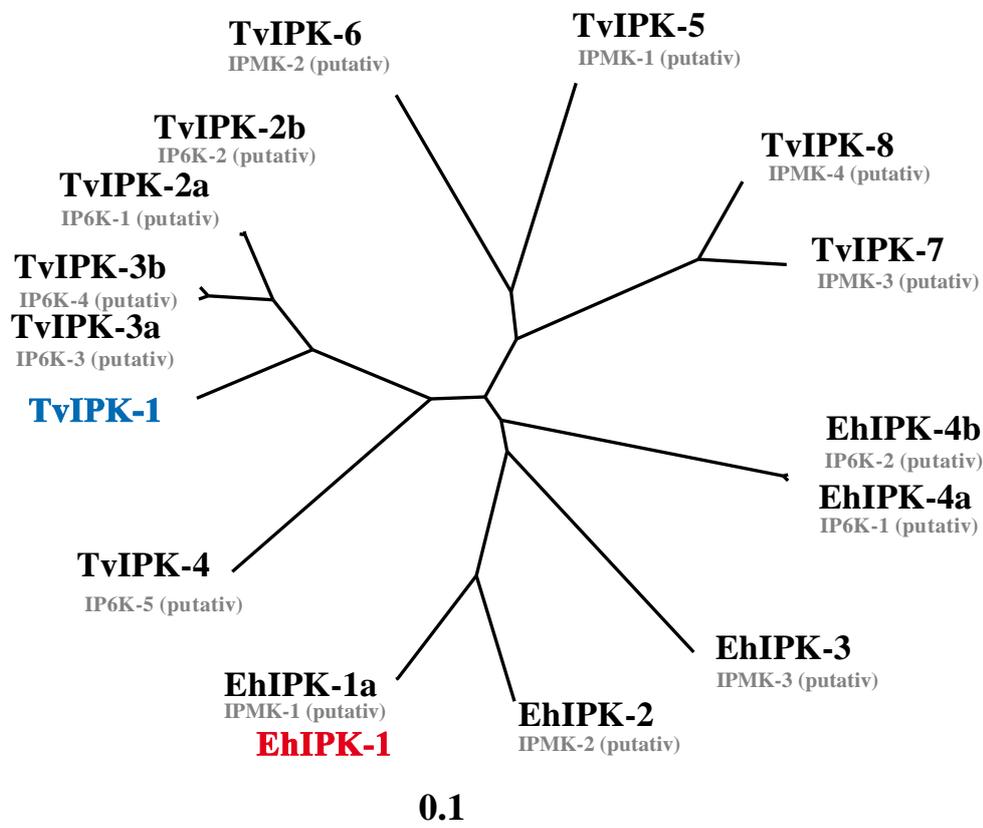


Abbildung 6-2: Phylogenetischer Stammbaum der Isoformen / homologen Proteine der EhIPK-1 und TvIPK-1 in radialer Form

Die durchgeführten phylogenetischen Untersuchungen zeigen eindeutig, dass die maschinellen Assignierungen für IPKs in vorhandenen Datenbanken bei weitem nicht ausreichend sind, um auf die Art der Inositolphosphatkinasen von Protozoen rückschließen zu können. Aus diesem Grunde müssen die in Datenbanken prädierten, durch Genomanalysen identifizierten IPKs bakteriell exprimiert und enzymatisch untersucht werden, um sie schließlich einer Gruppe von Inositolphosphatkinasen zuordnen zu können.

6.2 Struktur, biologische Funktion und Vergleich der EhIPK-1 mit ausgewählten IPKs

Der Ergebnisteil zeigte, dass die EhIPK-1 nicht eindeutig anhand ihrer Sequenz einer bekannten Gruppe von IPKs zuzuordnen ist. Raha et al. [1994, 1995] konnten zeigen, dass $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ und $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ wichtige Second Messenger in *Entamoeba histolytica* sind. Beide Inositolphosphate sind an der Calcium-Freisetzung aus internen Speichern und möglicherweise an der zytolytischen Aktivität von *Entamoeba histolytica* beteiligt, die durch die Sekretion proteolytischer Enzyme aus internen Granula vermittelt wird. Auch Ravdin et al. [1988] zeigten, dass die Lyse von Zielzellen durch *Entamoeba histolytica* von der Verfügbarkeit intrazellulären Calciums abhängig ist.

Giri et al. [1996] berichteten, dass die Bindung von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ an Rezeptoren sehr vom zellulären pH-Wert von *Entamoeba histolytica* abhängig ist. Schon bei einem pH-Wert von 6,5 war $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ nur noch zu 20%, verglichen mit dem Bindungs-Maximum, in der Lage, eine Bindung einzugehen. Ähnlich verhielt es sich mit $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$. Man geht davon aus, dass zwei unterschiedliche Calcium-Speicher in *Entamoeba histolytica* existieren, die von jeweils einem der Inositolphosphate kontrolliert werden.

Miller et al. [2005] beschrieben eine $\text{Ins}(1,3,4)$ triphosphat 5/6-Kinase von *Entamoeba histolytica*, die jedoch mit der in dieser Arbeit vorgestellten IPK sowohl strukturell als auch katalytisch nicht zu vergleichen ist. Bei der hier kurz vorgestellten Kinase handelt es sich vermutlich um eine Kinase der ATP-GRASP-Familie ([Artymiuk et al., 1996], [Fan et al., 1995], [Galperin und Koonin, 1997]).

Miller et al. [2005] differenzierten bei der Kinase eine N-terminale Domäne, eine zentrale Domäne und eine C-terminale Domäne. Abbildung 6-3 zeigt die 3D-Struktur der $\text{Ins}(1,3,4)$ triphosphat-5/6-Kinase nach Kristallisation.

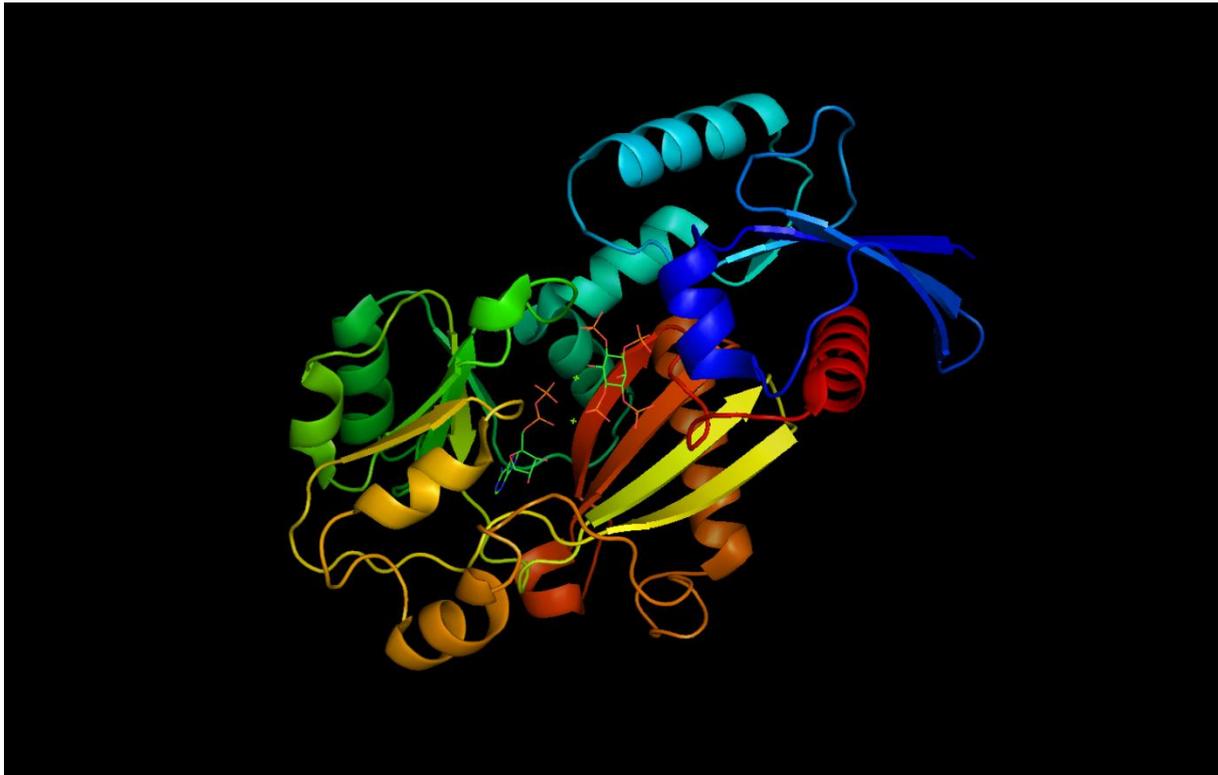


Abbildung 6-3: Strukturmodell nach Kristallisation der Ins(1,3,4)trisphosphat-5/6-Kinase der *Entamoeba histolytica* mit Bindung von Ins(1,3,4,6)P₄, ADP und Mg²⁺ [Miller et al, 2005]

Das von Miller et al. [2005] beschriebene Enzym war in der Lage, die Phosphat-Gruppe des ATPs auf Ins(1,3,4)P₃ an die D-5- oder D-6-OH-Gruppe zu übertragen. Dies geschieht jedoch niemals simultan, da das Enzym nur jeweils eine Phosphatgruppe übertragen kann. Außerdem besitzt die Kinase Ins(3,4,5,6)P₄-1-Kinasefähigkeit. Es wurde weiterhin beobachtet, dass das Enzym in der Lage war, Ins(1,3,4,5)P₄ und Ins(1,3,4,6)P₄ zu interkonvertieren, wobei hier noch nicht der genaue Reaktionsmechanismus bekannt ist. Es wird angenommen, dass das Enzym Phosphatase-Aktivität besitzt, und durch eine anschließende Phosphorylierung schließlich Ins(1,3,4,6)P₄ entsteht. Das Enzym bindet ATP in einer tiefen Spalte zwischen zentraler und C-terminaler Domäne, wodurch das Molekül fast vollständig eingeschlossen wird. Das Enzym konnte außerdem, im Gegensatz zum *humanen* Homologen, das nur unter extrem unphysiologischen Bedingungen in der Lage dazu ist, Ins(1,4,5)P₃ an D-3-Position phosphorylieren.

In Abbildung 6-4 ist zum Vergleich die Kristallstruktur des katalytischen Kerns der *humanen* Inositol(1,4,5)trisphosphat-3-Kinase A abgebildet [Gonzalez et al., 2004], die als Matrize für ein 3D-Modell der EhIPK-1 in Kapitel 6.3 dient.

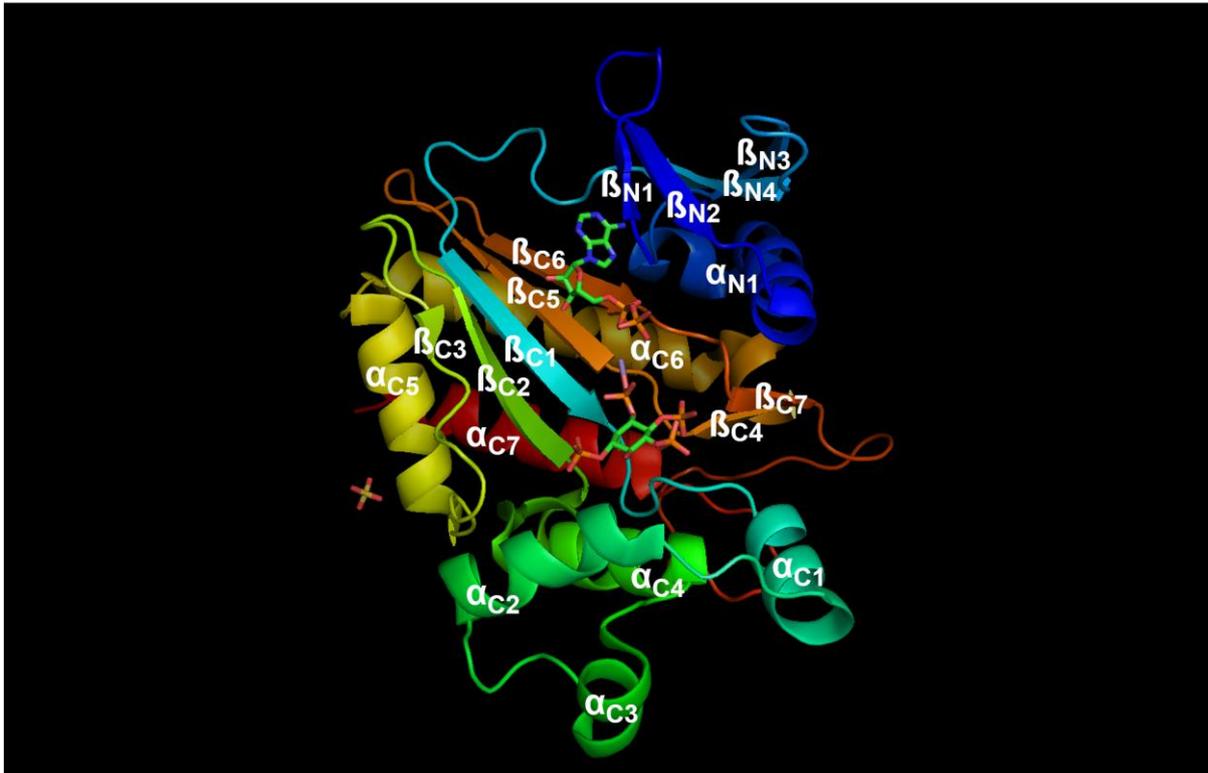


Abbildung 6-4: Kristallstruktur der *humanen* Inositol(1,4,5)trisphosphat-3-Kinase A mit Bindung von Mn^{2+} , ADP und Ins(1,3,4,5)P₄ [Gonzalez et al., 2004]

Sowohl in dieser Abbildung als auch in den Abbildungen 4-7 bis 4-11 wurden die α -Helices und β -Faltblattstränge aufsteigend durchnummeriert, um einen späteren Vergleich der Tertiärstrukturen der Modelle zu ermöglichen.

In der Abbildung sind die Sekundärstrukturen in Form von α -Helices und β -Faltblattsträngen aufsteigend beschriftet. Die Nomenklatur unterscheidet hierbei zwischen α -Helices und β -Faltblattsträngen sowohl im N-terminalen (α_{Nx} und β_{Nx}) als auch im C-terminalen (α_{Cx} und β_{Cx}) Anteil des Proteins. Die Nummerierung erfolgte aufsteigend vom N-Terminus zum C-Terminus. Diese Nomenklatur findet ebenfalls bei den putativen Tertiärstrukturmodellen in Kapitel 6.3 Anwendung, um einen Vergleich der Tertiärstrukturen der später gezeigten Modelle zu ermöglichen.

Wie bereits in der Einleitung besprochen, handelt es sich bei IP3Ks um IPKs mit der sogenannten PDKG-Signatur. Vermutlich ähnelt die abgebildete Kristall-Struktur aufgrund der Consensus-Motiv-Übereinstimmung eher der in dieser Arbeit behandelten EhIPK-1. Es ist nicht überraschend, dass neben dem PDKG-Motiv auch andere bekannte Motive vorhanden sind.

Die katalytische Domäne besteht aus insgesamt drei Lobi: Zwei Lobi binden das ATP. Der dritte Lobus bindet Inositolphosphat. Selbiger Lobus umschließt alle Phosphate von Ins(1,4,5)P₃ in einer positiv geladenen Tasche, wodurch die Substratselektivität der IPK erklärt wird [Gonzalez et al., 2004].

Bei der in dieser Arbeit vorgestellten Inositolphosphatkinase entstehen bei der Umsetzung unterschiedlicher InsP₅-Isomere rasch PP-InsP₄-Isomere. Wie in Kapitel 6.4 dargestellt, ist schon einiges über pyrophosphorylierte Inositolphosphate und deren biologische Funktion

bekannt. Es scheint sich hierbei um einen essentiellen Bestandteil des Inositolphosphatmetabolismus von *Entamoeba histolytica* zu handeln, da mindestens 26 Pyrophosphate von einer einzigen Kinase, der EhIPK-1, gebildet werden.

Bisher liegen noch keine Daten anderer IPKs aus Protozoen vor, wodurch ein Vergleich der Funktionalität mit der hier vorliegenden EhIPK-1 nicht erfolgen kann. Es ist daher nicht möglich zu beurteilen, ob es sich hierbei um ein einzigartiges Phänomen handelt, oder ob neben der hier besprochenen EhIPK-1 noch andere IPKs mit gleichem Funktionsumfang existieren. Eine nähere Betrachtung der TvIPK-1, deren Funktionalität während dieser Arbeit schon gezeigt werden konnte, könnte hier weitere Anhaltspunkte geben.

Nach jetzigem Kenntnisstand vereinigt die hier vorgestellte EhIPK-1 zum einen die Funktionsvielfalt einer IPMK, kombiniert mit den Fähigkeiten einer vor allem Pyrophosphate generierenden IP4K bis IP6K. Zusätzlich ist das Enzym in der Lage, weitere InsP_3 - und InsP_4 -Isomere zu phosphorylieren. Vergleicht man die EhIPK-1 mit der TvIPK-1 im K_M -Wert für ATP, so stellt man fest, dass beide Enzyme sehr ähnlich sind. Beide besitzen einen K_M -Wert, der sich bei der Berechnung nach Michaelis Menten mit ca. 0,059 mM errechnet. Auch die v_{\max} -Werte ähneln sich sehr: Die EhIPK-1 erreichte einen Wert von 0,038 $\mu\text{M} / \text{min} / \text{mg}$, die TvIPK-1 einen v_{\max} -Wert von $0,045 \pm 0,25 \mu\text{M} / \text{min} / \text{mg}$. Möglicherweise besitzen andere Protozoen-IPKs ähnliche Werte.

Verglichen mit anderen in der Literatur vorkommenden IPKs ([Nalaskowski et al., 2002], [Nalaskowski et al., 2003], [Deschermeier, 2005]) besitzt die EhIPK-1 bezogen auf $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ einen sehr hohen K_M -Wert von 34,3 μM . Zum jetzigen Zeitpunkt ist nicht bekannt, ob *Entamoeba histolytica* unter physiologischen Bedingungen derart hohe InsP_3 -Konzentrationen erreicht. Ein möglicher Erklärungsansatz für den hohen K_M -Wert könnte darin bestehen, dass $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ kein Hauptsubstrat der EhIPK-1 ist, und die Konversion dieses Substrats durch die EhIPK-1 wohl eher keine physiologische Bedeutung besitzt, sondern dass vielmehr eine andere Isoform aus dem paralogen Baum hierfür verantwortlich ist. Die Aktivitätsuntersuchungen in Kapitel 5.7 (vgl. Tabelle 5-3) legen nahe, dass es sich bei der EhIPK-1 in erster Linie um eine IP5K handelt (siehe auch Kapitel 6.5). Im Vergleich besitzt bspw. die bakteriell exprimierte und enzymatisch aktive RnIP3K-C (*Rattus norvegicus*), die zu ungefähr 75 % identisch mit der *humanen* HsIP3K-C ist, einen sehr niedrigen $K_M(\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3)$ -Wert von ungefähr 0,2 μM [Nalaskowski et al., 2003]. Deschermeier [2005] bestimmte für das Wildtyp-Enzym der GgIP3K-A (*Gallus gallus*) einen $K_M(\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3)$ -Wert von 0,69 μM . Nalaskowski et al. [2002] berichteten von einer erfolgreichen Klonierung einer Vollängen-DNA, die für eine *humane* Inositolphosphatmultikinase codiert. Damals wurde ein $K_M(\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3)$ -Wert von 0,28 μM ermittelt. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich der K_M -Wert der EhIPK-1 deutlich von den bereits bekannten und errechneten K_M -Werten anderer IPKs unterscheidet.

Tabelle 6-1 zeigt die gerade genannten K_M -Werte im Vergleich:

Name der Kinase	$K_M(\text{Ins}1,4,5)\text{P}_3$ -Wert [μM]
EhIPK-1	34,3
RnIP3K-C	0,2
GgIP3K-A	0,69
HsIPMK	0,28

Tabelle 6-1: K_M -Werte ausgewählter Kinasen im Vergleich

6.3 Putative Strukturmodelle der EhIPK-1

Nachdem Untersuchungen der Primärstruktur der EhIPK-1 in Form von Alignierungen der Aminosäurebasenabfolge mit bereits bekannten IPKs durchgeführt wurden, sollte nun auch die putative Sekundär- und Tertiärstruktur genauer betrachtet werden. Die Sekundärstruktur gibt Aufschluß über Strukturen wie α -Helices und β -Faltblattsträngen. Die Tertiärstruktur gibt die räumliche Lage der Sekundärstrukturen zueinander wieder.

