

### 5. Zusammenfassung

Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase {Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase} ist ein Enzym, welches ubiquitär in allen bisher untersuchten tierischen Geweben gefunden wurde. Dieses Enzym spielt eine zentrale Rolle in dem anabolen Signal-Stoffwechsel von Inositolphosphaten in tierischen Zellen. Es metabolisiert den Ca<sup>2+</sup>-freisetzenden sekundären Botenstoff Inositol 1,4,5-trisphosphat unter Mitwirkung von ATP zum Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphat, welches das Substrat für die Biosynthese aller höher phosphorylierten Inositele (Inositoltetrakis, pentakis- und hexakisphosphate) ist. Für Letztere wurde vor kurzem eine Bedeutung bei der Zellproliferation aufgezeigt.

Zur Aufklärung der Rolle der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase sowie der vom Produkt, dem Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>, abgeleiteten höher phosphorylierten Inositele in der intakten Zelle wurde die rekombinante Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase A aus Hühnererythrozyten auf potente Hemmstoffe getestet. Mit Hilfe eines gekoppelten optischen Enzymtests wurden polyphenolische pflanzliche und aus Pilzen isolierte Verbindungen aus den Stoffklassen der Flavonoide, Anthrachinone, Cumarine, Triphenylmethane, Tyrphostine, Perylenequinone und Staurosporinderivate sowie viele weitere biologische Wirkstoffe auf einen Inhibitionseffekt am Enzym getestet. Unter den ca. 200 getesteten Substanzen konnten die Ellagsäure (IC<sub>50</sub>: 36 nM), Gossypol (IC<sub>50</sub>: 58 nM), (-)-Epicatechin-3-gallat (IC<sub>50</sub>: 94 nM), (-)-Epigallocatechin-3-gallat (IC<sub>50</sub>: 120 nM), Aurintricarbonsäure (IC<sub>50</sub>: 150 nM), Hypericin (IC<sub>50</sub>: 170 nM) und Quercetin (IC<sub>50</sub>: 180 nM) als potenteste Hemmstoffe der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase A identifiziert werden.

Da weitere Isoformen der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase (B und C) in Zellen vorkommen, wurden die Inhibitoren ebenfalls auf einen Hemmeffekt an der rekombinanten Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase B getestet. Aurintricarbonsäure sowie Hypericin hemmten die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase B in vergleichbarer Weise wie die Isoform A. Bei den verbleibenden Stoffen zeigte sich eine um den Faktor 6 - 23 geringere Inhibition der Isoform B. Die Daten zeigten, daß die Hemmung der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase durch die identifizierten Inhibitoren nicht streng Isoform-A-spezifisch ist. Größere Unterschiede in der Hemmung verschiedener Isoformen können mittels eines entsprechenden Selektivitätsscreening herausgearbeitet werden. Die in dieser Studie erhaltenen Daten liefern bereits Leitstrukturen für selektive Inhibitoren der Isoformen A und B.

Die Hemmung der Enzymaktivität konnte durch Triton X-100 und durch Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin bei den jeweiligen Inhibitoren unterschiedlich stark antagonisiert werden.

In einer steady-state kinetischen Analyse wurde ermittelt, daß keiner dieser potenten Inhibitoren mit dem Substrat  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  um die Bindung am aktiven Zentrum der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinase konkurriert (nicht-kompetitiver Hemmtyp). Dagegen zeigten alle potenten Hemmstoffe eine gemischte Hemmung (mixed-type inhibition) in Bezug auf das Substrat ATP, vermutlich weil die Hemmstoffe aufgrund ihres aromatischen Ringsystems den hydrophoben Basenanteil des Nukleotids imitieren und auf diesem Wege partiell um die Bindungsstelle des ATP konkurrieren.

Anhand von Mutanten der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinase, hergestellt durch gezielte Mutagenese, wurde gezeigt, daß diese Inhibitoren, die als gemeinsames Strukturelement eine oder mehrere Carbonylgruppen aufweisen, über eine vermutlich kovalente Bindung mit der  $\epsilon\text{-NH}_2$ -Gruppe eines Lysinrestes (Schiff'sche Base) in einem speziellen Segment des katalytischen Zentrums mit dem Enzym interagieren. Am Beispiel von 3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon konnte gezeigt werden, daß der Austausch der Aminosäure Lysin-272 gegen Asparaginsäure zu einem um Faktor 290 verringerten Inhibitionseffekt der Enzymaktivität führt, so daß dieser Rest mit höchster Wahrscheinlichkeit für die Hemmstoffbindung essentiell ist.