Mittlerweile existieren, wie für putative 3D-Strukturmodelle auch (siehe unten), Programme, die eine Sekundärstruktur prädictieren können. Für in dieser Arbeit prädictierte Sekundärstrukturen wurde das im Internet frei verfügbare Programm NNpredict (www.cmpharm.ucsf.edu/~nomi/nnpredict.html) verwendet.



Abbildung 6-5: Prädiktion der Sekundärstruktur der EhIPK-1

Die α -Helices der Aminosäuresequenz sind in pink, die β -Faltblattstränge in blau gehalten.

Eine angefertigte Sekundärstrukturvorhersage ist in Abbildung 6-5 zu sehen. Insgesamt werden 14 α -Helices und 12 β -Stränge vorhergesagt.

Im Vergleich dazu ist eine zweite Sekundärstruktur-Vorhersage in Abbildung 6-6 abgebildet, die sich auf das weiter unten gezeigte putative Modell Nr. 1 der EhIPK-1 bezieht. Bei dieser Berechnung werden 5 α -Helices und 9 β -Faltblattstränge vorhergesagt. Es wird deutlich, dass sich die beiden Vorhersagen der Sekundärstrukturen deutlich voneinander unterscheiden. Jedoch existieren auch Bereiche, die sich ähneln oder sogar identisch sind. Besonders die C-terminalen Bereiche des Proteins scheinen in beiden Abbildungen reich an

Sekundärstrukturen zu sein. Abhängig von der benutzten Prädiktions-Methode werden somit unterschiedliche Vorhersagen gemacht.

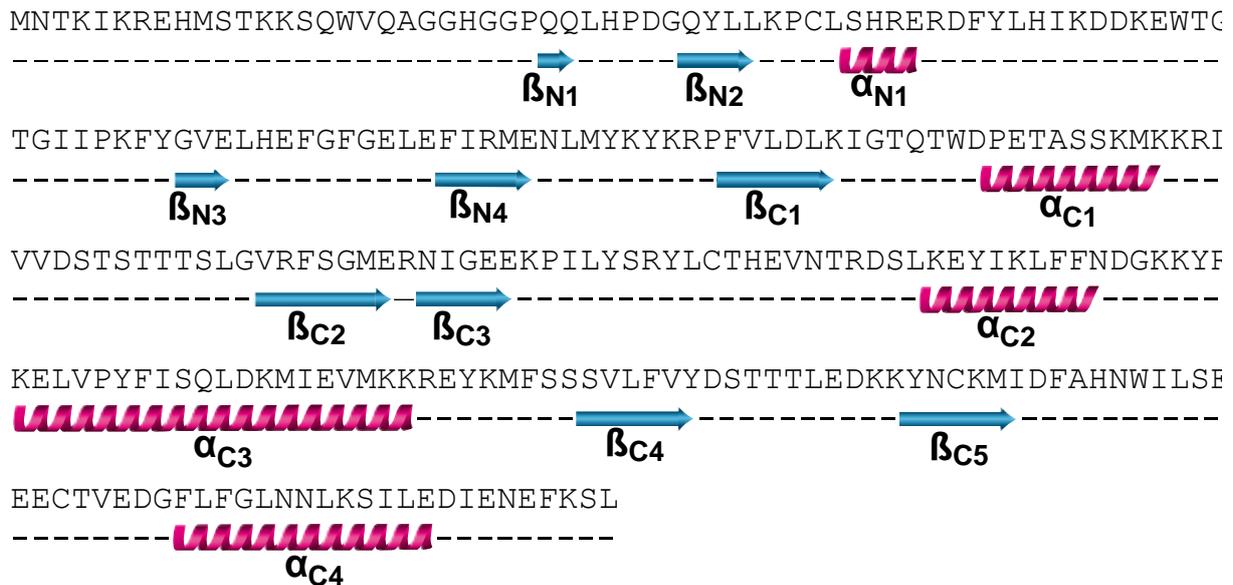


Abbildung 6-6: Prädiktion der Sekundärstruktur des Modells Nr.1 der EhIPK-1 (siehe Abbildung 6-7)

Die Abbildung zeigt die berechnete Sekundärstruktur des Modells Nr. 1 der EhIPK-1, die anhand der Matrize der Inositol(1,4,5)trisphosphat-3-Kinase B von *Mus musculus* erstellt wurde (siehe Abbildung 6-7). Auch hier sind die Sekundärstrukturen, die nach der Abbildung 6-7 benannt wurden, wie in Abbildung 6-5 farblich hervorgehoben.

Die Prädiktionen zeigen, dass eine genaue Bestimmung der Sekundärstruktur wie auch der Tertiärstruktur momentan nur durch Methoden wie bspw. mehrdimensionale NMR oder (Röntgen-)Kristallstrukturanalysen erfolgen kann.

Bei Proteinen ist ihre charakteristische 3D-Struktur für biologische Funktionen essentiell. Nach bzw. während der Translation der Proteine wird das Protein in die biologisch aktive Form durch Proteinfaltung überführt. Bei der Protein-Faltung spielen Chaperone eine wichtige Rolle. Die Tertiärstruktur wird unter anderem durch Disulfidbrücken, Ionenbindungen und Wasserstoffbrückenbindungen aufrechterhalten und stabilisiert.

Die heutige Bioinformatik beschäftigt sich auch mit 3D-Strukturmodellen von Proteinen, indem Algorithmen und Methoden entwickelt werden, die es zum Teil ermöglichen, Strukturmodelle zu präzisieren.

Prof. Dr. med. Mayr erstellte erste putative Tertiärstrukturmodelle der EhIPK-1. Für die Erstellung der Modelle erfolgten zunächst Sequenz-Alignierungen mit bereits bekannten in der 3D-Struktur (durch Kristallographie) aufgeklärten *Fungi-Metazoa*-IPKs. Abhängig von der Homologie der EhIPK-1 mit entsprechenden Proteinen wurden 3D-Strukturmodelle mittels des Programms CPH (Serverbasierte automatische 3D-Strukturvorhersage) erstellt (siehe Abbildung 6-7 bis Abbildung 6-11). Die Matrizenstrukturen werden durch Pdb-Files, die aus der RCSB Protein-Data-Bank (www.rcsb.org/pdb/home/home.do) stammen, im Einzelnen ebenso genannt wie die zugehörigen Literaturverweise. Die Alignments werden im Anhang gezeigt. Die Prädiktion der 3D-Modelle erfolgte wie bereits weiter oben beschrieben mit den

beiden Programmen CPH-models-2.0 (www.cbs.dtu.dk) und EsyPred3D (www.fundp.ac.be/sciences/biologie/urbm/bioinfo/esypred) [Lambert et al., 2002]. Zur Visualisierung der Strukturmodelle fand das Programm Pymol (DeLano Scientific LLC) Anwendung.

Im Einzelnen werden die putativen 3D-Strukturmodelle gezeigt. Diese Modelle wurden der *humanen* Inositol(1,4,5)trisphosphat-3-Kinase A (siehe Abbildung 6-4), die der EhIPK-1 strukturell wahrscheinlich am ehesten gleicht, gegenübergestellt und mit ihr verglichen.

Bei Abbildung 6-7 handelt es sich um ein Modell der EhIPK-1, das als Matrix die Struktur der A-Kette der dimer kristallisierten katalytischen Domäne der Inositol(1,4,5)trisphosphat-3-Kinase B aus *Mus musculus* [Chamberlein et al., 2005] benutzte.

Es ist ein sehr gut gefaltetes Protein-Struktur-Modell zu sehen, das 4 N-terminale und 5 C-terminale β -Faltblattstränge, gestaltet zu zwei β -Faltblättern, enthält.

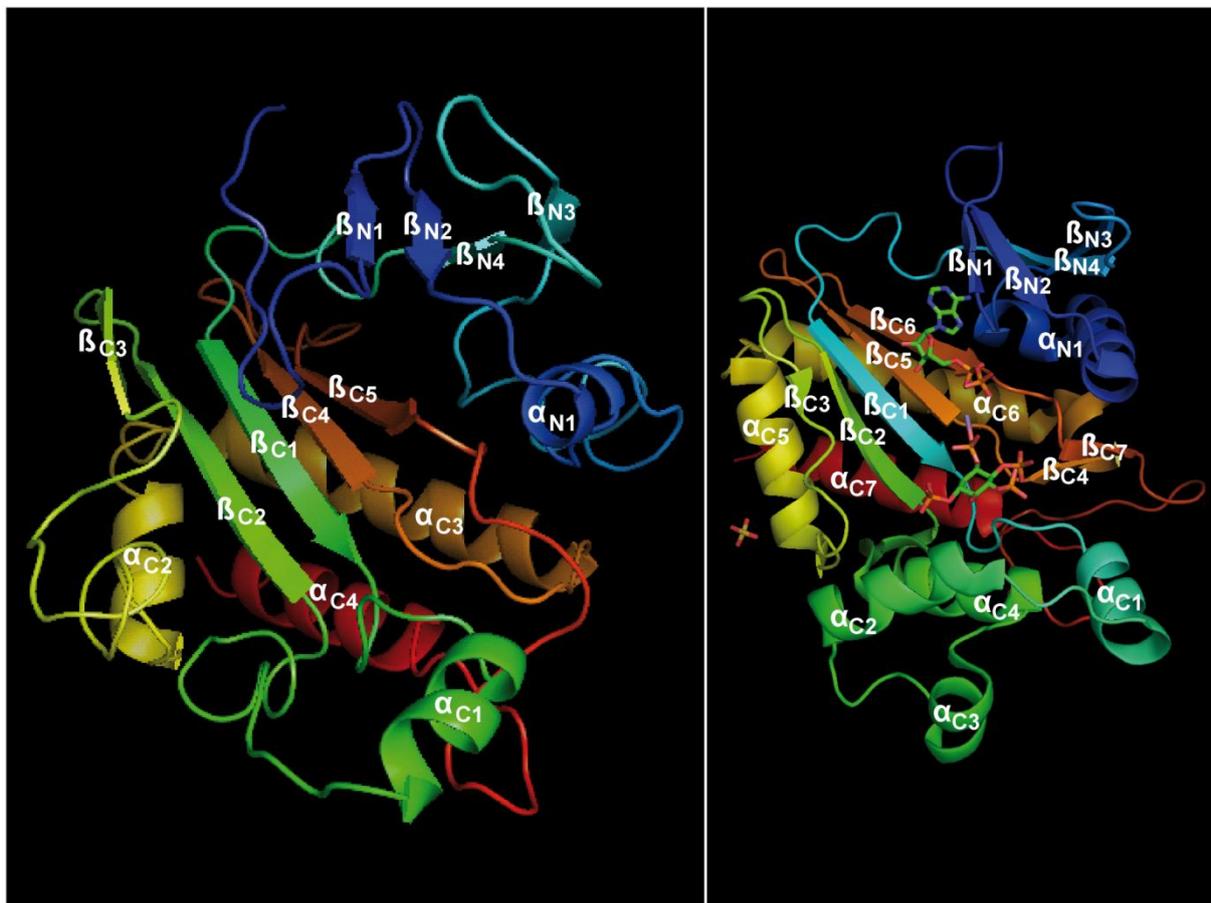


Abbildung 6-7: Linke Seite der Abbildung: Putatives 3D-Strukturmodell Nr. 1 der EhIPK-1. Rechte Seite der Abbildung: Zum Vergleich die *humane* Inositol(1,4,5)trisphosphat-3-Kinase A. Als Template für das Alignment diente die Pdb-File 2AQX.

Zusätzlich werden eine N-terminale und vier C-terminale α -Helices prädiziert. Im direkten Vergleich mit der *humanen* Inositol(1,4,5)trisphosphat-3-Kinase A, die strukturell große Übereinstimmungen mit dem prädizierten Modell besitzt, besteht eine absolute Übereinstimmung bezüglich der Anzahl der β -Faltblattstränge im N-terminalen Teil des Enzyms. Jedoch kann beim Vergleich der beiden Modelle festgestellt werden, dass die 4 N-

terminalen Falblattstränge genauso wie die auch bei den beiden Modellen bestehende α_{N1} -Helix im N-Terminus bei der *humanen* Inositol(1,4,5)trisphosphat-3-Kinase A besser strukturiert vorliegen. Außerdem findet eine vergleichbare Prädiktion der Falblattstränge im C-terminalen Teil der Proteine statt, jedoch wird der β -Strang β_{C4} und β_{C7} beim Modell der EhIPK-1 nicht prädiziert. Es ist außerdem hervorzuheben, dass der Übergang des β_{C1} zum β_{C2} -Strang bei der *humanen* IPK durch insgesamt 4 sehr gut strukturierte α -Helices (α_{C1} - α_{C4}), im Gegensatz zur EhIPK-1, wo nur die α_{C1} -Helix vorhanden ist, erfolgt. Möglicherweise ist die schlechtere Faltung sowohl hier als auch am N-Terminus ein Grund für die geringere Substratselektivität der EhIPK-1, wodurch es der EhIPK-1 ermöglicht wird, weitaus mehr Substrate zu binden und zu phosphorylieren.

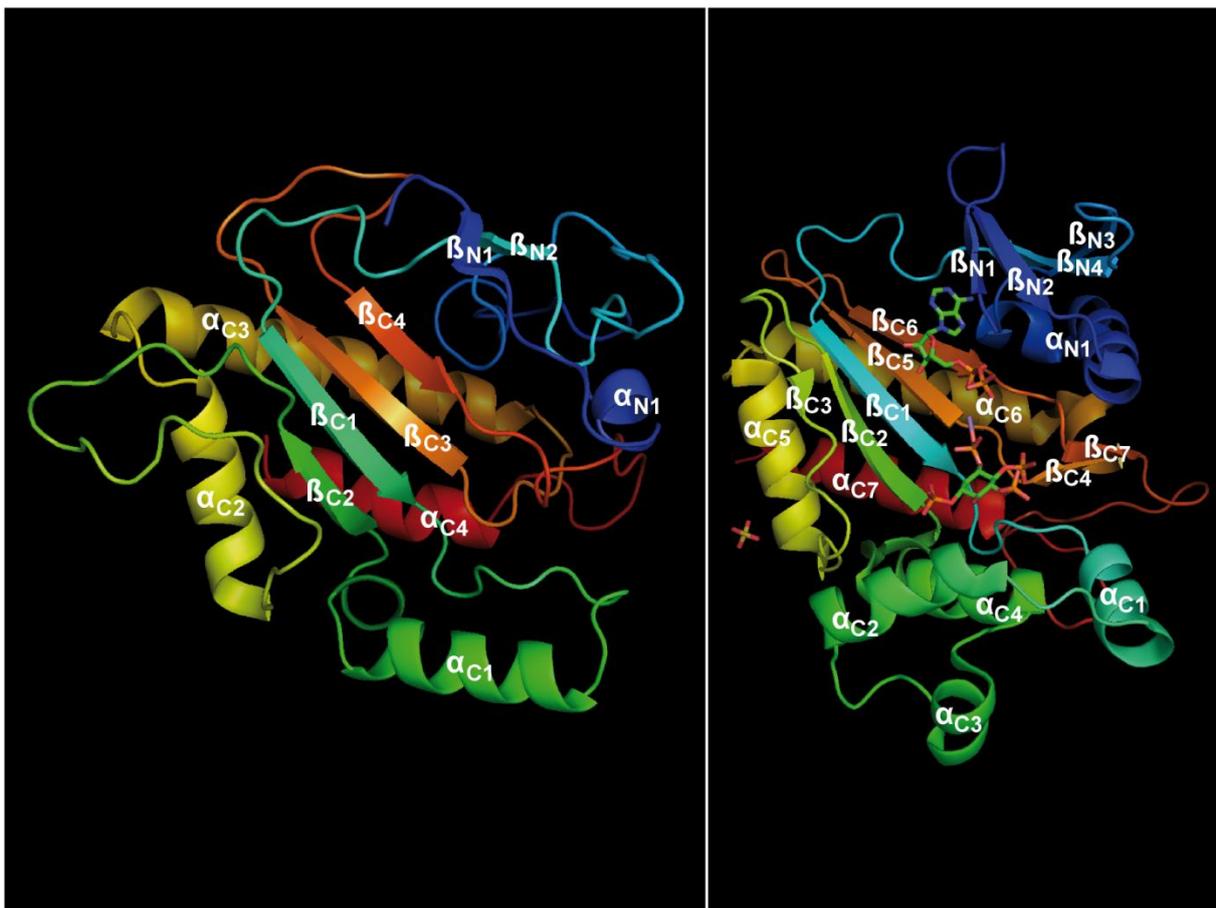


Abbildung 6-8: Linke Seite der Abbildung: Putatives 3D-Strukturmodell Nr. 2 der EhIPK-1. Rechte Seite der Abbildung: Zum Vergleich die *humane* Inositol(1,4,5)trisphosphat-3-Kinase A. Als Template für das Alignment diente die Pdb-File 2IEW.

In Abbildung 6-8 ist ein weiteres Modell der EhIPK-1 zu sehen, bei dem als Matrix die B-Kette der ebenfalls als Dimer kristallisierten Vollängen-Inositolphosphatmultikinase 2 (*Saccharomyces cerevisiae*) Verwendung fand [Holmes und Jögl, 2006].

Auch hier sieht man ein gut gefaltetes Protein. Im Vergleich mit dem Modell Nr. 1 der EhIPK-1 (siehe Abbildung 6-7) ist zu sehen, dass der N-Terminus nur zwei β -Stränge (β_{N1} und β_{N2}) besitzt. Auch die prädizierte α_{N1} -Helix ist beim Modell Nr. 2 schlechter prädiziert. Betrachtet man den C-Terminus genauer, so stellt man fest, dass die α -Helices nahezu gleich gut

ausgeprägt sind, die α_{C2} -Helix beim Modell Nr. 2 sogar besser modelliert (bezogen auf das 1. Modell) vorliegt. Im Gegensatz dazu fehlt in der Abbildung 6-8 der β_{C3} -Strang, der beim 1. Modell gut ausgebildet war, vollständig.

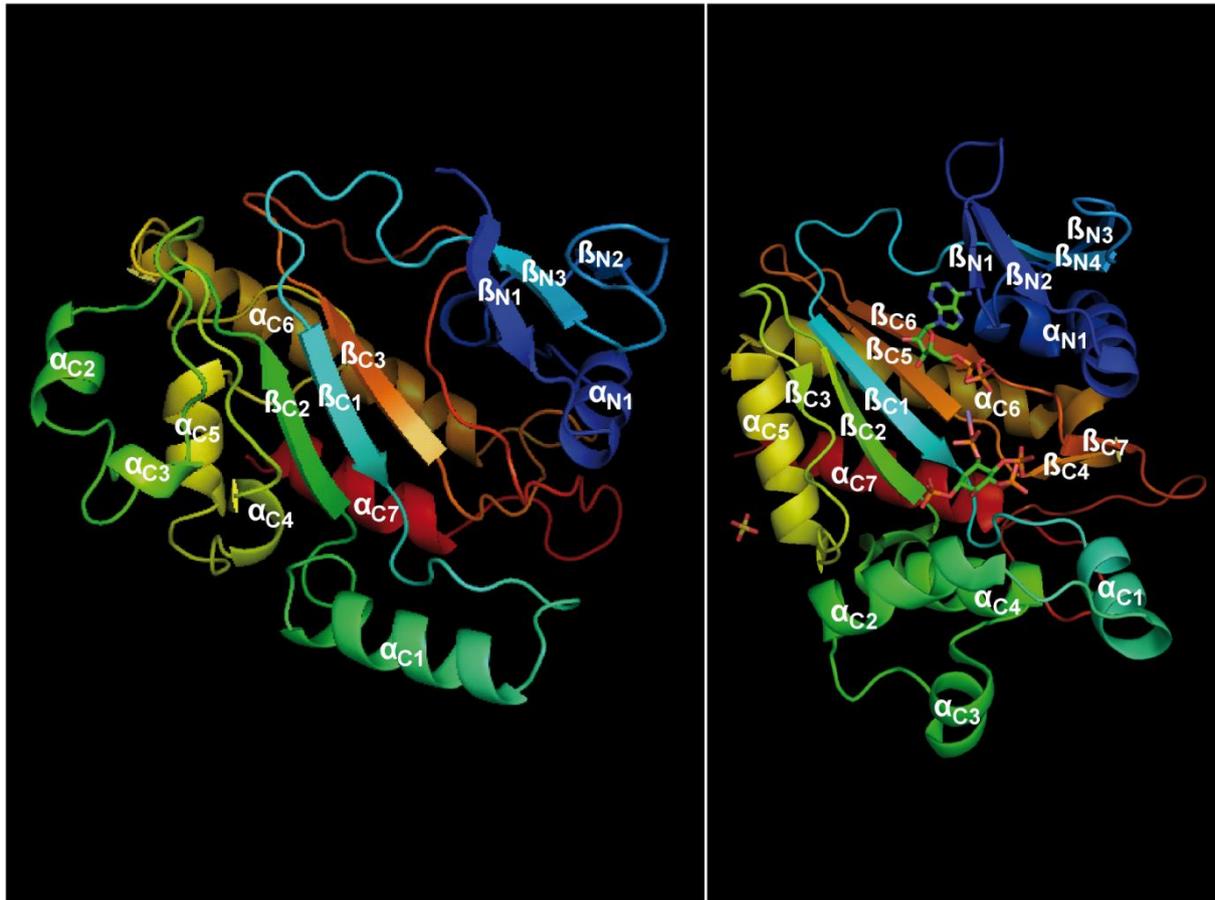


Abbildung 6-9: Linke Seite der Abbildung: Putatives 3D-Strukturmodell Nr. 3 der EhIPK-1. Rechte Seite der Abbildung: Zum Vergleich die humane Inositol(1,4,5)trisphosphat-3-Kinase A. Als Template für das Alignment diente die Pdb-File 2IF8.

Abbildung 6-9 zeigt das Modell Nr. 3 der EhIPK-1. Als Matrix diente die A-Kette der Inositolphosphatmultikinase 2 (*Saccharomyces cerevisiae*) [Holmes und Jogl, 2006].

Hier ist, wie auch in den Abbildungen zuvor, ein qualitativ gutes Modell zu sehen. Es scheint aber so, als wäre der vierte β -Faltblattstrang (β_{N4} in Abbildung 6-7) als Teil des C-Terminus vorhergesagt worden (β_{C1}), wodurch sich die Struktur des Proteins ändert. Weiter C-terminal gelegen zeigt die α_{C5} -Helix im Modell Nr. 3 starke Ähnlichkeit zu der Helix α_{C2} in Modell Nr. 1. Zwischen dem β_{C2} -Faltblattstrang und der α_{C5} -Helix werden anstelle eines β -Strangs zwei weitere Helices (α_{C2} und α_{C3}) prädiziert. Die C-Terminal gelegenen Strukturen α_{C6} und α_{C7} in Abbildung 6-9 weisen große Ähnlichkeit mit den α -Helices α_{C3} und α_{C4} des ersten Modells auf. Außerdem existiert der in der Abbildung zentral gelegene vierte β -Faltblattstrang (β_{C5} in Modell Nr. 1), der bei den beiden anderen Modellen zwischen den beiden sehr gut modellierten α -Helices auch vorhanden war, nicht.

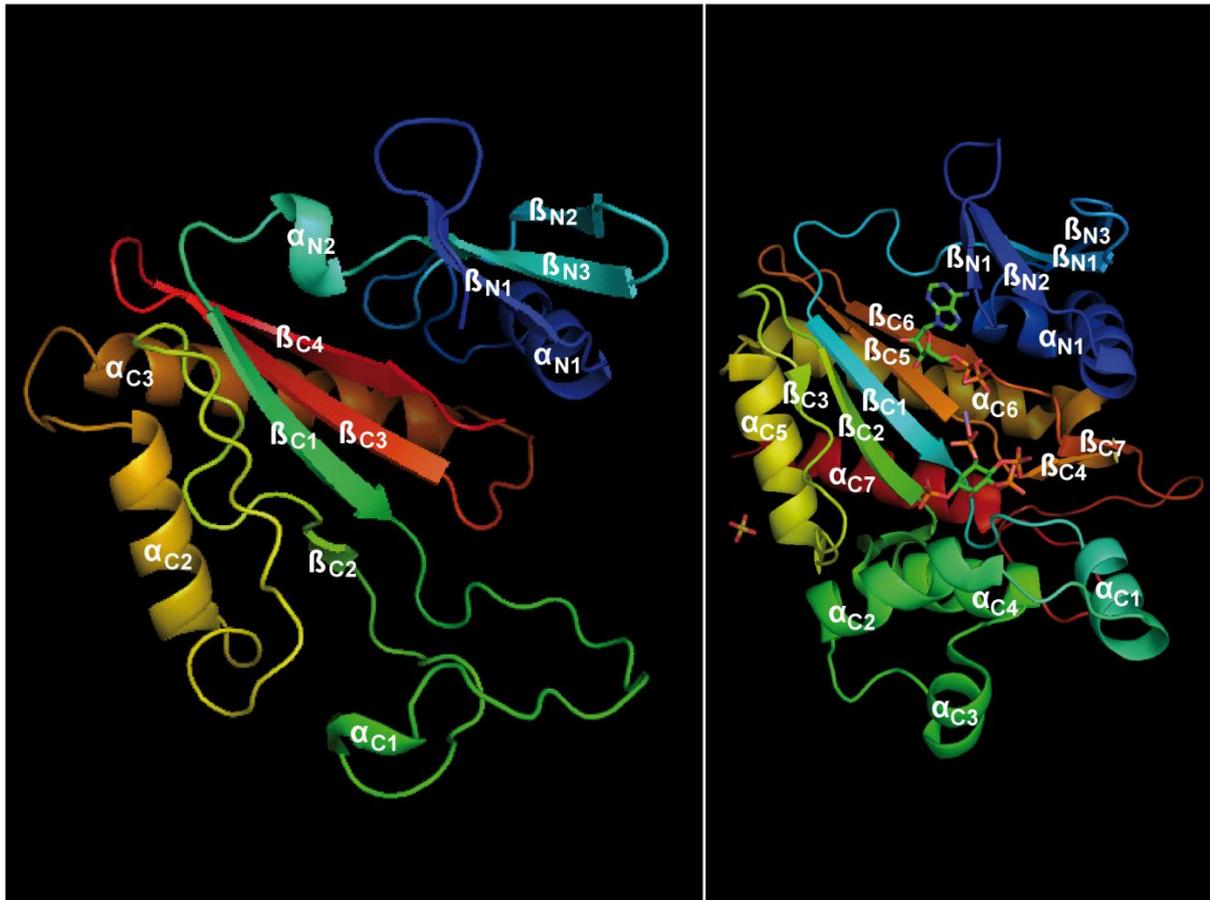


Abbildung 6-10: Linke Seite der Abbildung: Putatives 3D-Strukturmodell Nr. 4 der EhIPK-1. Rechte Seite der Abbildung: Zum Vergleich die *humane* Inositol(1,4,5)trisphosphat-3-Kinase A. Als Template für das Alignment diente die Pdb-File 1W2C.

Für das Modell Nr. 4 in Abbildung 6-10 wurde als Matrize die B-Kette der *humanen* Inositol(1,4,5)trisphosphat-3-Kinase A [Gonzalez et al., 2004] verwendet.

Verglichen mit den drei vorangegangenen Modellen ist das 4. Modell deutlich schlechter. Der N-Terminus ist noch verhältnismäßig gut gefaltet. Jedoch findet eine schlechte Prädiktion des C-Terminus nach dem β_{C1} -Faltblattstrang statt: Große Teile des Proteins weisen keine oder nur schlecht ausgebildete Sekundärstrukturen auf. Wiederzuerkennen sind nur die beiden in der Abbildung gezeigten Helices α_{C2} und α_{C3} , die aus dem Modell Nr. 1 bekannte und in den vorangegangenen Modellen vorhergesagte α_{C4} -Helix wurde nunmehr als β_{C4} -Strang prädiziert.

Abbildung 6-11 zeigt das Modell Nr. 5, das ebenfalls wie Modell Nr. 4 einer schlechteren Prädiktion des Enzyms entspricht. Es ist ein Modell der EhIPK-1 zu sehen, das als Matrize die A-Kette der Inositolphosphatmultikinase 2 (*Saccharomyces cerevisiae*) verwendete [Holmes und Jogl, 2006].

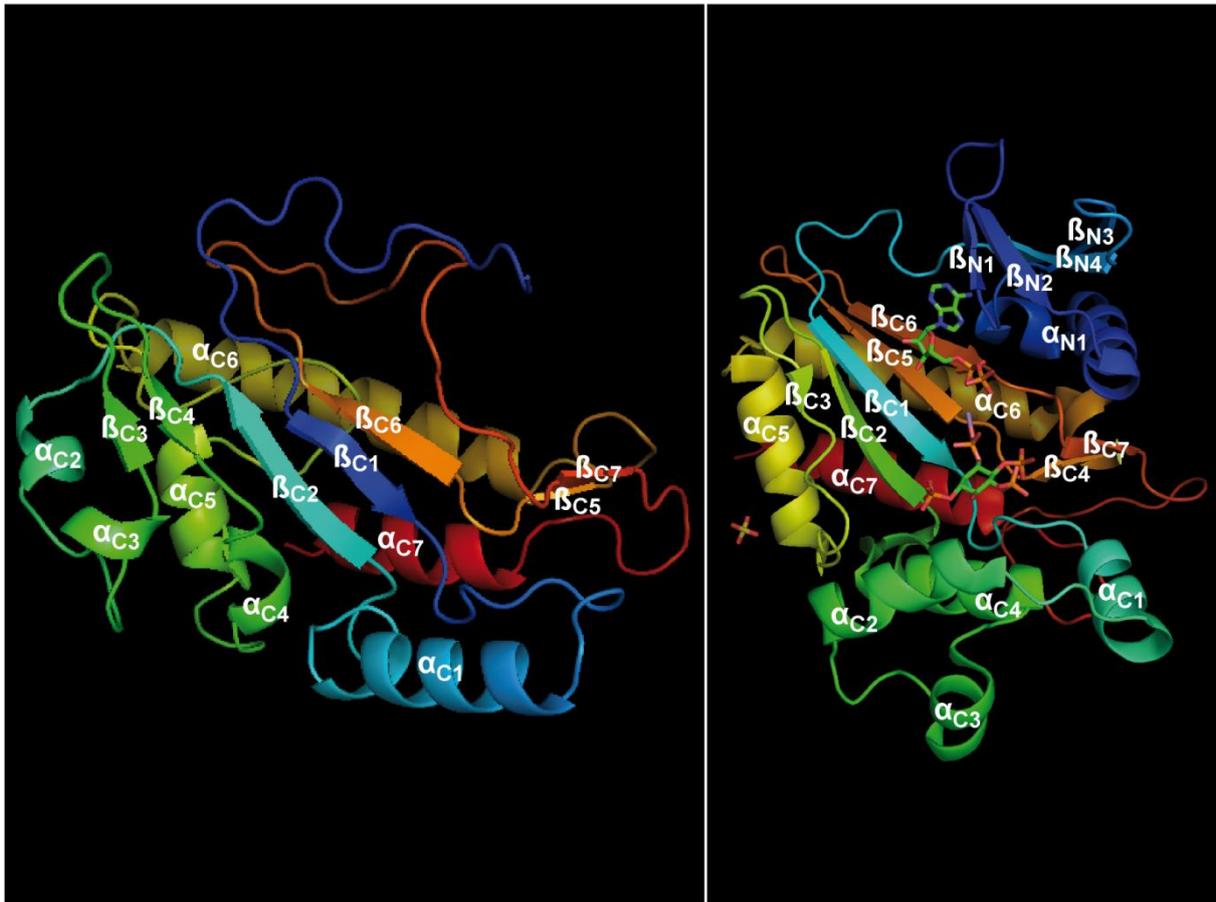


Abbildung 6-11: Linke Seite der Abbildung: Putatives 3D-Strukturmodell Nr. 5 der EhIPK-1. Rechte Seite der Abbildung: Zum Vergleich die *humane* Inositol(1,4,5)trisphosphat-3-Kinase A. Als Template für das Alignment diente die Pdb-File 2IF8.

Das Modell enthält insgesamt 7 β -Faltblattstränge und 7 α -Helices. Bei dieser Prädiktion sind große Anteile des N-Terminus als solche nicht mehr korrekt modelliert. Sie scheinen nun Bestandteil des C-Terminus zu sein. Die weitere Struktur des Modells unterscheidet sich grundlegend von den bereits gezeigten Modellen. Es ist nicht davon auszugehen, dass diese Prädiktion der Struktur der EhIPK-1 entspricht.

Es wird deutlich, dass die Prädiktion einer Tertiärstruktur eines Proteins eine sehr schwierige Aufgabe darstellt, die bisher nicht vollständig durch die Bioinformatik gelöst werden kann. Dadurch erklärt sich die Vielfalt der Prädiktionen, die sich auch deutlich qualitativ unterscheiden: Von den vorgestellten Modellen scheint das Modell Nr. 1 (siehe Abbildung 6-7) der EhIPK-1 das Hochwertigste zu sein. Es weist starke Ähnlichkeit mit der vorgestellten *humanen* Inositol(1,4,5)trisphosphat-3-Kinase A (siehe Abbildung 6-4) auf und könnte vielleicht zusammen mit den besser ausmodellierten Teilstrukturen in Modell 2 eine gute Basis für ein optimiertes Modell der EhIPK-1 sein. Derartige Optimierungen durch Verwendung von Hybrid-Matrizen sind z.B. durch das Programm Modeller gut erstellbar und in der AG geplant.

6.4 Struktur und biologische Funktion von pyrophosphorylierten Inositolringen

Aufgrund des Aufbaus eines Inositolphosphats mit Inositolring und Phosphatgruppen ergibt sich rechnerisch eine Anzahl von 63 unterschiedlichen Inositolphosphaten. Nach Entdeckung von Pyrophosphaten, also Inositolphosphaten, deren einzelne Phosphatgruppen mit einer zusätzlichen Phosphatgruppe verknüpft sind, stieg die theoretische Anzahl möglicher Inositolphosphate stark an.

Wie in dieser Arbeit gezeigt, ist die EhIPK-1 in der Lage, eine Vielzahl von unterschiedlichen Pyrophosphaten zu bilden. Es wäre also sehr interessant, die genaue Position der Pyrophosphatgruppe bestimmen zu können.

Von Albert et al. konnte [1997] gezeigt werden, dass das Pyrophosphat bei PP-InsP₅ (Diphosphoinositolpentakisphosphat) an D-5-Position bei *Säugetern* lokalisiert ist. Bezogen auf PP-InsP₄ ist die Position der Pyrophosphatgruppe bisher nicht eindeutig geklärt. Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass die Position der Pyrophosphatgruppe an D-5-Position zu finden ist und bei (PP)₂-InsP₄ von *mammalia* zumindest eine der Pyrophosphatgruppen an D-5-Position vorhanden ist [Safrany et al., 1999]. Die Position der zweiten Pyrophosphatgruppe befindet sich entweder an C1 oder C3 [Lin et al., 2009]. Die stattfindende Pyrophosphorylierung ist beispielhaft anhand eines InsP₅-Isomers an 5-Position in Abbildung 6-12 dargestellt.

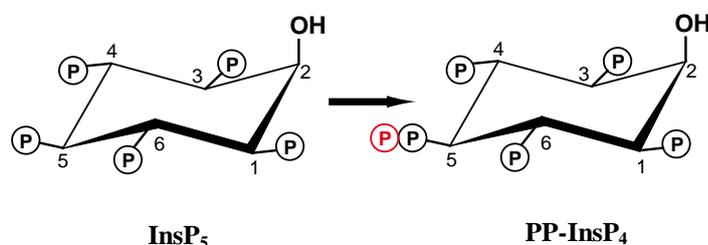


Abbildung 6-12: Metabolisierung von InsP₅ zu PP-InsP₄, beispielhaft an Ins(1,3,4,5,6)P₅ gezeigt

Es werden mittlerweile drei Phosphatasen, die für die Dephosphorylierung der β -Phosphatgruppe verantwortlich sind, beschrieben und als Diphosphoinositolpolyphosphat-Phosphatasen (DIPP) bezeichnet ([Irvine und Schell, 2001], [Safrany et al., 1998]).

Luo et al. [2002] zeigten, dass hochphosphorylierte Inositole zur Übertragung einer Phosphatgruppe auf Proteine und dadurch stattfindender Protein-Phosphorylierung notwendig sind. Diese Art der Phosphorylierung wird bspw. bei der homologen Rekombination der *Hefe* beobachtet. Hierbei scheint die P _{β} -Phosphatgruppe eine essentielle Bedeutung zu haben. Saiardi et al. [2004] berichteten, dass InsP₇ und InsP₈ als nichtenzymatische und hochenergiereiche Phosphat-Donatoren bei Protein-phosphorylierungen eine wichtige Rolle spielen. Saiardi et al. [2005] wiesen darauf hin, dass Pyrophosphate für die Steuerung des Zelltodes und für die Regulation der Telomer-Länge

verantwortlich sind. Zusätzlich steuert InsP₇ u.a. die DNA-Rekombination und Genexpression ([Irvine, 2007], [York, 2006]).

Es wird aufgrund von Studienergebnissen kontrovers diskutiert, ob neben InsP₄, InsP₆ und Phosphatidylinositolen auch Pyrophosphate an zellulärer Endo- und Exozytose beteiligt sind ([Saiardi et al., 2004], [Shears, 2001], [Irvine und Schell, 2001]).

6.4.1 Prädiktion von Strukturmodellen der PP-InsP₃-Isomere

Wie in Kapitel 5.6 zu sehen, ist die EhIPK-1 in der Lage, eine Vielzahl unterschiedlicher Pyrophosphate zu bilden. Die bisherigen Daten lassen keine abschließende Beurteilung der Position der Pyrophosphatgruppen zu. Allerdings liefern die Ergebnisse erste Anhaltspunkte: Wie das Schema in Abbildung 5-42 zeigt, entstehen bei der EhIPK-1 unter Einsatz unterschiedlicher Substrate mindestens zwei PP-InsP₂- [(I) + (II)], sechs PP-InsP₃- [(I) – (VI)] zehn PP-InsP₄- [(I) – (VI)] und fünf PP₂-InsP₃-Isomere [(I)-(III)]. Außerdem konnten zwei PP-InsP₅-Isomere [(I) – (II)] und InsP₈ [PP₂-InsP₄ (I)] detektiert werden.

Für ein besseres Verständnis werden die PP-InsP-Isomere in Abbildung 6-13 zusammengefasst gezeigt. Hierbei werden die in diesem Zusammenhang wichtigen und bereits bekannten Chromatogramme aus dem Ergebnisteil gezeigt und kompiliert. Neben den angesprochenen InsP₄-Isomeren sind auch andere Substrate abgebildet, bei denen im Verlauf der Reaktion ebenfalls pyrophosphorylierte Inositole detektiert wurden. In der Abbildung wurden lediglich die Chromatogramme der Substrattestungen der InsP₃- und InsP₄-Isomere sowie von InsP₆ zusammengefasst, da sie alle mit dem selben Gradienten analysiert wurden (siehe auch Ergebnisteil). Die Substrattestungen der InsP₅-Isomere erfolgte mit einem davon abweichenden Gradienten (siehe Abbildung 6-15).

Es sprechen einige Fakten dafür, dass sowohl bei PP-InsP₃- als auch bei PP-InsP₄- und PP₂-InsP₃-Isomeren vor allem die D-5- und D-3-Position von entscheidender Bedeutung sind: Betrachtet man die eingesetzten Substrate genauer, so lassen sich zunächst einige Gemeinsamkeiten herausarbeiten: Die eingesetzten InsP₄-Isomere, die im Verlauf unter anderem auch zu PP-InsP₃-Isomere pyrophosphoryliert werden, waren, wie im Ergebnisteil gezeigt, Ins(1,2,4,5)P₄, Ins(1,3,4,5)P₄, Ins(1,3,4,6)P₄, Ins(1,4,5,6)P₄ und Ins(3,4,5,6)P₄. Ins(1,2,4,5)P₄, Ins(1,3,4,6)P₄, Ins(1,4,5,6)P₄ und Ins(3,4,5,6)P₄ wurden zu jeweils einem PP-InsP₃, Ins(1,3,4,5)P₄ zu zwei PP-InsP₃-Isomeren metabolisiert (vgl. entsprechendes Kapitel der Substrattestungen im Ergebnisteil und Abbildung 6-13).