Die Wirkung der effektivsten Inhibitoren auf intakte Zellen wurde an zwei verschiedenen Zelllinien (Jurkat T-Zellen, NIH 3T3-Zellen) analysiert. Für sämtliche potente Inhibitoren konnte eine starke proliferationshemmende Wirkung gezeigt werden.

Ebenfalls wurde der Einfluß der Hemmstoffe auf den Zellzyklus von Jurkat T-Zellen untersucht. Die ermittelten Daten dieser Analyse zeigten, daß Gossypol, (-)-EGCG und 3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon den Zellzyklus in der S-Phase hemmten. Dagegen konnte beobachtet werden, daß Quercetin in geringeren und höheren Konzentrationen ( $\leq 5 \mu\text{M}$ ,  $\geq 20 \mu\text{M}$ ) eine Anhäufung der Zellen in der  $\text{G}_2/\text{M}$ -Phase bewirkte. Andererseits hemmte diese Verbindung bei einer Dosis von  $10 \mu\text{M}$  den Zellzyklus ebenfalls in der S-Phase.

Die Wirkung der potentesten  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinaseinhibitoren auf den Stoffwechsel der höher phosphorylierten Inositole in intakten Jurkat T-Zellen wurde am Beispiel von Quercetin und Gossypol im Detail analysiert. Unter Anwendung des Verfahrens der „High-performance-liquid-chromatography“ mittels der Metal-Dye-Detection-Methode (MDD-HPLC) zur Analyse aller höher phosphorylierten Inositole konnte gezeigt werden, daß sowohl Quercetin als auch Gossypol über die Hemmung der endogenen  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinaseaktivität die Biosynthese der meisten höher phosphorylierten Inositole bis hin zum  $\text{InsP}_5$  und weniger stark zum  $\text{InsP}_6$  und  $\text{InsP}_7$  hemmen.

Das hier identifizierte molekulare Target polyphenolischer Pflanzenstoffe ist dasjenige mit der höchsten bisher gefundenen Affinität. Es könnte eine kausale Bedeutung bei der bei diesen Stoffen beobachteten antiproliferativen und apoptotischen Wirkung haben. Durch ein derzeit laufendes Experiment mit stabiler Expression einer hemmstoffresistenten Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase in Zellkulturen sollte diese Hypothese bewiesen oder widerlegt werden.

In dieser Arbeit wurde weiterhin die Inositolphosphat-Bindungsdomäne des Enzyms durch ein sog. „active site mapping“ charakterisiert. Hierfür wurden eine Reihe von biologischen myo-Inositolphosphaten (InsPs) sowie synthetische Analoga des natürlichen Substrats der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase auf ihr Potential getestet, als alternative Substrate der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase zu fungieren. Zusätzlich zum Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> konnten 12 myo-Inositolphosphatisomere und 6 InsP-Analoga als Substrate der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase identifiziert werden. Hierbei konnte gezeigt werden, daß das Vorhandensein der vicinalen 4,5-äquivalenten äquatorialen Phosphatgruppen sowie eine freie äquatoriale 3-äquivalente Hydroxylgruppe essentiell für eine Phosphorylierung mittels der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase sind. D-Ins(1,4,6)P<sub>3</sub> sowie das Analogon L-scylo-Ins(1,2,4)P<sub>3</sub> zeigten unter den getesteten aktiven Substanzen eine höhere bzw. gleiche Substrataffinität wie das D-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> (K<sub>m</sub>: 0.19 µM und 0.36 µM). Inaktive oder schwach-substrataktive InsPs und Analoga wurden auch auf eine kompetitive Hemmung des Enzyms getestet. Unter diesen Verbindungen waren das D-Ins(1,4,6)P<sub>3</sub> (K<sub>i</sub>: 2.62 µM) und scylo-Ins(1,2,3,5)P<sub>4</sub> (K<sub>i</sub>: 16.7 µM) die effektivsten Inhibitoren der Kinaseaktivität. Ebenso wurde die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase A durch das Phosphoinositid PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 8 µM gehemmt. Das PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, welches ebenfalls untersucht wurde, zeigte den Mechanismus einer nicht-kompetitiven Hemmung. Hier aufgefundene alternative biologische Substrate oder Hemmstoffe können beim komplexen Metabolismus der InsPs in der intakten Zelle bedeutsam sein. Eine Umsetzung alternativer Substrate durch die rekombinante Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase kann für die biosynthetische Herstellung biologisch wichtiger InsPs und Analoga aus geringer phosphorylierbaren Ausgangsverbindungen nützlich sein.