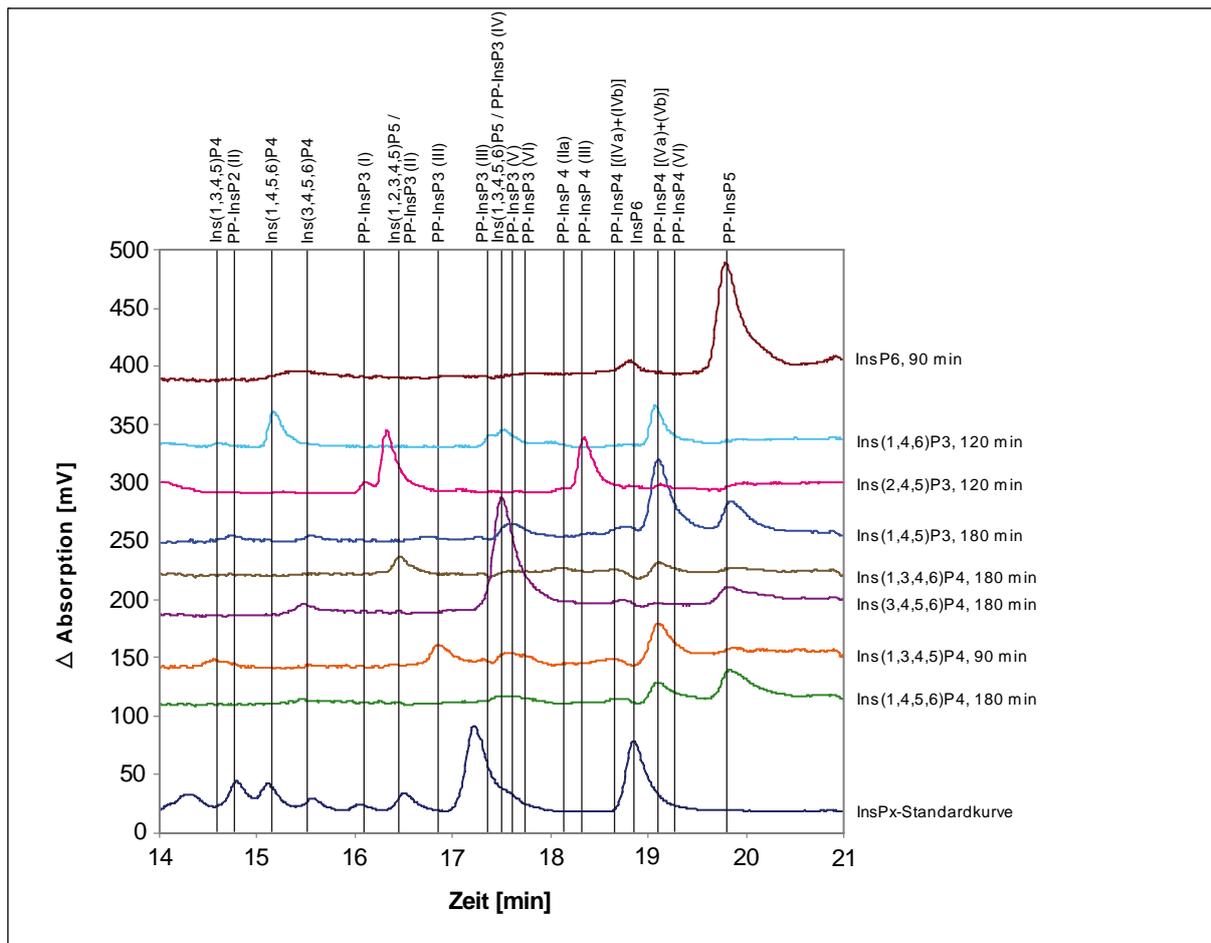


Abbildung 6-13: Metabolisierung verschiedener InsP₃- und InsP₄-Isomere sowie von InsP₆ durch die EhIPK-1

Betrachtet man die als Substrate eingesetzten InsP₄-Isomere in Abbildung 6-13, so fällt zunächst auf, dass bei den genannten InsP₄-Isomeren entweder die 3- und / oder 5-Position mit einer Phosphatgruppe besetzt ist. Möglicherweise bevorzugt die EhIPK-1 eine dieser beiden Positionen, um das Substrat zu pyrophosphorylieren. Wie in Kapitel 6.4 bei InsP₅ bzw. PP-InsP₄ und in der Abbildung 6-12 gezeigt, wird offenbar von IPKs die 1-, 3- und 5-Position bevorzugt für Pyrophosphorylierung genutzt. Höchstwahrscheinlich lässt sich dies auch auf PP-InsP₃-Isomere übertragen. Es ist zu vermuten, dass Ins(1,3,4,5)P₄, mit, im Gegensatz zu den anderen Inositolphosphaten (Ins(1,2,4,5)P₄, Ins(1,3,4,6)P₄, Ins(1,4,5,6)P₄ und Ins(3,4,5,6)P₄), vorhandenem 1-, 3- und 5-Phosphat sowohl an 5- als auch an 3-Position pyrophosphoryliert wird. Da kein weiteres InsP₄ diese Konfiguration erfüllt, ist es möglich, das zweite bei Ins(1,3,4,5)P₄ auftretende PP-InsP₃-Isomer zu erklären. Bei den übrigen InsP₄-Substraten ist immer entweder die 3- oder 5-Position mit einem Phosphat besetzt. Es wäre also denkbar, dass in erster Linie diese beiden Positionen bei den verbleibenden InsP₄-Isomeren eine wichtige Rolle bei Pyrophosphorylierungen spielen. Folgt man der favorisierten Hypothese, dass durch die EhIPK-1 primär an 5-Position und sekundär an 3-

Position eine Pyrophosphorylierung erfolgt, so handelt es sich bei den entstehenden PP-InsP₃-Isomeren um die in Tabelle 6-2 angegebenen Produkte:

Substrat	Produkt(e)	Kinase-Selektivität
Ins(1,2,4,5)P ₄	5PP-Ins(1,2,4)P ₃	Ins(1,2,4,5)P ₄ -5-P-Kinase
Ins(1,3,4,5)P ₄	3PP-Ins(1,4,5)P ₃	Ins(1,3,4,5)P ₄ -3-P-Kinase
	5PP-Ins(1,3,4)P ₃	Ins(1,3,4,5)P ₄ -5-P-Kinase
Ins(1,3,4,6)P ₄	3PP-Ins(1,4,6)P ₃	Ins(1,3,4,6)P ₄ -3-P-Kinase
Ins(1,4,5,6)P ₄	5PP-Ins(1,4,6)P ₃	Ins(1,4,5,6)P ₄ -5-P-Kinase
Ins(3,4,5,6)P ₄	5PP-Ins(3,4,6)P ₃	Ins(3,4,5,6)P ₄ -5-P-Kinase

Tabelle 6-2: Prädiktion von durch die EhPK-1 generierten PP-InsP₃-Isomeren

Es ist möglich, dass die bei allen getesteten Substraten mit einem Phosphat besetzte 4-Position für die Konfiguration des Substrats elementar ist und es der EhPK-1 dadurch erst ermöglicht wird, eine Pyrophosphorylierung vorzunehmen.

Die hypothetische Pyrophosphorylierung der Substrate ist noch einmal in Abbildung 6-14 illustriert.

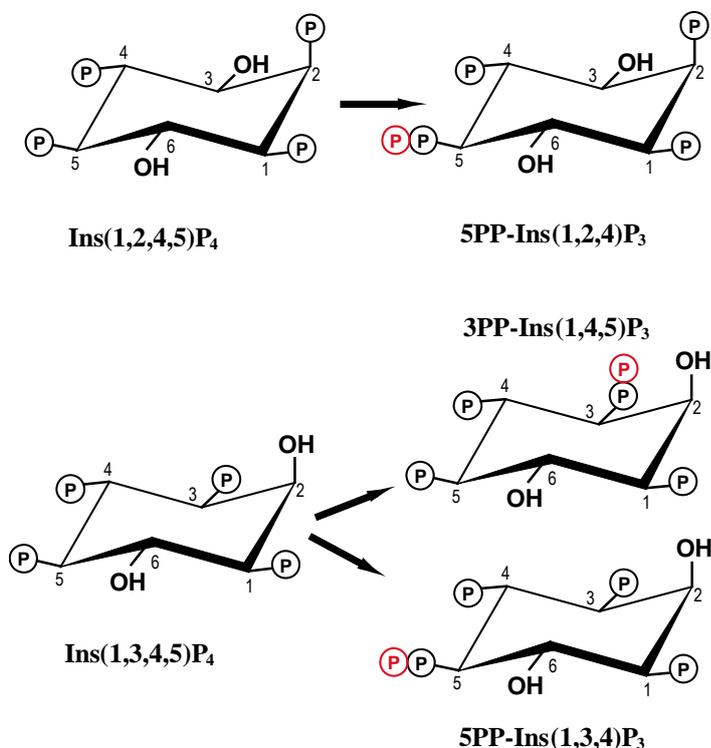


Abbildung 6-14: Prädiktion von durch die EhPK-1 generierten PP-InsP₃-Isomeren

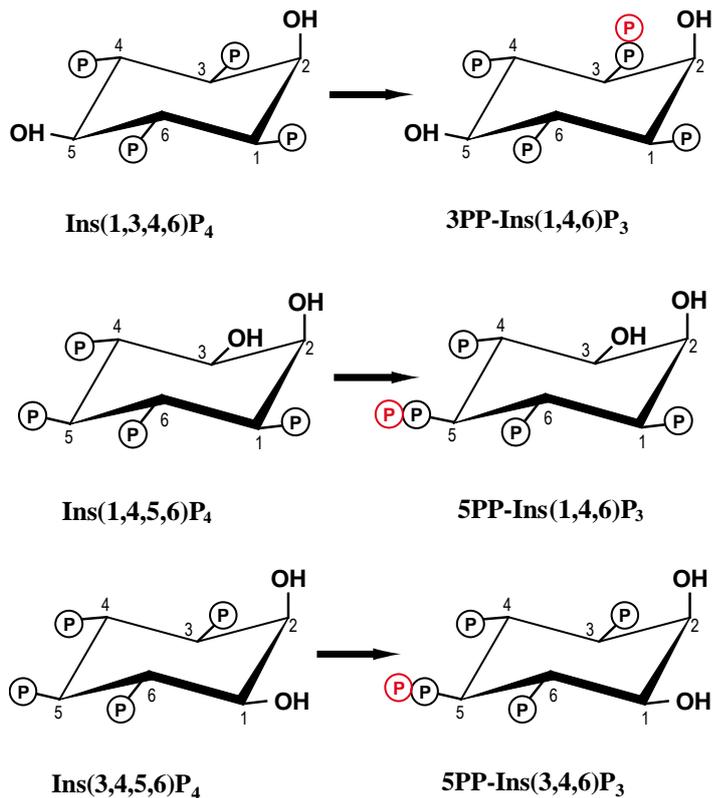


Abbildung 6-14, Fortsetzung: Prädiktion von durch die EhIPK-1 generierten PP-InsP₃-Isomeren

Anhand der gezeigten Strukturformel-Vergleiche ist es offensichtlich möglich, Strukturmodelle der PP-InsP₃-Isomere zu entwerfen, die durch experimentelle Untersuchungen verifiziert werden müssen. Es wäre sehr aufschlussreich, weitere InsP₄-Isomere, die u.a. keine Phosphorylierung an 4-Position aufweisen, außerhalb dieser Arbeit zu testen und auf Pyrophosphorylierung zu prüfen.

6.4.2 Prädiktion von Strukturmodellen der PP-InsP₄-Isomere

Neben den Chromatogrammen der PP-InsP₄-Isomere wurden ebenfalls die Chromatogramme der eingesetzten InsP₅-Isomere genauer untersucht, um hypothetische Strukturmodelle für die gebildeten PP-InsP₄-Isomere erstellen zu können. Dazu wurden auch die aus dem Ergebnisteil bekannten MDD-HPLC-Chromatogramme zum Zeitpunkt 120 min in einem Diagramm kompiliert (siehe Abbildung 6-15).

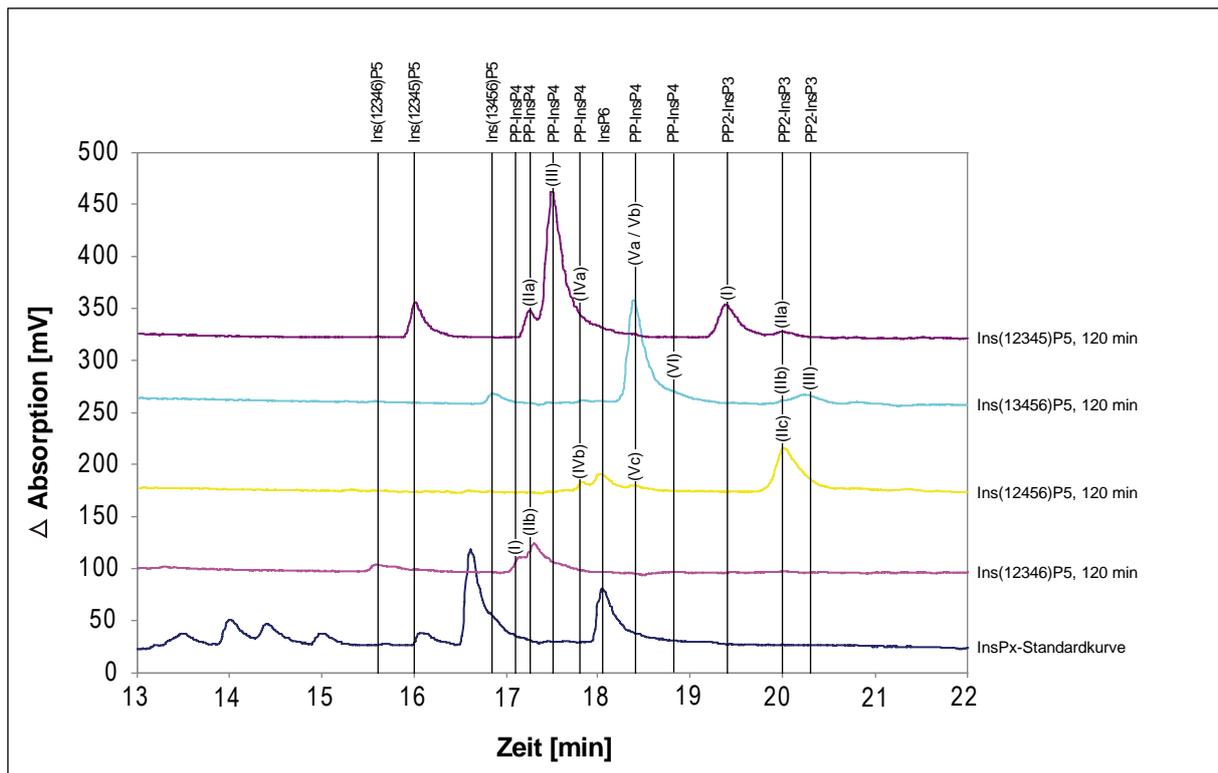


Abbildung 6-15: Metabolisierung verschiedener InsP_5 -Isomere durch die EhIPK-1

In Abbildung 6-15 fallen zunächst die gebildeten PP- InsP_4 -Isomere auf: Die Isomere PP- InsP_4 (I) bis PP- InsP_4 (IVb) eluieren vor, die PP- InsP_4 -Isomere [(Va) – (VI)] nach InsP_6 .

Im Gegensatz zu $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$, $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$ und $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ zeigen sich im MDD-HPLC-Chromatogramm bei $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$ nach InsP_6 keine Phosphorylierungsprodukte in Form eines PP₂- InsP_3 -Isomers. Wie im Ergebnisteil gezeigt, ist die EhIPK-1 offensichtlich nicht in der Lage, $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$, $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$ und $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ an der noch freien OH-Gruppe zu phosphorylieren und InsP_6 zu generieren (vgl. Abbildung 6-15). Da jedoch bei allen InsP_5 -Isomeren, außer bei $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$, Produkte nach InsP_6 in den Chromatogrammen zu finden sind, ist davon auszugehen, dass die eluierenden Produkte InsP_6 nicht als Intermediat benötigen. Es ist also zu vermuten, dass die InsP_5 -Isomere zunächst zu einem PP- InsP_4 -Isomer pyrophosphoryliert werden, um dann ggf. im nächsten Schritt weiter zu einem PP₂- InsP_3 phosphoryliert zu werden.

Der Vergleich der eingesetzten Substrate zeigt, dass alle InsP_5 -Isomere, ausgenommen $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$, über eine Phosphatgruppe an der D-5-OH-Position verfügen. Da $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$ offensichtlich kein pyrophosphoryliertes Produkt nach InsP_6 aufweist, muss vermutlich die 5-Position des Inositolrings zwingend mit einem Phosphat besetzt sein, um der EhIPK-1 eine höhere Phosphorylierung des vorliegenden PP- InsP_4 -Isomers hin zu einem PP₂- InsP_3 überhaupt erst zu ermöglichen.

Wie im Ergebnisteil gezeigt, entstehen bei $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ und $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ jeweils drei PP- InsP_4 -Isomere, bei den Substraten $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$ und $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$ jeweils zwei PP-

InsP₄-Isomere. Beim Vergleich der Substrate untereinander fällt auf, dass ein bedeutender Unterschied darin liegt, dass bei Ins(1,2,3,4,5)P₅ und Ins(1,3,4,5,6)P₅ eine Konfiguration vorliegt, bei der sowohl die D-1-, D-3- und D-5-Position phosphoryliert vorliegt. Bei Ins(1,2,3,4,6)P₅ und Ins(1,2,4,5,6)P₅ ist entweder die 5-Position oder die 3-Position nicht phosphoryliert. Alle getesteten Substrate verfügen auch über eine Phosphorylierung an der 1- und 4-Position, wodurch eine Phosphorylierung theoretisch auch dort möglich wäre. Aus Gründen der Strukturstabilität (siehe Kapitel 6.4.3) wird die EhIPK-1 jedoch höchstwahrscheinlich neben der 3- und 5-Position auch die 1-Position favorisieren, wodurch die Pyrophosphatgruppen nicht direkt benachbart wären. Folgt man der bereits oben aufgestellten Hypothese, dass die EhIPK-1 an 1-, 3- und 5-Position des Inositolrings eine Pyrophosphorylierung von InsP₅-Isomeren vornimmt, ergeben sich die in Tabelle 6-3 zusammengefassten Produkte:

Substrat	Produkt(e)	Kinase-Selektivität
Ins(1,2,3,4,5)P ₅	1PP-Ins(2,3,4,5)P ₄	Ins(1,2,3,4,5)P ₅ -1-P-Kinase
	3PP-Ins(1,2,4,5)P ₄	Ins(1,2,3,4,5)P ₅ -3-P-Kinase
	5PP-Ins(1,2,3,4)P ₄	Ins(1,2,3,4,5)P ₅ -5-P-Kinase
Ins(1,3,4,5,6)P ₅	1PP-Ins(3,4,5,6)P ₄	Ins(1,3,4,5,6)P ₅ -1-P-Kinase
	3PP-Ins(1,4,5,6)P ₄	Ins(1,3,4,5,6)P ₅ -3-P-Kinase
	5PP-Ins(1,3,4,6)P ₄	Ins(1,3,4,5,6)P ₅ -5-P-Kinase
Ins(1,2,3,4,6)P ₅	1PP-Ins(2,3,4,6)P ₄	Ins(1,2,3,4,6)P ₅ -1-P-Kinase
	3PP-Ins(1,2,4,6)P ₄	Ins(1,2,3,4,6)P ₅ -3-P-Kinase
Ins(1,2,4,5,6)P ₅	1PP-Ins(2,4,5,6)P ₄	Ins(1,2,4,5,6)P ₅ -1-P-Kinase
	5PP-Ins(1,2,4,6)P ₄	Ins(1,2,4,5,6)P ₅ -5-P-Kinase

Tabelle 6-3: Prädiktion von durch die EhIPK-1 generierten PP-InsP₄-Isomeren

Abbildung 6-16 illustriert auch hier die besprochenen Pyrophosphorylierungen:

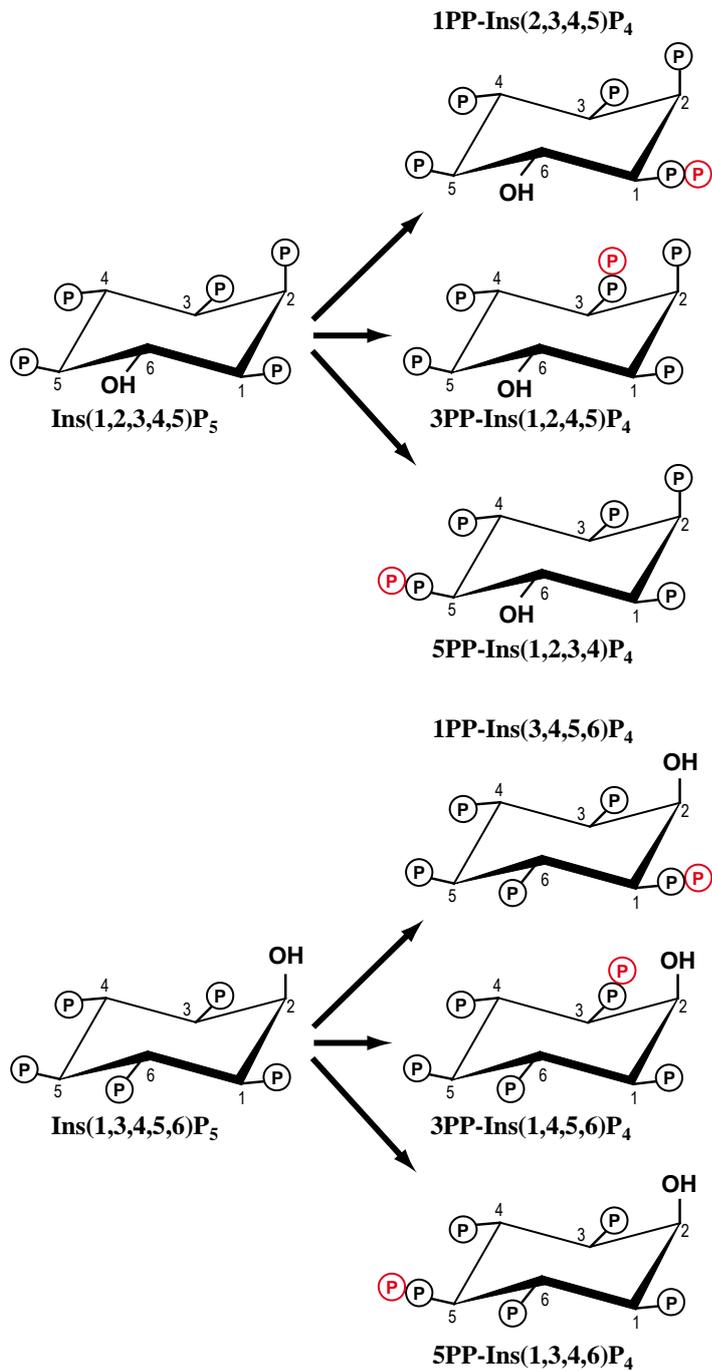


Abbildung 6-16: Prädiktion von durch die EhIPK-1 generierten PP-InsP₄-Isomeren

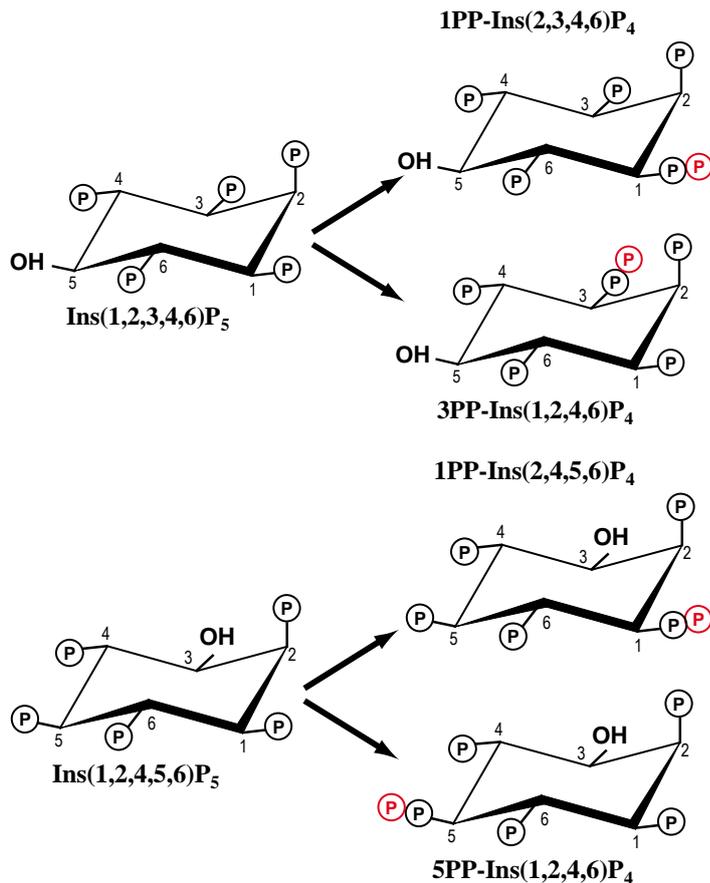


Abbildung 6-16, Fortsetzung: Prädiktion von durch die EhIPK-1 generierten PP-InsP₄-Isomeren

6.4.3 Prädiktion von Strukturmodellen der PP₂-InsP₃-Isomere und InsP₈

Die entstehenden PP₂-InsP₃-Isomere leiten sich offenbar von den gebildeten PP-InsP₄-Isomeren und nicht von InsP₆ ab, da InsP₆ nicht zwangsläufig als potentielles Intermediat bei der Umsetzung der getesteten InsP₅-Isomere zur Verfügung steht (vgl. Kapitel 6.4.2 und Abbildung 6-15). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die entstandenen PP-InsP₄-Isomere noch einmal an anderer Position pyrophosphoryliert werden, und es sich deshalb um zwei Pyrophosphatgruppen (PP₂-InsP₃) innerhalb eines Moleküls handelt. Natürlich wäre es auch denkbar, dass bei vorbestehender Pyrophosphatgruppe durch erneute Phosphorylierung eine „Triple-Phosphatgruppe“ (PPP-InsP₄) gebildet wird (siehe Abbildung 6-17).

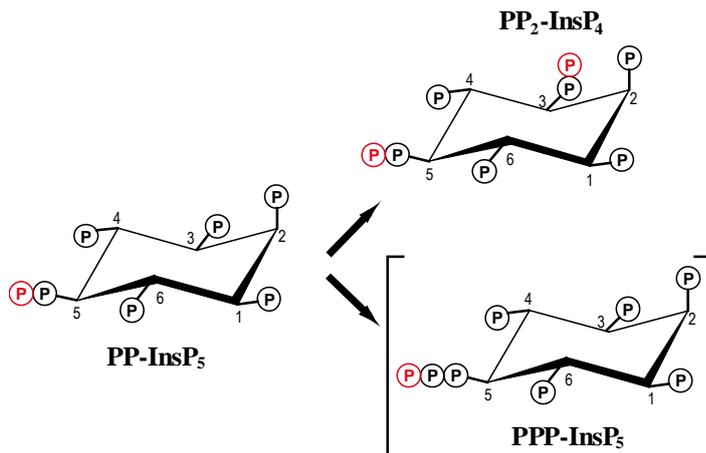


Abbildung 6-17: Inositolphosphat-Derivate mit alternativen Phosphorylierungen und mehrerer an einer Position vorhandenen Phosphatgruppen in Form von PP₂-InsP₄ und PPP-InsP₅

Bei den getesteten Substraten Ins(1,2,3,4,5)P₅ und Ins(1,3,4,5,6)P₅ konnten jeweils drei PP-InsP₄-Isomere gefunden werden. Zusätzlich konnten auch jeweils zwei PP₂-InsP₃-Isomere detektiert werden. Die Quantität der generierten PP-InsP₄- und PP₂-InsP₃-Isomere unterscheidet sich sehr stark. An der Bildung des in größeren Mengen vorhandenen PP₂-InsP₃-Isomers sind daher höchstwahrscheinlich zwei PP-InsP₄-Isomere beteiligt, wohingegen für das in geringerem Maße vorhandene PP₂-InsP₃ nur ein PP-InsP₄ als Substrat dienen wird. Ins(1,2,3,4,6)P₅ und Ins(1,2,4,5,6)P₅ fehlt im Gegensatz zu den beiden zuvor genannten Substraten das Phosphat entweder an 5- oder 3-Position. Bei Ins(1,2,4,5,6)P₅ wurde ein, bei Ins(1,2,3,4,6)P₅ konnte kein PP₂-InsP₅-Isomer detektiert werden.

Es wird zusammenfassend also folgender Reaktionsmechanismus postuliert (siehe Abbildung 6-18): Nachdem aus dem Substrat PP-InsP₄-Isomere durch Pyrophosphorylierung an 3- oder 5-Position gebildet wurden, kommt es im nächsten Schritt zu einer Pyrophosphorylierung an der jeweils noch nicht mit einer Pyrophosphatgruppe besetzten Position. Hierdurch wird nach einem Zwischenschritt aus unterschiedlichen PP-InsP₄-Isomeren schließlich das selbe Produkt gebildet. Das verbleibende dritte PP-InsP₄-Isomere wird ebenfalls zu PP₂-InsP₃ metabolisiert. Dabei kommt es zu einer Pyrophosphorylierung des 1PP-InsP₄-Isomers an 3- oder an 5-Position. Da an dieser Reaktion nur ein PP-InsP₄-Isomer beteiligt ist, wird erklärt, warum eines der beiden PP₂-InsP₃-Isomere in kleineren Mengen entsteht.

Bei Ins(1,2,4,5,6)P₅ entsteht im Gegensatz dazu nur ein PP₂-InsP₃-Isomer (IIc). Dies hängt damit zusammen, dass bei diesem Substrat nur zwei PP-InsP₄-Isomere gebildet werden, die, wie gerade zuvor beschrieben, zu dem selben PP₂-InsP₃ (IIc) umgesetzt werden, indem nachträglich entweder an 5- (1PP-Ins(2,4,5,6)P₄) oder 1-Position (5PP-Ins(1,2,4,6)P₄) pyrophosphoryliert wird.

Wie in Abbildung 6-15 zu sehen entsteht aus $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$ kein InsP_7 . Daraus wird abgeleitet, dass das Phosphat an 5-Position eine essentielle Rolle für die weitere Metabolisierung der aus InsP_5 hervorgegangenen Produkte spielt.

Tabelle 6-4 fasst die prädierten Produkte zusammen:

Substrat	Produkt(e)	Kinase-Selektivität
1PP- $\text{Ins}(2,3,4,5)\text{P}_4$	1/5PP ₂ - $\text{Ins}(2,3,4)\text{P}_3$	1PP- $\text{Ins}(2,3,4,5)\text{P}_4$ -5-P-Kinase
3PP- $\text{Ins}(1,2,4,5)\text{P}_4$	3/5PP ₂ - $\text{Ins}(1,2,4)\text{P}_3$	3PP- $\text{Ins}(1,2,4,5)\text{P}_4$ -5-P-Kinase
5PP- $\text{Ins}(1,2,3,4)\text{P}_4$	3/5PP ₂ - $\text{Ins}(1,2,4)\text{P}_3$	5PP- $\text{Ins}(1,2,3,4)\text{P}_4$ -3-P-Kinase
1PP- $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$	1/5PP ₂ - $\text{Ins}(3,4,6)\text{P}_3$	1PP- $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ -5-P-Kinase
3PP- $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$	3/5PP ₂ - $\text{Ins}(1,4,6)\text{P}_3$	3PP- $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ -5-P-Kinase
5PP- $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$	3/5PP ₂ - $\text{Ins}(1,4,6)\text{P}_3$	5PP- $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$ -3-P-Kinase
1PP- $\text{Ins}(2,3,4,6)\text{P}_4$	-	-
3PP- $\text{Ins}(1,2,4,6)\text{P}_4$	-	-
1PP- $\text{Ins}(2,4,5,6)\text{P}_4$	1/5PP ₂ - $\text{Ins}(2,4,6)\text{P}_3$	1PP- $\text{Ins}(2,4,5,6)\text{P}_4$ -5-P-Kinase
5PP- $\text{Ins}(1,2,4,6)\text{P}_4$	1/5PP ₂ - $\text{Ins}(2,4,6)\text{P}_3$	5PP- $\text{Ins}(1,2,4,6)\text{P}_4$ -1-P-Kinase

Tabelle 6-4: Prädiktion von durch die EhIPK-1 generierten PP₂- InsP_3 -Isomeren

Illustrativ zeigt Abbildung 6-18 die prädierten Pyrophosphorylierungen:

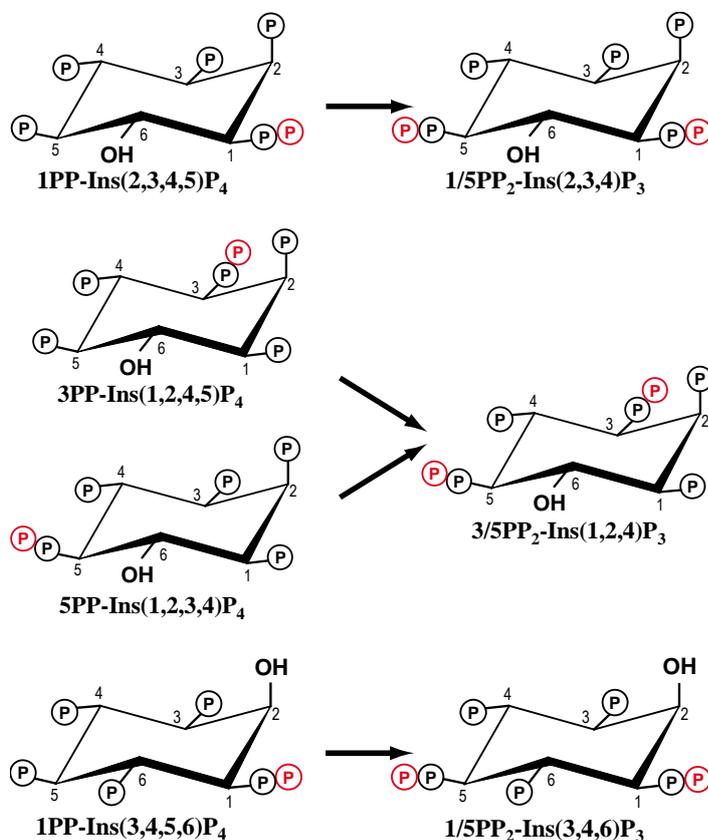


Abbildung 6-18: Prädiktion von durch die EhIPK-1 generierten PP₂- InsP_3 -Isomeren

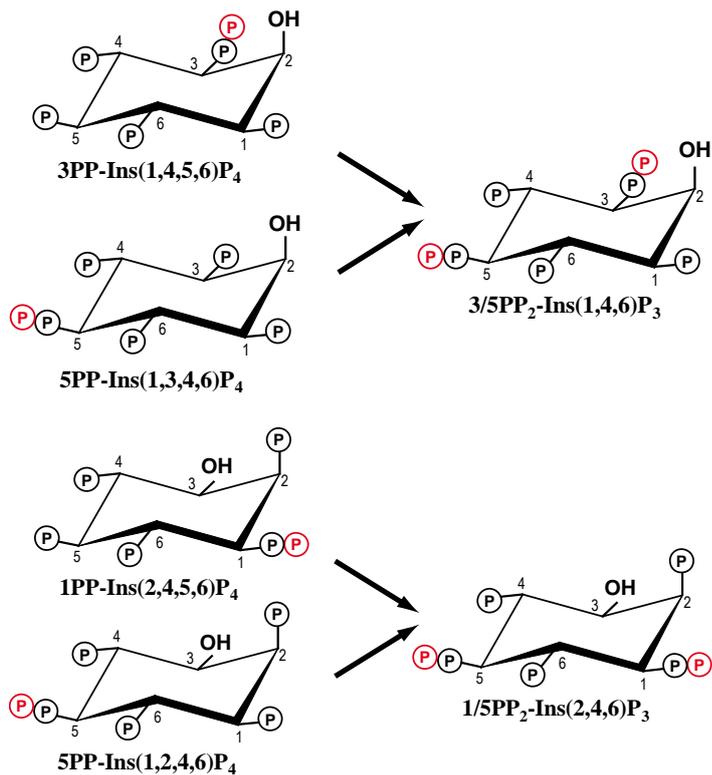


Abbildung 6-18, Fortsetzung: Prädiktion von durch die EhIPK-1 generierten PP₂-InsP₃-Isomeren

Neben PP₂-InsP₃ [(I) – (III)] entstehen, wie die bisherigen Untersuchungen zeigen, unter Einsatz von InsP₆ als Substrat weitere InsP₇-Isomere, die bezüglich Aufbau und Struktur nicht mit den PP₂-InsP₃-Isomeren übereinstimmen können. Es handelt sich hierbei aller Voraussicht nach um PP-InsP₅-Isomere [(I) + (II)], die schließlich zu InsP₈ [PP₂-InsP₄ (I)] umgesetzt werden. Die hypothetischen Pyrophosphorylierungen von InsP₆ sind in Abbildung 6-19 und Abbildung 6-20 dargestellt: Die EhIPK-1 pyrophosphoryliert in ihrer Funktion als IP6K das Substrat an der präferierten 5- oder 3-Position, bevor im nächsten Schritt die jeweils noch nicht vorhandene Pyrophosphatgruppe dem Inositolring hinzugefügt wird, wodurch schließlich InsP₈ entsteht. Hierdurch bedingt würde analog zu den PP₂-InsP₃-Isomeren sequentiell aus InsP₆ das selbe Produkt entstehen.

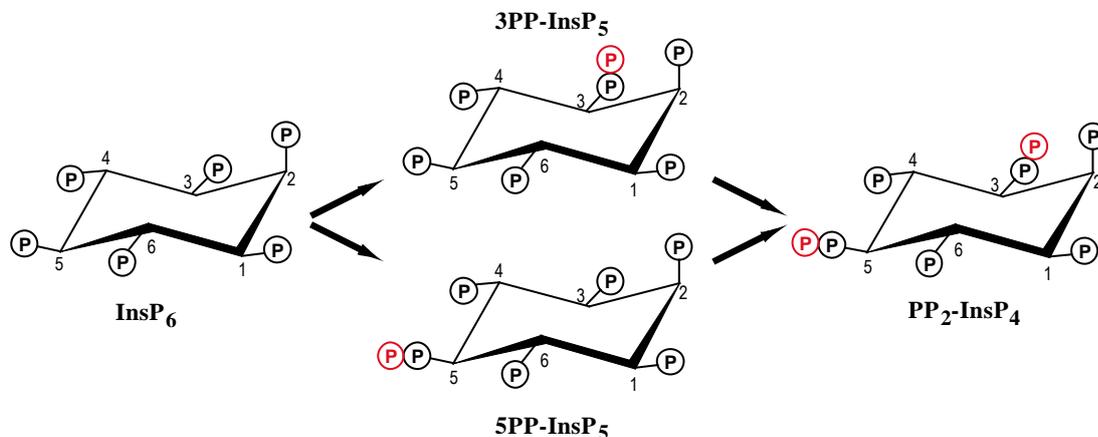


Abbildung 6-19: Hypothetische Pyrophosphorylierung von InsP₆ zu PP-InsP₅ und PP₂-InsP₄

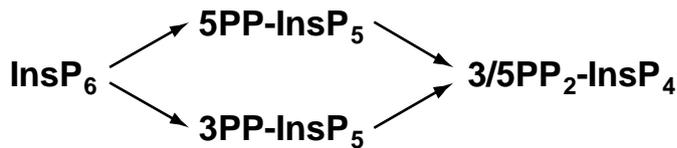


Abbildung 6-20: Hypothetische Pyrophosphorylierung von InsP_6 zu PP-InsP_5 und $\text{PP}_2\text{-InsP}_4$

Zusammenhängend sind die Hypothesen in dem leicht abgewandelten Schema, das schon im Ergebnisteil in Abbildung 5-45 zu sehen war, gezeigt. Dort sind die hypothetischen Strukturen, soweit sie bestimmt werden konnten, vermerkt (siehe Abbildung 6-21):

EhIPK-1

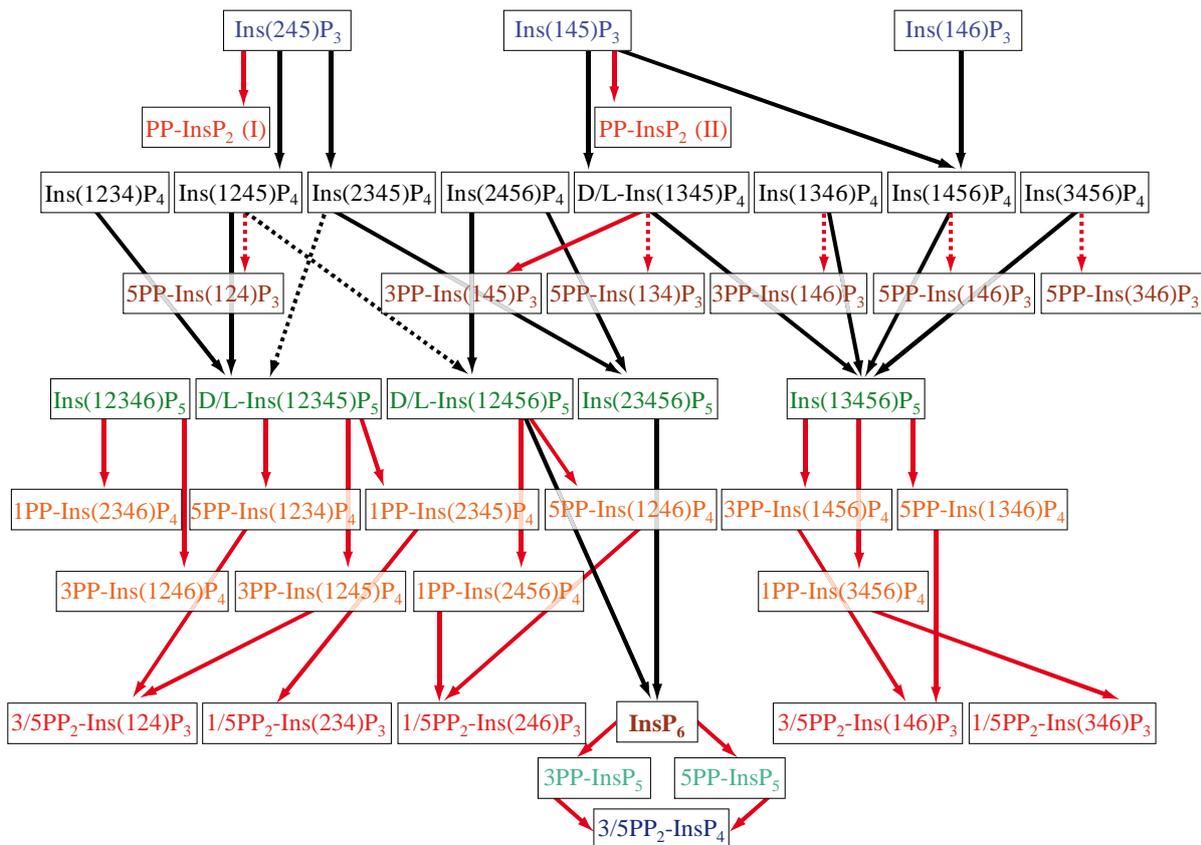


Abbildung 6-21: Illustration des Inositolphosphatmetabolismus der EhIPK-1 mit Darstellung der hypothetischen Pyrophosphat-Strukturen

Die hier durchgeführten numerischen Betrachtungen können höchstens als Anhaltspunkt für die pyrophosphorylierten Positionen der Produkte dienen: Da die EhIPK-1 in ihrer Komplexität eine Vielzahl von Substraten binden kann, wäre es sehr interessant, außerhalb dieser Arbeit „Recognition Sites“ des Enzyms anhand von komplexen 3D-Studien zu identifizieren. Hierfür müssten die einzelnen Substrate in ihrer Struktur genauer betrachtet werden, um mögliche Übereinstimmungen in ihrer Konfiguration herausarbeiten zu können. Durch die Identifikation dieser „Recognition Sites“ der EhIPK-1 wäre es wahrscheinlich möglich, die Funktion der EhIPK-1 besser verstehen und möglicherweise die pyrophosphorylierten Positionen der Produkte eindeutig bestimmen zu können.

6.5 Ist die EhIPK-1 eine IP5K?

Die Aktivitätsmessungen der EhIPK-1 mit InsP₅-Isomeren aus Kapitel 5.7 zeigen, dass die EhIPK-1 für Ins(1,2,4,5,6)P₅ und vor allem für Ins(1,3,4,5,6)P₅ eine besonders hohe spezifische Aktivität, verglichen mit anderen getesteten Substraten, aufweist. Möglicherweise handelt es sich daher bei der EhIPK-1 in erster Linie um eine IP5K.

Erste Vermutungen in diese Richtung, dass *Entamoeba histolytica* womöglich nicht in der Lage sein könnte, Ins(1,4,5)P₃ zu bilden und es daher nicht Hauptsubstrat für die EhIPK-1 ist, konnten nicht bestätigt werden. Aufgrund abgeschlossener Genomprojekte (TIGR-Database; www.TIGR.org) konnten putative PLC-Gene im Genom identifiziert werden (u.a. NCBI-Gene-ID: 6219380 sowie weitere Isoformen) wodurch Ins(1,4,5)P₃ als Hauptsubstrat für die EhIPK-1 nicht ausgeschlossen werden konnte.

Es scheinen für *Entamoeba histolytica* vor allem hochphosphorylierte Inositole eine entscheidende Rolle zu spielen. Hochphosphorylierte Inositole sind am „Chromatin remodelling“ beteiligt. Hierbei handelt es sich um eine Neuordnung von DNA und Histonen, durch Bindung der Inositolphosphate an ATP-abhängige Chromatinregulierungskomplexe. Es erfolgt eine Konformationsänderung der Nukleosomen während der Transkription [Stryer, 1999]. InsP₆ hemmt die Nukleosomenmobilisierung durch NURF, ISW2 und INO80, wohingegen der Chromatinmodellierungskomplex SWI / SNF der *Hefe in vitro* durch Bindung von Ins(1,4,5,6)P₄ und Ins(1,3,4,5,6)P₅ stimuliert wird ([Shen et al., 2003], [Steger et al., 2003], [Brehm, 2006]). Aufgrund der enormen Größe des *Entamoeba histolytica*-Genoms könnte das Chromatin Remodelling bei diesem Protozoon wichtiger sein als bei anderen Organismen. Möglicherweise sind an diesen Prozessen ebenfalls die in der Arbeit identifizierten PP-InsP-Isomere beteiligt.

6.6 Funktionsvielfalt und Aminosäuresequenz-Homologien der EhIPK-1

In der Zeit in der die Prädiktionsstudien von Prof. Dr. med. Mayr durchgeführt wurden (vgl. Kapitel 5.1), standen die Genomprojekte der Protozoen *Entamoeba histolytica* und *Trichomonas vaginalis* noch am Anfang und ermöglichten es nicht, auf das vollständig entschlüsselte Genom zurückzugreifen. Neben der von Prof. Dr. med. Mayr durchgeführten Prädiktion existiert, wie im Ergebnisteil in Kapitel 5.2 gezeigt, mittlerweile eine weitere Prädiktion des Gens, das für die EhIPK-1 codiert. Bei der in dieser Arbeit beschriebenen EhIPK-1 sind neun zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus im Gegensatz zum putativen Gen in der NCBI-Datenbank exprimiert worden. Prof. Dr. med. Mayr wählte das Start-Codon in Form des Methionins also früher. Konkret handelt es sich bei den prädierten Consensus-Abfolgen des Start-Codons um die Nukleotidabfolge AAGATGAAC (durch Prof. Dr. med.

Mayr prädiertes Start-Codon) und CACATGAGC (identifiziertes Start-Codon des aus der NCBI-Datenbank identifizierten Gens).

Um nachzuweisen, dass das von Prof. Dr. med. Mayr prädierte Start-Methionin korrekt ist, wurden die beiden DNA-Sequenzen einer genaueren Betrachtung unterzogen und mit der „Kozak-Consensus-Sequenz“ verglichen [Kozak, 2005]. Bei der „Kozak-Consensus-Sequenz“ handelt es sich um eine spezielle Sequenz-Abfolge, die bei der Initialisierung des Transkriptionsprozesses eine entscheidende Rolle spielt: Die mRNA-Sequenz wird von Ribosomen erkannt. Das Ribosom benötigt eine bestimmte Sequenz-Abfolge, um den Startpunkt erkennen zu können. Tatsächlich liegt diese Sequenz *in vivo* in Variationen vor. Von der Variation der „Kozak-Consensus-Sequenz“ hängt auch die Quantität des exprimierten Proteins ab.

Es existieren mehrere qualitative Abstufungen der „Kozak-Consensus-Sequenz“: Es handelt sich um eine starke („strong“) „Kozak-Consensus-Sequenz“, falls an Nukleotid-Position +4 (ausgehend von Position +1, entspricht dem Adenin des AUG-Motivs in Abbildung 6-22) ein Guanin und an Position -3 ein Adenin oder Guanin vorhanden ist. Ein adäquates („adequate“) „Kozak-Consensus-Motiv“ liegt vor, falls eine der beiden Positionen mit dem entsprechenden Nukleotid versehen ist. Falls an keiner der beiden Positionen ein entsprechendes Nukleotid vorhanden ist, handelt es sich um ein schwaches („weak“) Consensus-Motiv.

Vergleicht man die beiden oben genannten Consensus-Abfolgen der prädierten Gene innerhalb des *Entamoeba histolytica*-Genoms mit der „Kozak-Consensus-Sequenz“ (siehe Abbildung 6-22), so stellt man fest, dass es sich weder bei dem von Prof. Dr. med. Mayr prädierten noch bei dem in der NCBI-Datenbank identifizierten Start-Codon und der damit verbundenen Consensus-Sequenz um starke („strong“) Consensus-Motive handelt.

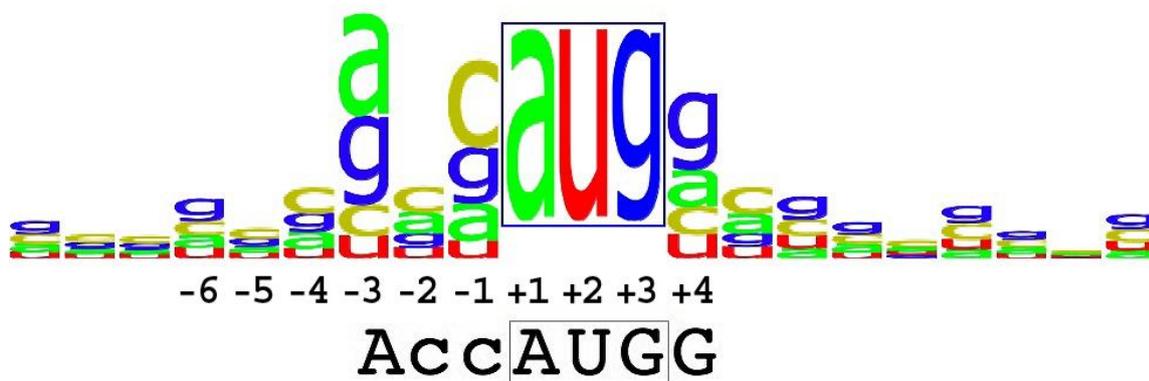


Abbildung 6-22: „Kozak-Consensus-Sequenz“ [<http://en.wikipedia.org>]

Die Abbildung zeigt die „Kozak-Consensus-Sequenz“. Hierbei sind die Nucleotide in der Größe variierend unterschiedlich stark hervorgehoben. Die Größe der Aminosäuren gibt ihre Bedeutung als Bestandteil der „Kozak-Consensus-Sequenz“ wieder.

Vielmehr handelt es sich bei der von Prof. Dr. med. Mayr prädizierten Consensus-Sequenz des Start-Codons um ein adäquates, bei dem in der NCBI-Datenbank identifizierten Sequenz sogar nur um ein schwaches „Kozak-Consensus-Motiv“. Offensichtlich ist das von Prof. Dr. med. Mayr prädizierte Start-Methionin zu favorisieren.

6.7 Vergleich bekannter Hemmstoffe von IPKs mit potenten Inhibitoren der EhIPK-1

In dieser Arbeit konnten vier Hemmstoffe identifiziert werden, die einen guten bis sehr guten inhibitorischen Effekt aufweisen. Hierbei handelte es sich um die Substanzen Aurintricarbonsäure, Quercetin, Gossypol und Bengalrosa. Mayr et al. [2005] zeigten u.a., dass Aurintricarbonsäure neben der IPMK auch die IP3K hemmen konnte.

Demgegenüber waren die auch während dieser Arbeit getesteten Substanzen Quercetin, Gossypol und Bengalrosa in der Lage, die drei Isoformen der IP3K unterschiedlich stark zu inhibieren. Abbildung 6-23 zeigt die damaligen Untersuchungsergebnisse in einem Diagramm mit der Angabe des inhibitorischen Potentials auf verschiedene IPKs:

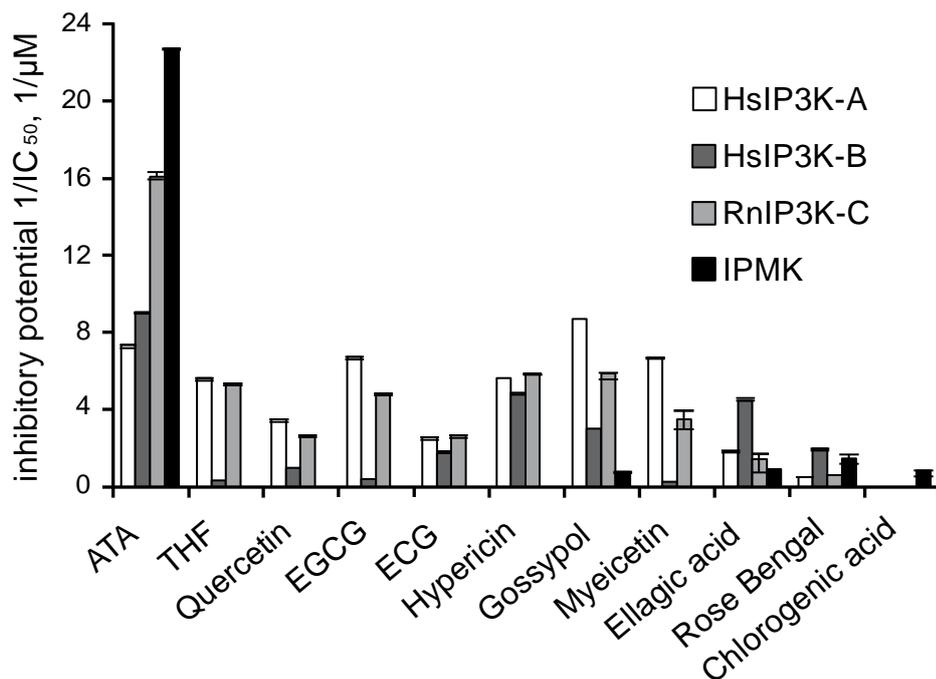


Abbildung 6-23: Inhibitorisches Potential verschiedener Substanzen bezogen auf die HsIP3K-A, HsIP3K-B, RnIP3K-C und HsIPMK [Mayr et al., 2005]

Die Ergebnisse aus Kapitel 5.8 zeigen, dass die IC_{50} -Werte der Hemmstoffe bei der EhIPK-1 erst im μ M-Bereich erreicht werden. Die bei Mayr et al. [2005] gefundenen IC_{50} -Werte getesteter antiproliferativ wirkender Substanzen, die sowohl pflanzlichen als auch synthetischen Ursprungs waren (bspw. ATA, Bengalrosa, Gossypol und Quercetin), lagen bei der IPMK und IP3K-A im Gegensatz zu den in dieser Arbeit ermittelten Werten zumeist im nM-Bereich (siehe Tabelle 6-5).

Name des Inhibitors	Konzentrationen potenter Inhibitoren (IC ₅₀ -Wert) der EhIPK-1 [µM]	Konzentrationen potenter Inhibitoren (IC ₅₀ -Wert) der <i>humanen</i> IP3K-Isoformen und der HsIPMK [Mayr et al., 2005] [nM]
ATA	2,45	138 (IP3K-A) 44 (IPMK)
Quercetin	2,56	300 (IP3K-A) Keine Hemmung (IPMK)
Gossypol	3,20	115 (IP3K-A) 3400 (IPMK)
Bengalrosa	9,11	2190 (IP3K-A) 620 (IPMK)

Tabelle 6-5: Vergleich der Potenz von Inhibitoren bei der EhIPK-1, der Isoform A der *humanen* IP3K sowie der HsIPMK bezogen auf den IC₅₀-Wert [Mayr et al., 2005]

Da *Entamoeba histolytica* größtenteils im Intestinaltrakt lokalisiert ist, käme wahrscheinlich in erster Linie eine orale / enterale Therapie in Betracht. Die IC₅₀-Konzentrationen im µM-Bereich scheinen hierfür bereits durchaus brauchbar zu sein. Es müsste in diesem Zusammenhang die Resorption der Wirkstoffe für den *menschlichen* Organismus und damit verbundene potentielle Nebenwirkungen genauer untersucht werden.

Wie in dieser Arbeit gezeigt, handelt es sich bei der exprimierten und charakterisierten EhIPK-1 um eine IPK, die keiner bisher bekannten Kinase-Form zuzuordnen ist. Daher war es wichtig, potentielle Hemmstoffe zu untersuchen, die sowohl die IPMK als auch andere Kinasen (z.B. IP3K) hemmen können. Wie der Ergebnisteil zeigt, scheint die EhIPK-1 nicht nur einen atypischen Funktionsumfang zu haben, sondern ist auch bezüglich der Substanzen, die einen inhibitorischen Effekt auf die Kinase haben, nicht einer speziellen Kinaseform zuordenbar.

Nach Identifikation von multiplen Inhibitoren für die EhIPK-1 ist es nun notwendig, *in vivo*-Untersuchungen durchzuführen, die eine Beurteilung des inhibitorischen Effekts auf *Entamoeba histolytica* zulassen. Hierfür besteht eine Kooperation zwischen Herrn Prof. Dr. med. Mayr und Prof. Dr. med. Tannich im Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg. Neben der Permeabilität der *Entamoeba histolytica*-Zellmembranen für gefundene Hemmstoffe müsste die Wirkung der Substanzen auf Protozoen *in vivo* getestet werden. Sollte eine Inhibierung des Wachstums oder gar eine Abtötung des Organismus zu beobachten sein, könnten die Hemmstoffe der EhIPK-1 als Therapeutika eingesetzt werden. Im Anschluß müssten die Auswirkungen der Inhibitoren auf den *humanen* Organismus untersucht werden. Falls sich die Auswirkungen auf den *menschlichen* Organismus als nicht vorhanden oder unbedenklich herausstellen sollten, wäre eine therapeutische Nutzung des

Wirkstoffs vorstellbar. Aufgrund der Berichte von Resistenzen von *Entamoeba histolytica* gegenüber gängigen medikamentösen Therapien sowie putativer onkogener / tumorfördernder Wirkungen einiger Therapeutika gegen *Entamoeba histolytica* ([Bansal et al., 2006a], [Bansal et al., 2006b]) wäre es ein Fortschritt für die Medizin, falls Alternativpräparate gegen eine *Entamoeba histolytica*-Infektion entwickelt werden könnten.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Inositolphosphatkinasen [IPKs] aus den Protozoen *Entamoeba histolytica* [EhIPK-1] und *Trichomonas vaginalis* [TvIPK-1] bakteriell exprimiert, gereinigt und katalytisch aktiv enzymologisch charakterisiert. Hierbei konnte die Substratselektivität für bestimmte Inositolphosphate, der K_M -Wert für ATP und der K_M -Wert für das jeweils vermutete Hauptsubstrat (Ins(1,4,5) P_3 bzw. Ins P_6) mit dem daraus abzuleitenden v_{max} -Wert ermittelt werden.

Es wurde gezeigt, dass die EhIPK-1 nicht eindeutig einer der Gruppen bekannter Inositolphosphatkinase-Isoformen aus *Metazoen* zugeordnet werden kann. Es handelt sich um eine IPK, die umfangreiche IPMK-Fähigkeiten vorweisen kann und mehrere von *Metazoen* bekannte Substratspezifitäten vereinigt. Neben der Akzeptanz von einer Vielzahl von Inositolphosphat-Substraten, die das Enzym an freien Hydroxylgruppen phosphoryliert, ist die EhIPK-1 in der Lage, eine große Anzahl von pyrophosphorylierten Inositolphosphaten in Form von bspw. PP-Ins P_3 -, PP-Ins P_4 - und PP $_2$ -Ins P_3 -Isomeren zu bilden, deren Funktion bisher noch weitgehend ungeklärt ist. Momentan können nur erste Modelle bezüglich der genauen Struktur dieser Pyrophosphate erstellt werden. Weiterführende Studien, die sich mit der Struktur der Pyrophosphate und Recognition-Sites der EhIPK-1 beschäftigen, könnten Aufschluss darüber geben.

Um der Frage nachzugehen, ob die EhIPK-1 tatsächlich als Ins(1,4,5) P_3 -Kinase fungieren könnte, wäre es sehr interessant eine qualitative und quantitative Bestimmung der Inositolphosphate in *Entamoeba histolytica in vivo* bspw. durch Extraktion der Inositolphosphate mit anschließenden MDD-HPLC-Analysen durchzuführen. Einerseits könnten so die für den Organismus essentiellen und prioritären Synthesewege, die von der EhIPK-1 katalysiert werden, identifiziert werden, andererseits könnten die *in vivo* vorhandenen Aktivitäten und die Funktionsvielfalt der Inositolphosphatkinase mit den hier dargestellten *in vitro*-Daten verglichen werden. Es könnte in diesem Zusammenhang auch die physiologische Konzentration von Ins(1,4,5) P_3 innerhalb des Organismus geklärt werden. Neben der detaillierten Charakterisierung der enzymatischen Eigenschaften der EhIPK-1 konnte in dieser Arbeit auch ein erstes Inhibitorprofil für die Hemmung der Enzymaktivität durch niedermolekulare Substanzen *in vitro* aufgestellt werden. Sollte, wie dies bei *Metazoen* und der *Hefe* anzunehmen ist, der sehr umfangreiche, durch die EhIPK-1 katalysierte Inositolphosphatmetabolismus für die Proliferation und für das Überleben von *Entamoeba histolytica* verantwortlich sein, könnten die identifizierten Inhibitoren (Aurintricarbonsäure, Quercetin, Gossypol und Bengalrosa) als alternative Antibiotika gegen *Entamoeba histolytica*-Infektionen genutzt werden. Die gefundenen IC_{50} -Werte von ca. 2,5 – 10 μ M erscheinen für eine enterale Therapie bereits durchaus brauchbar. In zukünftigen *in vivo*-Untersuchungen müssten dann die Permeation der Substanzen durch die Zellmembran

von *Entamoeba histolytica* und die sich anschließenden zellulären Effekte der Inhibitoren nachgewiesen werden. Zusätzlich sollten die eventuellen Auswirkungen der Hemmstoffe auf den *Menschen*, d.h. potenzielle Nebenwirkungen der neuen Wirkstoffe, betrachtet werden.

Parallel zur EhIPK-1 wurde eine zweite IPK aus *Trichomonas vaginalis* [TvIPK-1] erfolgreich exprimiert, aufgereinigt und enzymologisch untersucht. Neben ersten Untersuchungen bezüglich der Substratselektivität dieses Enzyms (es handelt sich offenbar um eine klassische IP6K) konnte auch der K_M -Wert für ATP und der entsprechende v_{max} -Wert bestimmt werden. Durch weitere Substratselektivitätsuntersuchungen könnten die weiteren IPK-Aktivitäten der TvIPK-1 ebenso wie bei der EhIPK-1 detailliert untersucht werden. Durch weitere Charakterisierung der TvIPK-1 und damit verbundenen Inhibitorversuchen könnten auch hier potentielle Hemmstoffe des Enzyms gefunden werden. Hierfür könnten die gleichen Methoden wie bei der Untersuchung der EhIPK-1 verwendet werden.

8 Literaturverzeichnis

Abel K, Anderson RA, Shears SB. Phosphatidylinositol and inositol phosphate metabolism. *J. Cell. Sci.* 114: 2207-8 [2001].

Albert C, Safrany ST, Bembenek ME, Reddy KM, Reddy KK, Falck JR, Bröcker M, Shears SB, Mayr GW. Biological variability in the structures of diphosphoinositol polyphosphates in *Dyctyostelium discoideum* and mammalian cells. *Biochem. J.* 327: 553-560 [1997].

Artymiuk PJ, Poirrette AR, Rice DW, Willett P. Biotin carboxylase comes into the fold. *Nat. Struct. Biol.* 3: 128-32 [1996].

Bakatselou C, Beste D, Kadri AO, Somanath S, Clark CG. Analysis of genes of mitochondrial origin in the genus *Entamoeba*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 50: 210-214 [2003].

Bakker-Grunwald T und **Wöstmann C**. *Entamoeba histolytica* as a model for the primitive eukaryotic cell. *Parasitol. Today.* 9: 27-31 [1993].

Bansal D, Malla N, Mahajan RC. Drug resistance in amoebiasis. *Indian. J. Med. Res.* 123: 115-8 [2006].

Bansal D, Sehgal R, Chawla Y, Malla N, Mahajan RC. Multidrug resistance in amoebiasis patients. *Indian. J. Med. Res.* 124: 189-94 [2006].

Bertsch U, Haefs M, Möller M, Deschermeier C, Fanick W, Kitzerow A, Ozaki S, Meyer HE, Mayr GW. A novel A-isoform-like inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase from *chicken* erythrocytes exhibits alternative splicing and conservation of intron positions between vertebrates and invertebrates. *Gene.* 228: 61-71 [1999].

Bertsch U, Deschermeier C, Fanick W, Girkontaite I, Hillemeier K, Johnen H, Weglohner W, Emmrich F, Mayr GW. 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 - 1564 [2000].

Bhattacharya A, Arya R, Clark CG, Ackers JP. Absence of lipophosphoglycan-like glycoconjugates in *Entamoeba dispar*. *Parasitology.* 120: 31-5 [2000].

Boettner DR, Huston CD, Linford AS, Buss SN, Houpt E, Sherman NE, Petri WA Jr. *Entamoeba histolytica* phagocytosis of human erythrocytes involves PATMK, a member of the transmembrane kinase family. *PLoS. Pathog.* 4: e8 [2008].

Brehm M. Dissertation: Aufklärung neuer Funktionen von Inositolphosphatkinasen durch zelluläre Lokalisationsstudien [2006].

Bruchhaus I, Loftus BJ, Hall N, Tannich E. The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation. *Eukaryot. Cell.* 2: 501-509 [2003].

Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, Delcher AL, Schatz M, Zhao Q, Wortman JR, Bidwell SL, Alsmark UC, Besteiro S, Sicheritz-Ponten T, Noel CJ, Dacks JB, Foster PG, Simillion C, Van de Peer Y, Miranda-Saavedra D, Barton GJ, Westrop GD, Müller S, Dessi D, Fiori PL, Ren Q, Paulsen I, Zhang H, Bastida-Corcuera FD, Simoes-Barbosa A, Brown MT, Hayes RD, Mukherjee M, Okumura CY, Schneider R, Smith AJ, Vanacova S, Villalvazo M, Haas BJ, Pertea M, Feldblyum TV, Utterback TR, Shu CL, Osoegawa K, de Jong PJ, Hrdy I, Horvathova L, Zubacova Z, Dolezal P, Malik SB, Logsdon JM Jr, Henze K, Gupta A, Wang CC, Dunne RL, Upcroft JA, Upcroft P, White O, Salzberg SL, Tang P, Chiu CH, Lee YS, Embley TM, Coombs GH, Mottram JC, Tachezy J, Fraser-Liggett CM, Johnson PJ. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science.* 315: 207-12 [2007].

Chamberlain PP, Sandberg ML, Sauer K, Cooke MP, Lesley SA, Spraggon G. Structural insights into enzyme regulation for inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B. *Biochemistry.* 44: 14486-14493 [2005].

Chang SC, Miller AL, Feng Y, Wentz SR, Majerus PW. The human homolog of the rat inositol phosphate multikinase is an inositol 1,3,4,6-tetrakisphosphate 5-kinase. *J. Biol. Chem.* 277: 43836-43 [2002].

Chavez-Munguia B, Espinosa-Cantellano M, Castanon G, Martinez-Palomo A. Ultrastructural evidence of smooth endoplasmic reticulum and golgi-like elements in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Arch. Med. Res.* 31: 165-167 [2000].

Clark CG. Cryptic genetic variation in parasitic protozoa. *J. Med. Microbiol.* 49: 489-91 [2000].

Clark CG und Roger AJ. Direct evidence for secondary loss of mitochondria in *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 6518-21 [1995].

Communi D, Takazawa K, Erneux C. Lys-197 and Asp-414 are critical residues for binding of ATP/Mg²⁺ by rat brain inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase. *Biochem. J.* 291: 811–816 [1993].

Das S und Lohia. A. Delinking of S phase and cytokinesis in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell. Microbiol.* 4: 55-60 [2002].

Deschermeier C. Dissertation: Molekulare Erkennung von Inositolphosphaten durch ihre Rezeptorproteine – Untersuchung von Struktur-Funktions-Beziehungen am Beispiel der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase [2005].

Diamond LS und **Clark CG.** A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J. Eukaryot. Microbiol.* 40: 340-344 [1993].

Fan C, Moews PC, Walsh CT, Knox JR. Vancomycin resistance: structure of D-alanine:D-alanine ligase at 2.3 Å resolution. *Science.* 266: 439-43 [1994].

Garber GE. The laboratory diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 16: 35-8 [2005].

Galperin MY und **Koonin EV.** A diverse superfamily of enzymes with ATP-dependent carboxylate-amine/thiol ligase activity. *Protein. Sci.* 6: 2639-43 [1997].

Giri B, Raha S, Bhattacharya B, Biswas S, Biswas BB. Relative importance of inositol (1,4,5)trisphosphate and inositol (1,3,4,5)tetrakisphosphate in *Entamoeba histolytica*. *FEBS. Lett.* 393: 109-12 [1996].

Gonzalez B, Schell MJ, Irvine RF, Williams RL. Structure of a human inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase: substrate binding reveals why it is not a phosphoinositide 3-kinase. *Mol. Cell.* 15: 689-701 [2004].

Gschwendt M, Müller HJ, Kielbassa K, Zang R, Kittstein W, Rincke G, Marks F. Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199: 93-8 [1994].

Guse AH, Goldwisch A, Weber K und Mayr GW. Non-radioactive, isomer-specific inositol phosphate mass determinations: high-performance liquid chromatography-micro-metal-dye detection strongly improves speed and sensitivity of analyses from cells and micro-enzyme assays. *J. Chromatogr.* 672: 189-198 [1995].

Haque R, Ali IM, Sack RB, Farr BM, Ramakrishnan G, Petri WA Jr. Amebiasis and mucosal IgA antibody against the *Entamoeba histolytica* adherence lectin in Bangladeshi children. *J. Infect. Dis.* 183: 1787-1793 [2001].

Henley GL, Lee CM, Takeuchi A. Freezeetching observations of trophozoites of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Z. Parasitenkd.* 48: 181-190 [1976].

Holmes W und **Jogl G**. Crystal structure of inositol phosphate multikinase 2 and implications for substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 281: 38109-38116 [2006].

Higgins DG und **Sharp PM**. CLUSTAL: A package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene.* 73: 237-244 [1988].

Higgins DG und **Sharp PM**. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *CABIOS.* 5: 151-153 [1989].

Higgins DG, **Bleasby AJ**, **Fuchs R**. CLUSTAL V: Improved software for multiple sequence alignment. *CABIOS.* 8: 189-191 [1992].

Higgins DG, **Thompson JD**, **Gibson TJ**. Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods. Enzymol.* 266: 383-402 [1996].

Huang X. On global sequence alignment. *Comput. Appl. Biosci.* 10: 227-35 [1994].

Irvine RF und **Schell MJ**. Back in the water: the return of the inositol phosphates. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2: 327-338 [2001].

Irvine R. Cell signaling. The art of the soluble. *Science.* 316: 845-6 [2007].

Jeanmougin F, **Thompson JD**, **Gouy M**, **Higgins DG** and **Gibson TJ**. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends. Biochem. Sci.* 23: 403-5 [1998].

Johnson LN, **Lowe ED**, **Noble MEM**, **Owen DJ**. The Eleventh datta lecture. The structural basis for substrate recognition and control by protein kinases. *FEBS. Lett.* 430: 1-11 [1998].

Koprla EC. Dissertation: Kernteilung und Microtubuli-Systeme bei *Trichomonas vaginalis* [1978].

Kozak M. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene.* 361: 13-37 [2005].

Köhler W, **Eggers HJ**, **Fleischer B**, **Marre R**, **Pfister H**, **Pulverer G**. Medizinische Mikrobiologie, 8. Auflage, *Urban und Fischer München* [2001].

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-5 [1970].

Lambert C, **Leonard N**, **De Bolle X**, **Depiereux E**. ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures. *Bioinformatics.* 18: 1250-1256 [2002].

Leippe M, Ebel S, Schoenberger OL, Horstmann RD, Muller-Eberhard HJ. Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88: 7659-7663 [1991].

Leippe M. Amoebapores. *Parasitol. Today*. 13: 178-183 [1997].

Leitsch D, Kolarich D, Wilson IB, Altmann F, Duchêne M. Nitroimidazole action in *Entamoeba histolytica*: a central role for thioredoxin reductase. *PLoS. Biol.* 5: e211 [2007].

Leon-Avila G und **Tovar J**. Mitosomes of *Entamoeba histolytica* are abundant mitochondrion-related remnant organelles that lack a detectable organellar genome. *Microbiology*. 150: 1245-1250 [2004].

Lin H, Fridy PC, Ribeiro AA, Choi JH, Barma DK, Vogel G, Falck JR, Shears SB, York JD, Mayr GW. Structural analysis and detection of biological inositol pyrophosphates reveal that the family of VIP/diphosphoinositol pentakisphosphate kinases are 1/3-kinases. *J. Biol. Chem.* 284: 1863-72 [2009].

Loftus B, Anderson I, Davies R, Alsmark UC, Samuelson J, Amedeo P, Roncaglia P, Berriman M, Hirt RP, Mann BJ, Nozaki T, Suh B, Pop M, Duchene M, Ackers J, Tannich E, Leippe M, Hofer M, Bruchhaus I, Willhoeft U, Bhattacharya A, Chillingworth T, Churcher C, Hance Z, Harris B, Harris D, Jagels K, Moule S, Mungall K, Ormond D, Squares R, Whitehead S, Quail MA, Rabinowitsch E, Norbertczak H, Price C, Wang Z, Guillén N, Gilchrist C, Stroup SE, Bhattacharya S, Lohia A, Foster PG, Sicheritz-Ponten T, Weber C, Singh U, Mukherjee C, El-Sayed NM, Petri WA Jr, Clark CG, Embley TM, Barrell B, Fraser CM, Hall N. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*. 433: 865-8 [2005].

Lohia A. The cell cycle of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Cell. Biochem.* 253: 217-22 [2003].

Lorenzi H, Inman J, Schobel S, Amedeo P, Caler E. Accession-number: XP_001736963 / XP_001739264; Definition: Inositol polyphosphate multikinase, putative [*Entamoeba dispar* SAW760].

Lowe ED, Noble ME, Skamnaki VT, Oikonomakos NG, Owen DJ, Johnson LN. The crystal structure of a phosphorylase kinase peptide substrate complex: kinase substrate recognition. *EMBO. J.* 16: 6646 – 6658 [1997].

Luo HR, Saiardi A, Yu H, Nagata E, Ye K, Snyder SH. Inositol pyrophosphates are required for DNA hyperrecombination in protein kinase C1 mutant yeast. *Biochemistry*. 41: 2509-2515 [2002].

Mai Z, Ghosh S, Frisardi M, Rosenthal B, Rogers R, Samuelson J. Hsp60 is targeted to a cryptic mitochondrion-derived organelle („crypton“) in the microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Cell. Biol.* 19: 2198-205 [1999].

Maréchal Y, Pesesse X, Jia Y, Pouillon V, Pérez-Morga D, Daniel J, Izui S, Cullen PJ, Luo O, Luo HR, Erneux C, Schurmans S. Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate controls proapoptotic Bim gene expression and survival in B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104: 13978-83 [2007].

Mayr GW; Hrsg. Irvine RF. Mass determination of inositol phosphates by highperformance liquid chromatography with postcolumn complexometry (metal-dyedetection). *Methods in Inositide Research, Raven Press, New York* [1990].

Mayr GW, Windhorst S, Hillemeier K. Antiproliferative plant and synthetic polyphenolics are specific inhibitors of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinases and inositol polyphosphate multikinase. *J. Biol. Chem.* 280: 13229-40 [2005].

Miller GJ und **Hurley** JH. Crystal structure of the catalytic core of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase. *Mol. Cell.* 15: 703-11 [2004].

Miller GJ, Wilson MP, Majerus PW, Hurley JH. Specificity determinants in inositol polyphosphate synthesis: crystal structure of inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase. *Mol. Cell.* 18: 201-12 [2005].

Morrison H, Bauer JA, Kalvakolanu DV, Lindner DJ. Inositol hexakisphosphate kinase 2 mediates growth suppressive and apoptotic effects of inteferon- β in ovarian carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 276: 24965-24970 [2001].

Morrison BH, Bauer JA, Hu J, Grane RW, Ozdemir AM, Chawla-Sarkar M, Gong B, Almasan A, Kalvakolanu DV, Lindner DJ. Inositol hexakisphosphate kinase 2 sensitizes ovarian carcinoma cells to multiple cancer therapeutics. *Oncogene.* 21: 1882-1889 [2002].

Morrison BH, Bauer JA, Lupica JA, Tang Z, Schmidt H, DiDonato JA, Lindner DJ. Effect of inositol hexakisphosphate kinase 2 on transforming growth factor beta-activated kinase 1 and NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* 282: 15349-56 [2007].

Nagata E, Luo HR, Saiardi A, Bae BI, Suzuki N, Snyder SH. Inositol hexakisphosphate kinase-2, a physiologic mediator of cell death. *J. Biol. Chem.* 280: 1634-40 [2005].

Nalaskowski MM, Deschermeier C, Fanick W, Mayr GW. The *human* homologue of *yeast* ArgR111 protein is an inositol phosphate multikinase with predominantly nuclear localization. *Biochem. J.* 366: 549-56 [2002].

Nalaskowski MM, Bertsch U, Fanick W, Stockebrand MC, Schmale H, Mayr GW. *Rat* inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C is enzymatically specialized for basal cellular inositol trisphosphate phosphorylation and shuttles actively between nucleus and cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 278: 19765-76 [2003].

Nalaskowski MM und **Mayr** GW. The families of kinases removing the Ca²⁺ releasing second messenger Ins(1,4,5)P₃. *Curr. Mol. Med.* 4: 277-90 [2004].

Ochsendorf FR. Sexually transmitted infections: impact on male fertility. *Andrologia.* 40: 72-5 [2008].

Odom AR, Stahlberg A, Wente SR, York JD. A role for nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate kinase in transcriptional control. *Science.* 287: 2026 – 2029 [2000].

Pereira-Neves A und **Benchimol** M. *Trichomonas vaginalis*: in vitro survival in swimming pool water samples. *Exp. Parasitol.* 118: 438-41 [2008].

Petri WA Jr, Haque R, Mann BJ. The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 39-64 [2002].

Petri WA Jr und **Singh** U. Diagnosis and management of amebiasis. *Clin. Infect. Dis.* 29: 1117-1125 [1999].

Pinilla AE, López MC, Viasus DF. History of the *Entamoeba histolytica* protozoan. *Rev. Med. Chil.* 136: 118-24 [2008].

Que X und **Reed** SL. The role of extracellular cysteine proteinases in pathogenesis of *Entamoeba histolytica* invasion. *Parasitol. Today.* 13: 190-194 [1997].

Raha S, Dalal B, Biswas S, Biswas BB. Myo-inositol trisphosphate-mediated calcium release from internal stores of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 65: 63-71 [1994].

Raha S, Giri B, Bhattacharya B, Biswas BB. Inositol(1,3,4,5) tetrakisphosphate plays an important role in calcium mobilization from *Entamoeba histolytica*. *FEBS. Lett.* 362: 316-8 [1995].

Ravdin JI, Moreau F, Sullivan JA, Petri WA Jr, Mandell GL. Relationship of free intracellular calcium to the cytolytic activity of *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* 56: 1505-12 [1988].

Rosenbaum RM und **Wittner** M. Ultrastructure of bacterized and axenic trophozoites of *Entamoeba histolytica* with particular reference to helical bodies. *J. Cell. Biol.* 45: 367-82 [1970].

Safrany ST, Caffrey JJ, Yang X, Bembenek ME, Moyer MB, Burkhart WA, Shears SB. A novel context for the 'MutT' module, a guardian of cell integrity, in a diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase. *SB. EMBO. J.* 17: 6599-607 [1998].

Safrany ST, Caffrey JJ, Yang X, Shears SB. Diphosphoinositol polyphosphates: the final frontier for inositide research? *Biol. Chem.* 380: 945-951 [1999].

Saiardi A, Erdjument-Bromage H, Snowman AM, Tempst P, Snyder SH. Synthesis of diphosphoinositol pentakisphosphate by a newly identified family of higher inositol polyphosphate kinases. *Curr. Biol.* 9: 1323-6 [1999].

Saiardi A, Caffrey JJ, Snyder SH, Shears SB. Inositol polyphosphate multikinase (ArgR111) determines nuclear mRNA export in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS. Lett.* 468: 28–32 [2000a].

Saiardi A, Caffrey JJ, Snyder SH, Shears SB. The inositol hexakisphosphate kinase family. Catalytic flexibility and function in yeast vacuole biogenesis. *J. Biol. Chem.* 275: 24686-92 [2000b].

Saiardi A, Nagata E, Luo HR, Sawa A, Luo X, Snowman AM, Snyder SH. Mammalian inositol polyphosphate multikinase synthesizes inositol 1,4,5-trisphosphate and an inositol pyrophosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 2306–2311 [2001a].

Saiardi A, Nagata E, Luo HR, Snowman AM, Snyder SH. Identification and characterization of a novel inositol hexakisphosphate kinase. *J. Biol. Chem.* 276: 39179-85 [2001b].

Saiardi A, Bhandari R, Resnick AC, Snowman AM, Snyder SH. Phosphorylation of proteins by inositol pyrophosphates. *Science.* 306: 2101-5 [2004].

Saiardi A, Resnick AC, Snowman AM, Wendland B, Snyder SH. Inositol pyrophosphates regulate cell death and telomere length through phosphoinositide 3-kinase-related protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 1911–1914 [2005].

Saitou N und **Nei** M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425 [1987].

Salles JM, Salles MJ, Moraes LA, Silva MC. Invasive amebiasis: an update on diagnosis and management. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 5: 893-901 [2007].

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 5463-7 [1977].

Scholze H und **Tannich** E. Cysteine endopeptidases of *Entamoeba histolytica*. *Methods. Enzymol.* 244: 512-523 [1994].

Schreiber I. Dissertation: Regulation und subzelluläre Verteilung der Isoform B von Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase aus *Rattus norvegicus* (BERKENHOUT, 1769) [2002].

Shen X, Xiao H, Ranallo R, Wu WH, Wu C. Modulation of ATP-dependent chromatin-remodeling complexes by inositol polyphosphates. *Science*. 299: 112-4 [2003].

Shears SB. Assessing the omnipotence of inositol hexakisphosphate. *Cell. Signal*. 13: 151-158 [2001].

Shears SB. How versatile are inositol phosphate kinases? *Biochem. J*. 377: 265–280 [2004].

Stanley SL Jr. Vaccines for amoebiasis: barriers and opportunities. *Parasitology*. 133: 81-6 [2006].

Stauffer W und **Ravdin JI**. *Entamoeba histolytica*: an update. *Curr. Opin. Infect. Dis*. 16: 479-485 [2003].

Steger DJ, Haswell ES, Miller AL, Wentz SR, O'Shea EK. Regulation of chromatin remodeling by inositol polyphosphates. *Science*. 299: 114-6 [2003].

Stryer L. Biochemie, 1. korrigierter Nachdruck 1999 der 4. Auflage, 1996, *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg* [1999].

Studier JA und **Keppeler KJ**. A note on the neighbor-joining algorithm of Saitou and Nei. *Molecular Biology and Evolution* 5: 729-731 [1988].

Sutcliffe S, Giovannucci E, Alderete JF, Chang TH, Gaydos CA, Zenilman JM, De Marzo AM, Willett WC, Platz EA. Plasma antibodies against *Trichomonas vaginalis* and subsequent risk of prostate cancer. *Cancer. Epidemiol. Biomarkers. Prev*. 15: 939-45 [2006].

Tachibana H, Ihara S, Kobayashi S, Kaneda Y, Takeuchi T, Watanabe Y. Differences in genomic DNA sequences between pathogenic and nonpathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* identified by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol*. 29: 2234-2239 [1991].

Tannich E, Ebert F, Horstmann RD. Primary structure of the 170-kDa surface lectin of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88: 1849-1853 [1991].

Tannich E, Ebert F, Horstmann RD. Molecular cloning of cDNA and genomic sequences coding for the 35-kilodalton subunit of the galactose-inhibitable lectin of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol*. 55: 225-227 [1992].

Tannich E. Amoebic disease. *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*: comparison of molecules considered important for host tissue destruction. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 92: 593-596 [1998].

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids. Research.* 22: 4673-4680 [1994].

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids. Research.* 25: 4876-4882 [1997].

Togashi S, Takazawa K, Endo T, Erneux C, Onaya T. 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 [1997].

Torres-Goméz H, Hernández-Núñez E, León-Rivera I, Guerrero-Alvarez J, Cedillo-Rivera R, Moo-Puc R, Argotte-Ramos R, Rodríguez-Gutiérrez Mdel C, Chan-Bacab MJ, Navarrete-Vázquez G. Design, synthesis and in vitro antiprotozoal activity of benzimidazole-pentamidine hybrids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18: 3147-51 [2008].

Tovar J, Fischer A, Clark CG. The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Microbiol.* 32: 1013-1021 [1999].

Verteramo R, Calzolari E, Degener AM, Masciangelo R, Patella A. *Trichomonas vaginalis* infection: Risk indicators among women attending for routine gynecologic examination. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 34: 233-7 [2008].

Villalba JD, Gómez C, Medel O, Sánchez V, Carrero JC, Shibayama M, Ishiwara DG. Programmed cell death in *Entamoeba histolytica* induced by the aminoglycoside G418. *Microbiology.* 153: 3852-63 [2007].

Wang W und **Malcolm BA**. Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Directed Mutagenesis. *Biotechniques.* 26: 680-2 [1999].

York JD. Regulation of nuclear processes by inositol polyphosphates. *Biochim. Biophys. Acta.* 1761: 552-9 [2006].

Young JD, Young TM, Lu LP, Unkeless JC, Cohn ZA. Characterization of a membrane pore-forming protein from *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 156: 1677-1690 [1982].

Zhang T, Caffrey JJ, Shears SB. The transcriptional regulator, Arg82, is a hybrid kinase with both monophosphoinositol and diphosphoinositol polyphosphate synthetase activity. *FEBS. Lett.* 494: 208–212 [2001].

9 Anhang

Aminosäuresequenz der exprimierten und charakterisierten EhIPK-1:

Im Folgenden ist die Aminosäuresequenz der IPK aus *Entamoeba histolytica* dargestellt. Die letzten beiden Aminosäuren (Serin und Alanin) wurden ebenfalls translatiert und bilden den Linker zwischen der Aminosäuresequenz der EhIPK-1 und dem Strep-Tag des Expressionsvektors:

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MNTKIKREHMSTKKSQWVQAGGHGGPQQLHPDGOYLLKPCLSHRERDFYLHIKDDKEWTGTGIIPKFGVELHEFGFGEEL
      90     100     110     120     130     140     150     160
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
EFIRMENLMYKYKRPVLDLKIGTQTDPEATASSKMKKRLVVDSTSTTTSLGVRFGEMERNIGEEKPILYSRYLCTHEVNV
      170    180    190    200    210    220    230    240
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TRDSLKEYIKLFFNDGKYRKEVLPYFISQLDKMIEVMKREYKMFSSSVLFVYDSTTTLEDKKNCKMIDFAHNWILSE
      250    260    270
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
EECTVEDGFLFGLNNLKSILEDIENEFKLSLA

```

Aminosäuresequenz der exprimierten und charakterisierten TvIPK-1:

Die abgebildete Aminosäuresequenz, die für die TvIPK-1 codiert, wurde in der Arbeit kloniert, exprimiert und charakterisiert.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MESNSDSFSSDLDPLNTQGGGHGQLCKIKNLDHGDICVAKPLFEHENNFYTIMTKTPLADCLPRFFGNTQIDGHEYLLI
      90     100     110     120     130     140     150     160
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
EDLTAGMTSPCIADLKLGRSEIGVSESKVRKQMQNMSKSTTPKYAVRIIDVSMRKDGNLVNHWDNRFKKAPIQSFIID
      170    180    190    200    210    220    230    240
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TMNKFIPVNRKQEFLDKVEDVITKLTQTKIYPGSRLYSASLLVVYDGDQLPIRVALIDFAHAYSIDITQCSGKMDSEEF
      250    260
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
EDNTIILGLRNIIHLLTDPTELEKRQI

```

Alignments der putativen 3D-Strukturmodelle der EhIPK-1:**Alignment für das putative 3D-Strukturmodell Nr. 1:**

```

Query      1  -----KKSQWVQAGGHGGPQQLHPDGGYLLKPKCLSHRERDFYLHIKDDKEWTG
Template   1  MVQWSPFVMSFKKKYPWIQLAGHAGSFKAAANGRI LKKHCESEQRC--LDR---LMADVL

Query      49  TGIIPKFGVELHEFGFGELEFIRMENLMYKYPKPFVLDLKIGTQTWDPETASSKMKRL
Template   56  RPFVPAYHG DVVKDGE---RYNQMDL LADFDSPCVMDCKMGVRYLEELTKARKKPS

Query      109  VV-----DSTSTTSLGVRFSGMERNIGEEK
Template   112  LRKDMYQKMVEVDPEAPTEEEKAQRAVTKPRYMQRWRETISSTATLGFRIEIGIKKEDGSVN

Query      135  PILYSRYLCTHEVNTRDSLKEYIKLFFNDGKRYRKELVPYFISQLDKMIEVMKKR---E
Template   172  -RD-----F---KKTKTREQVTEAFREFTKGNQNILIA YRDR LKAIRATLEISPFK

Query      191  YKMFSSVLFVYDSTTTLEDKYNCKMIDFAHNWIL-----SEECTVEDGFLFG
Template   221  HEVIGSSLFIHDKKE-----QAKVWMIDFGKTPPLEGQTLQHDVWPQEGNREDEGYSLSG

Query      241  LNNLKSILEDI---
Template   276  LDNLIDILTEMSQG

```

Alignment für das putative 3D-Strukturmodell Nr. 2:

Score: 96.5 bits
Identity: 24.3 %

```

Query: 1  NGEYLLKPC LAPREKAFYLKIQNNKEWCESEIIPKFGIEEHDFGYGEFEFIK MENLMNQ 60
      +G + KP P+E FY IQ + C +P + G+ Y + +ENL+
Templ: 1  DGLLIFKPAF-PQELEFYKAIQGDAPLCSW--MPTYLGVLNESKQY-----LVLENLLYG 60

Query: 61  IKKPFVLDLKIGTQTWDPETSSKKMKRLIVDSTSTTSLGVRFSGMRRNVTDKPTLYSR 120
      KP +LD+K+G +D + S +K ++ V T+T+ SLG R GM+ + P++ ++
Templ: 61  FSKPNILDIKLGKTLYDSKASLEKRRMCRVSETTTSGSLGFRICGMK--IQKNPSVLNQ 120

Query: 121  -----YLCTNEV---NTRDSLKEYIKLYFFD---GEKYRNDLLPYFIQSI 180
      Y+ N++ T ++ + I+LYF + + ++ L F++ +
Templ: 121  LSLEYEEEEADSDYIFINKLYGRSRTDQNVSDAIELYFNNPHLS DARKHQLKKTFLKRLQ 180

Query: 181  KMIDVMNKKQFKMFSASVLFVYDSASK-----FEDQKHACKIIDFAHAWD 240
      + M +++ +M S+S+LF+Y+ + F D + +IDFAH+ +
Templ: 181  LFYNTMLEEEVRMISSLLFIYEGDPERWELLNDVDKLMRDDFIDSLSSMSLIDFAHS-E 240

Query: 241  VTEEECNVDDGFVIGLTTLKIMF 263
      +T + D+ + G+ TL +F
Templ: 241  ITPGK-GYDENVIEGVETLLDIF 263

```

Alignment für das putative 3D-Strukturmodell Nr. 3:

Score: 98.0 bits
Identity: 25.2 %

Query: 1 GEFLYKPNTQEASFYEQVQ-HSPLSQFLPKYYSKENIDLGFGSFTYFKMQNVIHGMNHP 60
G ++KP QE FY+ +Q +PL ++P Y N S Y ++N+++G + P
Templ: 1 GLLIFKPAFPQELEFYKAIQGDAPLCSWMPYTLGVLN-----ESKQYLVLENLLYGFSKP 60

Query: 61 CVLDLKMGCRTWFEDSSPEKIKSKQNYDNNTTSTQYGLRFCGMRVFNKDTNIFVQHDKYV 12
+LD+K+G + +S EK + + TTS G R CGM++ K+ ++ Q
Templ: 61 NILDIKLGKTLYDSKASLEKRERMKRVSETTTSGSLGFRICGMKI-QKNPSVLNQ----- 12

Query: 121 MLQMOTYDSLKQMMKVFLTS-HGSIDKQEKFKFSTSLFTLNLDIVNDLHTNPTINHSI 18
L ++ Y+ +F+ +G + + L+ N+ H + H +
Templ: 121 -LSLEYEEEEADSDYIFINKLYGRSRTDQNVSDAIELY-----FNNPHLSDARKHQL 18

Query: 181 VDVMIDKLLKLNLLKEIYEKEGYQIISSSLFLFYDYD-----DPLSTIDF---- 24
+ +L L N + E E ++ISSSL Y+ D D L DF
Templ: 181 KKTFLKRLQLFYNTMLE----EEVRMISSSLFIYEGDPERWELLNDVDKLMRDDFIDSL 24

Query: 241 ---KMIDFAHWKDKNHKYEISDGYINGIQTIITI 274
+IDFAH + K + I G++T++ I
Templ: 241 SSMSLIDFAHSEITPGK-GYDENVIEGVETLLDI 274

Alignment für das putative 3D-Strukturmodell Nr. 4:

Score: 72.0 bits
Identity: 24.8 %

Query: 1 FQAGGHQGCIIQKGN----YLIKKIKNKDLIDWKGLIPYFFNSFIFNNDTFISIENIISK 60
F+A G G I+++ + Y + ++ L +G +P F + +++++ +++++
Templ: 1 FKAAGTSGILKRCSEPERYCLARLMADAL---RGCVPAPFHGVVERDGESYLQQLDLDG 60

Query: 61 YLKPCVLDIKIGNKTWCDE--TDENRK---KERIKLDALTTQ-----NTLGF 12
+ PCVLD K+G +T+ +E T + RK K+ + +D T+ T+ TLGF
Templ: 61 FDGPCVLDCKMGVRTYLEEELTKKLRKDMYKMLAVDPAVTKPRYMQWREGISSSTTLGF 12

Query: 121 RFCGMTITQKDGYSFSINKKIHLEIHSREETIKLLSIFINQLGFEDRIINYYLQOMEKI 18
R G I + DG S S + K SRE+ +++ F+ + ++ YL ++++I
Templ: 121 RIEG--IKKADG-SCSTDFKT---TRSREQVLRVFEEFVQG----DEEVLRRYLNRLQQI 18

Query: 181 KNCINKMKY----HFFSSSLLFVYDIESYQCDCRMIDF 218
++ + ++ SSSLFV+D ++ +IDF
Templ: 181 RDTLEVSEFFRRHEVIGSSLLFVHD-HCHRAGVWLIDF 218

Alignment für das putative 3D-Strukturmodell Nr. 5:

Score: 63.0 bits

Identity: 23.6 %

```
Query: 1 YLFKNAKRYSWNEPSCVLDLKMGCRTWFEDSSPEKIKSKQNYDNNPTSTQYGLRFCGMRV 60
        YL      Y +++P+ +LD+K+G  +  +S EK +  +      TS   G R CGM++
Templ: 1 YLVLENLLYGFSKPN-ILDIKLGKTLYDSKASLEKRERMKRVSETTTSGSLGFRICGMKI 60

Query: 61 FNKDTNIFVQHDKYVMLQMOTYDSLKQMMKVFLTS-HGSIDKQEKFKFSTSLFTLNNLDT 12
        K+ ++ Q      L ++ Y+      +F+  +G      +      + L+
Templ: 61 -QKNPSVLNQ-----LSLEYEEEEADSDYIFINKLYGRSRTDQNVSDAIELY----- 12

Query: 121 IVNDLHTNPTINHSIVDVMIDKLLKLNLLKEIYEKEGYQIISSSLFLFYDYD----- 18
        N+ H +      H +      + +L L N + E      E ++ISSSL  Y+ D
Templ: 121 -FNNPHLSDARKHQLKKTFLKRLQLFYNTMLE----EEVRMISSSLLEFIYEGDPERWELL 18

Query: 181 ---DPLSTIDF-----KMIDFAHWKDKNHKYEISDGYINGIQTIITI 229
        D L  DF      +IDFAH +      K      + I G++T++ I
Templ: 181 NDVDKLMRDDFIDSLSSMSLIDFAHSEITPGK-GYDENVIEGVETLLDI 229
```

10 Danksagung

Besonders danke ich Herrn Prof Dr. med. Mayr für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der räumlichen und apparativen sowie der benötigten finanziellen Mittel. Durch die intensive Betreuung verbunden mit zahlreichen anregenden und erkenntnisreichen Diskussionen war es mir stets möglich, den Überblick über das Thema nicht zu verlieren.

Ich möchte allen Mitarbeitern der AG Prof. Dr. med. Mayr danken. Insbesondere danke ich Dr. Marcus Nalaskowski, Werner Fanick, Dr. Hongying Lin und Dr. Sabine Windhorst für die tatkräftige, kompetente und freundliche Unterstützung.

Ich bedanke mich bei allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern des Instituts für die gute Zusammenarbeit und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Großen Dank auch der DFG für die finanzielle Förderung meiner Promotionsarbeit durch mein Doktorandenstipendium im Rahmen des GRK 336.

Herzlichen Dank an Kerstin Egge, die mich sowohl bei der graphischen Bearbeitung der Illustrationen als auch in allen anderen Belangen jederzeit unterstützt hat.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel für die Übernahme der Betreuung der Arbeit am Institut für Biochemie und Molekularbiologie II - Molekulare Zellbiologie des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf.

Ich möchte die Gelegenheit nutzen, meinen Eltern, Alexander Thieme und Christian Müller zu danken, die mir während der Verfassung dieser Promotionsarbeit auch in schwierigen Abschnitten stets freundschaftlich zur Seite standen und mich in allen Belangen unterstützten.

11 Lebenslauf

◆ Persönliche Daten

Benjamin Lothar Löser

Leuschnerstrasse 25

D-21031 Hamburg

Tel.: 040 / 73 09 80 60

Mobil: 0170 / 861 34 80

e-Mail: Benjamin.Loeser@onlinehome.de

Geburtsdatum	25. November 1980
Geburtsort	Hamburg
Familienstand	Ledig
Nationalität	Deutsch

◆ Schulausbildung

Juni 2000	Abitur am Goethe-Gymnasium Hamburg
Leistungskurse	Englisch, Mathematik

◆ Zivildienst

Juli 2000 – April 2001	Bei JUH Hamburg und KBA e.V. Norderstedt im Bereich Hausnotruf, Krankentransport und Rettungsdienst als Rettungssanitäter
------------------------	---

◆ Studium

Oktober 2001	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
September 2003	Physikum
August 2006 – Juli 2007	Praktisches Jahr: <ol style="list-style-type: none"> 1. PJ-Tertial im Fachbereich Chirurgie am am Royal Hobart Hospital in Hobart (Australien) bei Prof. P. Stanton 2. PJ-Tertial im Fachbereich Anästhesiologie an der Asklepios Klinik Hamburg Barmbek bei Dr. med. Wirtz 3. PJ-Tertial im Fachbereich Innere Medizin bei Prof. Dr. med. Lock
November 2007	Staatsexamen in Humanmedizin
September 2004 – voraussichtlich Juli 2009	Promotionsarbeit am Institut für Biochemie und Molekularbiologie Hamburg bei Direktor Prof. Dr. med. Georg W. Mayr mit dem Thema: „Rekombinante Expression, Charakterisierung und Targeteigenschaften von Inositolphosphatkinasen humanpathogenen Protozoen“
Januar 2006	Stipendium für Mediziner der DFG und Mitglied im Graduiertenkolleg 336 „Molekulare Endokrinologie – Molekularer Stoffwechsel“,

leistungsbedingt im Rahmen der Promotionsarbeit

◆ **Weitere Ausbildung**

Januar 2001 – Mai 2001 Ausbildung zum Rettungssanitäter
 April 2004 Einschreibung an der Fern-Universität Hagen im Fachbereich BWL

◆ **Arbeitserfahrungen**

Juni 2001 – November 2007 Als Rettungssanitäter im Rettungsdienst tätig bei KBA e.V. Norderstedt mit Erfahrung auf RTW und NEF

Mai 2004 – Juli 2007 Dozententätigkeit für Fortbildung Rettungsdienst bei KBA e.V. Norderstedt;
 Fach-Vorträge am UKE Hamburg im Bereich Biochemie

Februar 2005 – Juli 2007 Ausbildung und Dozententätigkeit bei Seminare 360° GbR

Seit Dezember 2007 Assistenzarzt in der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie (Direktor: Prof. Dr. med. Alwin E. Goetz) des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

◆ **Auslandsaufenthalte**

September 2004 – November 2004 Sprachreise nach Boston, Massachusetts, USA

August 2006 – Dezember 2006 Absolvierung des chirurgischen Tertials (PJ) an der Universität Tasmanien (Australien) am Royal Hobart Hospital

◆ **Zusatzqualifikationen**

Praktika Biochemie und Molekularbiologie für Zusatzqualifikation „Grundlagen der molekularen Medizin“ am Institut für Biochemie und Molekularbiologie Hamburg

Sprachen Englisch flüssig in Wort und Schrift
 Französisch in Wort und Schrift
 Kleines Latinum

Computerkenntnisse Betriebssysteme: Windows 98/ME/2000/XP/Vista
 Anwendungen: Microsoft Office (Word, Excel, Powerpoint)

◆ **Persönliche Interessen**

Kirchenorgel, Klavier und Gesang mit Schwerpunkt auf klassischer Musik;
 Mehrere öffentliche Konzerte

Sportliche Betätigung in den Bereichen Badminton, Squash und Tennis

12 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: