

Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie  
der Universität Hamburg  
Abteilung für Zelluläre Signaltransduktion

**Molekulare Erkennung von Inositolphosphaten  
durch ihre Rezeptorproteine –**

**Untersuchung von Struktur-Funktions-Beziehungen  
am Beispiel der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften  
des Fachbereichs Chemie  
an der Universität Hamburg

vorgelegt von  
Christina Deschermeier  
aus München

Hamburg 2002

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Meyer
2. Gutachter: Prof. Dr. G.W. Mayr

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie des Universitätsklinikums Eppendorf in der Abteilung für Zelluläre Signaltransduktion in der Zeit vom März 1997 bis Mai 2002 angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Meyer
2. Gutachter: Prof. Dr. G.W. Mayr

Tag der Disputation: 10.01.2003

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie des Universitätsklinikums Eppendorf in der Abteilung für Zelluläre Signaltransduktion durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. G.W. Mayr danke ich für die Bereitstellung der räumlichen, apparativen und materiellen Voraussetzungen zur Durchführung dieser Arbeit, für die interessante Themstellung sowie für seine große Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. Uwe Bertsch danke ich für die intensive Einführung in molekularbiologische und proteinbiochemische Arbeitstechniken und die Betreuung dieser Arbeit.

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

Heiko Möller, Moriz Mayer und Robert Meinecke aus dem Arbeitskreis Meyer danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der NMR-Experimente.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. B. Meyer für die Übernahme der Betreuung der Arbeit am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg.

Die Arbeit wurde finanziell durch ein Stipendium des Graduiertenkollegs 336 (Molekulare Endokrinologie und Molekularer Stoffwechsel) gefördert.

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Phosphatidylinositole und Inositolphosphate als essentielle Zellbestandteile und intrazelluläre messenger.....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Überblick: Inositolphosphatmetabolismus .....	1
1.1.2	Der PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> / Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> / DAG Pathway .....	3
1.1.3	Der PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> / PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub> Pathway .....	6
1.1.4	Zelluläre Funktionen höherphosphorylierter Inositolphosphate .....	7
<b>1.2</b>	<b>Inositol 1,4,5-trisphosphat-Rezeptoren: zentrale Regulatoren der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration mit hoher Signaldiversität .....</b>	<b>13</b>
<b>1.3</b>	<b>Inositolphosphatkinasen der PDKG-Kinase-Familie: zentrale Enzyme des Inositolphosphatstoffwechsels .....</b>	<b>16</b>
1.3.1	Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen: zentrale Schaltstellen des Inositolphosphatstoffwechsels .....	16
1.3.1.1	Die Rolle der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen im Inositolphosphatstoffwechsel .....	16
1.3.1.2	Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen in höheren Eukaryoten .....	17
1.3.2	Inositolpolyphosphatmultikinasen: Inositolphosphatkinasen und Transkriptionsregulatoren ? .....	25
1.3.2.1	Die Rolle der Inositolpolyphosphatmultikinasen im Inositolphosphatstoffwechsel .....	25
1.3.2.2	Inositolpolyphosphatmultikinasen in Hefe und höheren Eukaryoten .....	26
1.3.3	Inositolhexakisphosphatkinasen: Biosynthese hochphosphorylierter Inositolphosphate .....	27
1.3.3.1	Die Rolle der Inositolhexakisphosphatkinasen im Inositolphosphatstoffwechsel .....	27
1.3.3.2	Inositolhexakisphosphatkinasen in Hefe und höheren Eukaryoten .....	27
<b>1.4</b>	<b>Zielsetzung der vorliegenden Arbeit .....</b>	<b>29</b>
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden .....</b>	<b>30</b>
<b>2.1</b>	<b>Materialien .....</b>	<b>30</b>
2.1.1	Inositolphosphate .....	30
2.1.2	Chemikalien .....	30
2.1.3	Deuterierte Verbindungen für die NMR-Spektroskopie.....	32
2.1.4	Verwendete Kits.....	32
2.1.5	Enzyme.....	32
2.1.6	Plasmide.....	34
2.1.7	Antikörper .....	36
2.1.8	Oligonukleotide .....	36
2.1.9	Bakterienstämme und Medien .....	41
2.1.10	Größenstandards für Proteine und doppelsträngige DNA.....	41
2.1.11	Säulenmatrizes .....	41
2.1.12	Verbrauchsmaterialien.....	42
2.1.13	Apparative Ausrüstung .....	42

<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>44</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Mikrobiologische Methoden .....</b>	<b>44</b>
2.2.1.1	Sterilisation von Lösungen und Geräten .....	44
2.2.1.2	Aufrechterhaltung und Kultivierung von <i>E.coli</i> - Stämmen.....	44
2.2.1.3	Herstellung transformationskompetenter <i>E.coli</i> .....	46
2.2.1.4	Transformation von <i>E.coli</i> .....	47
<b>2.2.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>48</b>
2.2.2.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> .....	48
2.2.2.2	Fällung von DNA.....	48
2.2.2.3	Konzentrationsbestimmung von DNA .....	49
2.2.2.4	DNA-Sequenzierung .....	49
2.2.2.5	Hydrolytische DNA - Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen .....	50
2.2.2.6	Auftrennung von DNA in Agarosegelen.....	50
2.2.2.7	Extraktion von DNA aus Agarosegelen .....	51
2.2.2.8	PCR-Techniken .....	51
2.2.2.8.1	PCR mit Plasmid-DNA als Template .....	52
2.2.2.8.2	PCR zum Screening von <i>E.coli</i> - Klonen .....	53
2.2.2.8.3	PCR-Mutagenese .....	54
2.2.2.8.3.1	Megaprimer-PCR-Mutagenese nach [Picard et al., 1994].....	54
2.2.2.8.3.2	QuikChange-PCR-Mutagenese.....	58
2.2.2.9	Direkte Aufreinigung von PCR-Produkten aus dem Reaktionsansatz.....	60
2.2.2.10	A-Tailing von PCR-Produkten zur Klonierung in pGEM-T Easy.....	60
2.2.2.11	Ligation von DNA mit T4-DNA-Ligase.....	60
<b>2.2.3</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>61</b>
<b>2.2.3.1</b>	<b>Einfache Analysemethoden für Proteinlösungen.....</b>	<b>61</b>
2.2.3.1.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen .....	61
2.2.3.1.2	Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen.....	62
2.2.3.1.3	Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Brilliant-Blue .....	63
2.2.3.1.4	Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen .....	64
2.2.3.1.5	Dokumentation und Lagerung von Coomassie- und Silber-gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen.....	64
2.2.3.1.6	Immunoblotting (Western Blotting und Immunprinting) von SDS-Polyacrylamidgelen.....	65
<b>2.2.3.2</b>	<b>Expression und Reinigung rekombinanter Proteine .....</b>	<b>67</b>
2.2.3.2.1	Rekombinante Expression in <i>E.coli</i> .....	67
2.2.3.2.2	Lyse von <i>E.coli</i> - Bakterien; Separation der löslichen Fraktion .....	69
2.2.3.2.3	Chromatographische Aufreinigung rekombinanter IP3K.....	71
2.2.3.2.3.1	Ionenaustauschchromatographie .....	71
2.2.3.2.3.1.1	P11-Phosphocellulose.....	71
2.2.3.2.3.1.2	DEAE-Sephacel .....	72
2.2.3.2.3.2	Affinitätschromatographie .....	73
2.2.3.2.3.2.1	CaM-Sepharose.....	73
2.2.3.2.3.2.2	StrepTactin-Sepharose.....	74
2.2.3.2.4	Dialyse von Proteinlösungen .....	74

2.2.3.2.5	Aufkonzentration von Proteinlösungen.....	75
2.2.3.2.6	Lagerung von Proteinlösungen .....	75
<b>2.2.4</b>	<b>Analyse rekombinant exprimierter Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase .....</b>	<b>76</b>
<b>2.2.4.1</b>	<b>Enzymatisch-optischer Test für rekombinante IP3K.....</b>	<b>76</b>
2.2.4.1.1	Assaybedingungen, Erzeugung der Rohdaten.....	76
2.2.4.1.2	Bestimmung enzymatischer Parameter.....	79
2.2.4.1.2.1	Bestimmung der spezifischen Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> 3-Kinase-Aktivität.....	79
2.2.4.1.2.2	Bestimmung des apparenten K <sub>m</sub> -Wertes für ATP .....	79
2.2.4.1.2.3	Bestimmung des apparenten K <sub>m</sub> -Wertes für Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> , single-transient-Messungen .....	80
2.2.4.1.2.4	Bestimmung der Ca <sup>2+</sup> /CaM-Aktivierbarkeit von IP3K .....	81
2.2.4.1.3	Inositolphosphate als kompetitive Inhibitoren der Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> 3-Kinase-Reaktion.....	81
2.2.4.1.4	Inhibition der IP3K-Aktivität durch N-Ethylmaleimid .....	82
<b>2.2.4.2</b>	<b>Limitierte tryptische Proteolyse rekombinanter IP3K in An-/Abwesenheit von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> .....</b>	<b>83</b>
<b>2.2.4.3</b>	<b>In vitro PKC-Phosphorylierungsassays .....</b>	<b>83</b>
<b>2.2.4.4</b>	<b>Saturation Transfer Difference NMR Spektroskopie .....</b>	<b>85</b>
2.2.4.4.1	Das Prinzip der Saturation Transfer Difference NMR-Spektroskopie .....	85
2.2.4.4.2	Durchführung und Auswertung der Messungen.....	87
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>90</b>
<b>3.1</b>	<b>Vektoren zur prokaryotischen Expression von GgIP3K-A / HsIP3K-B cDNA;....</b>	<b>90</b>
	<b>gezielte Mutagenese der wt – Plasmide</b>	
<b>3.1.1</b>	<b>Die wt-Expressionsvektoren.....</b>	<b>90</b>
3.1.1.1	pET-17b-GIK .....	90
3.1.1.2	pET-17b-SiS6.....	92
3.1.1.3	pSK-A, pSK-B, pSK-C.....	94
<b>3.1.2</b>	<b>Herstellung gezielt mutierter IP3K-Expressionsvektoren .....</b>	<b>96</b>
3.1.2.1	Übersicht über die hergestellten mutierten IP3K-Expressionsvektoren .....	96
3.1.2.2	Exemplarische Beschreibung der angewendeten Mutagenesetechniken.....	100
3.1.2.2.1	PCR-Megaprimer-Mutagenese nach [Picard et al., 1994] .....	100
3.1.2.2.2	QuikChange-PCR-Mutagenese .....	106
<b>3.2</b>	<b>Prokaryotische Expression rekombinanter IP3K.....</b>	<b>109</b>
3.2.1	Expression von GgIP3K-A - wt und - Mutanten (pET-17b-GIK-basiert).....	109
3.2.2	Expression von GgIP3K-A - wt und - Mutanten (pSK-A-basiert) .....	113
3.2.3	Expression von HsIP3K-B - wt und - Mutanten (pET-17b-SiS6-basiert).....	117
<b>3.3</b>	<b>Chromatographische Aufreinigung rekombinanter IP3K.....</b>	<b>118</b>
3.3.1	Aufreinigung von GIK(156-452) - wt und - Mutanten.....	118
3.3.2	Aufreinigung von Strep-GIK(184-452) - wt und - Mutanten.....	121
3.3.3	Aufreinigung von HsIP3K-B(631-946) - wt und - Mutanten.....	125
<b>3.4</b>	<b>Limitierte tryptische Proteolyse von rekombinanter GgIP3K-A.....</b>	<b>126</b>
<b>3.5</b>	<b>Enzymkinetische Charakterisierung rekombinanter IP3K.....</b>	<b>128</b>

3.5.1	Enzymkinetische Charakterisierung von GIK(156-452) - wt und - Mutanten.....	128
3.5.1.1	Identifikation der Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> – Bindungsdomäne .....	128
3.5.1.2	Weitere Eigenschaften ausgewählter Mutanten.....	140
3.5.1.3	Übersicht: Enzymkinetische Charakterisierung von GIK(156-452) - wt und - Mutanten .....	147
3.5.2	Enzymkinetische Charakterisierung von Strep-GIK(184-452) - wt und - Mutanten zur weiteren Charakterisierung des Effekts ausgewählter Mutationen auf die Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> -Bindung .....	149
3.5.3	Enzymkinetische Charakterisierung von HsIP3K-B(631-946) - wt sowie der Mutante S764D zur Identifikation einer potentiellen PKC-Phosphorylierungsstelle .....	152
<b>3.6</b>	<b>In-vitro-Phosphorylierung rekombinanter HsIP3K-B .....</b>	<b>156</b>
<b>3.7</b>	<b>STD-NMR-Untersuchungen an GgIP3K - wt und - Mutanten .....</b>	<b>158</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>168</b>
4.1	Charakterisierung der Inositolphosphatbindungsdomäne der Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> 3-Kinase .....	168
4.2	Variationen der inositolphosphatbindenden core-Domäne der Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> 3-Kinase in anderen Kinasen der PDKG-Kinasefamilie: Implikationen zur Substratselektivität.....	178
4.3	Phosphatidylinositol 3-Kinasen und Proteinkinasen als Referenzstrukturen für Inositolphosphatkinasen der PDKG-Kinasefamilie.....	186
4.4	Saturation Transfer Difference NMR-Untersuchungen der Interaktion zwischen Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> und Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> 3-Kinase in Kombination mit enzymkinetischen Daten: Charakterisierung der durch gezielte Mutationen induzierten Veränderungen der Inositolphosphatbindung.....	197
4.5	Funktionelle Motive der PDKG-Kinase-Familie als Bestandteil der intrazellulären Bereiche des Ionenkanals TrpC1: Inositolphosphate als Calcium-influx-Regulatoren ? .....	214
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>222</b>
<b>6</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>228</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>246</b>
7.1	NMR-Pulsprogramme.....	246
7.2	Literaturdaten 1D- <sup>1</sup> H-NMR-Spektren von D-myo-Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> .....	249
7.3	Abkürzungsverzeichnis.....	250
7.4	Gefahrstoffe .....	254

# 1 Einleitung

## 1.1 Phosphatidylinositole und Inositolphosphate als essentielle Zellbestandteile und intrazelluläre messenger

Sowohl die membranständigen Phosphatidylinositole als auch die löslichen Inositolphosphate erfüllen wichtige Funktionen im zellulären Metabolismus. Trotz des prozentual geringen Anteils der Phosphatidylinositole an den die Plasmamembran konstituierenden Phospholipiden erfüllen diese Verbindungen essentielle Funktionen. Aktinbindende sowie in den vesikulären Transport involvierte Proteine interagieren mit Phosphatidylinositolen im inneren Blatt der Plasmamembran ([Itho et al., 2001], [Takenawa et al., 2001]), welche so zum einen die Bildung funktioneller zellulärer Strukturen ermöglichen, zum anderen aber selbst direkt oder durch ihre Metaboliten regulativ in die von diesen Strukturen abhängigen Prozesse eingreifen. Strukturelle Funktionen erfüllen die Phosphatidylinositole auch bei der Bildung von lipid rafts, welche ebenfalls in direkter Beziehung zu unter Beteiligung von Phosphatidylinositolen/ Inositolphosphaten ablaufenden intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen stehen [Caroni, 2001].

Ausgehend von dem Membranlipid Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphat ( $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ ) können, katalysiert von durch extrazelluläre Signale regulierbaren Enzymaktivitäten, sowohl membranständige als auch frei im Cytoplasma diffusible Botenstoffe generiert werden. Während der Abschnitt 1.1.1 dieses Kapitels einen Überblick über die Vielfalt der in eukaryotischen Zellen nachweisbaren Inositolphosphate sowie des zunehmend komplexer werdenden Netzwerks der möglichen zellulären Metabolisierungen dieser Verbindungen bietet, werden in den Abschnitten 1.1.2, 1.1.3 und 1.1.4 die Grundzüge der Phosphatidylinositol / Inositolphosphat-vermittelten Signaltransduktionsmechanismen dargelegt.

### 1.1.1 Überblick: Inositolphosphatmetabolismus

Der Stoffwechsel der Inositolphosphate ist mit dem Metabolismus der Phosphatidylinositole zum einen über die Phospholipase C – Aktivität verknüpft, welche die Hydrolyse des Phosphatidylinositols  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  zu Diacylglycerol und dem Inositolphosphat Inositol 1,4,5-trisphosphat ( $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ) katalysiert; zum anderen erfolgt die Biosynthese des Phosphatidylinositols ( $\text{PtdIns}$ ) durch die Reaktion des durch Dephosphorylierung aus  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  gebildeten Inositols mit CDP-Diacylglycerol. Abbildung 1.1 zeigt in vereinfachter Form die derzeit bekannten metabolischen Zusammenhänge zwischen den in eukaryotischen Zellen vorkommenden Inositolphosphaten. Die durch schwarze Pfeile gekennzeichneten Umsetzungen wurden sowohl in tierischen Zellen als auch bei Pflanzen und dem Schleimpilz *Dictyostelium* beobachtet.

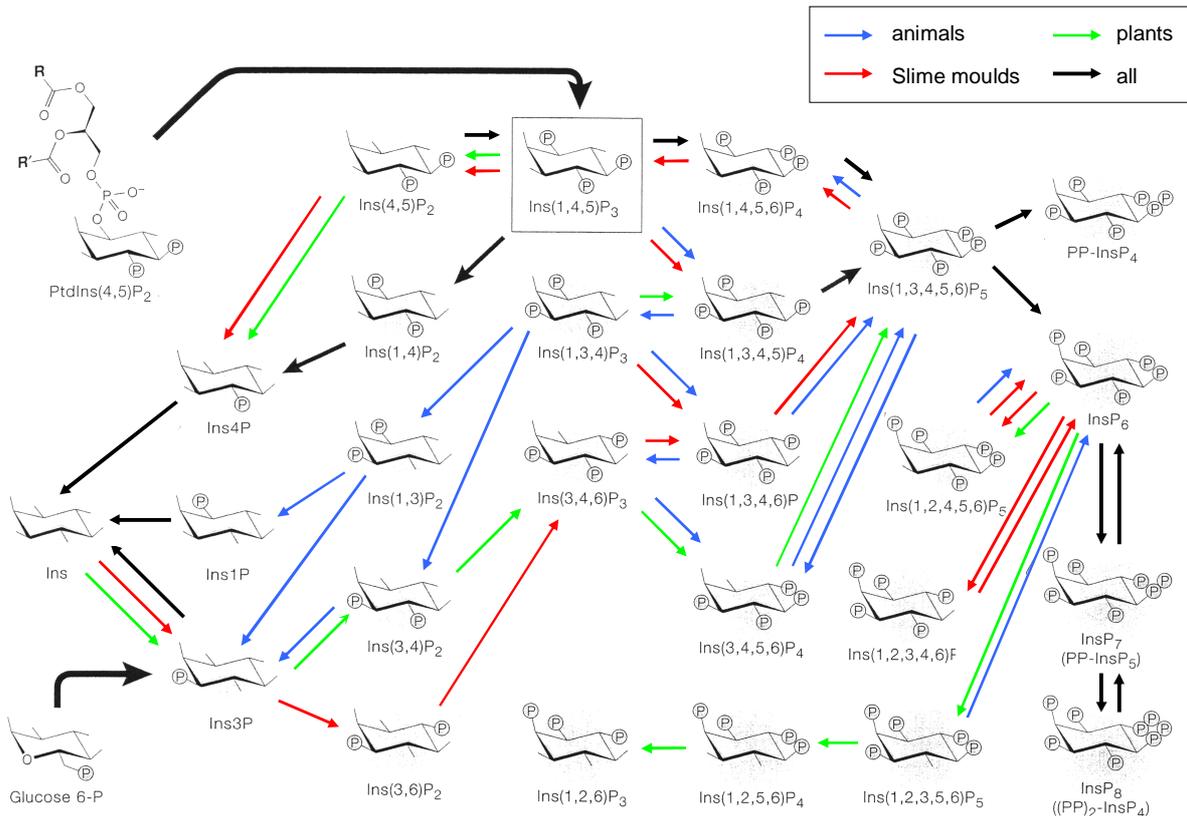


Abbildung 1.1: Schematische Zusammenfassung der derzeit bekannten metabolischen Zusammenhänge zwischen den in eukaryotischen Zellen vorkommenden Inositolphosphaten (verändert nach [Irvine et al., 2001]).

Bisher konnten bei weitem noch nicht alle Umsetzungen definierten Enzymaktivitäten zugeordnet werden. Neben den im Rahmen dieser Arbeit näher betrachteten Inositolphosphatkinasen der PDKG-Familie (Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen, Inositolpolyphosphatmultikinasen und Inositolhexakisphosphatkinasen, siehe Abschnitte 1.3.1, 1.3.2 und 1.3.3; sowie [Irvine et al., 2001]) konnte eine Inositol 1,3,4 – trisphosphat 5/6-Kinase kloniert werden [Wilson et al., 1996, 1997], welche neben ihrer Inositolphosphatkinaseaktivität auch Proteinkinaseaktivität besitzt [Wilson et al., 2001]. Gut charakterisiert sind bereits auch die Inositolpolyphosphat 5-Phosphatasen [Review: Erneux et al., 1998] sowie die Inositolpolyphosphat 1-Phosphatase [Inhorn et al., 1987a, 1987b, 1988], die Inositolpolyphosphat 4-Phosphatase [Bansal et al., 1987, 1990], die Inositolmonophosphat-Phosphatase [Ackermann et al., 1987] sowie die multiple Inositolpolyphosphat-Phosphatase MIPP ([Caffrey et al., 1999], [Chi et al., 2000]). Neuere Untersuchungen [Caffrey et al., 2001] zeigten darüberhinaus, dass die als Tumorsuppressorprotein wirkende Lipidphosphatase PTEN [Review: Yamada et al., 2001] Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> 3 – Phosphatase-Aktivität besitzt.

### 1.1.2 Der PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> / Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> / DAG Pathway

Die universelle Bedeutung von Phosphatidylinositolen/Inositolphosphaten als intrazelluläre messenger-Moleküle zeichnete sich bereits zu Beginn der 80er Jahre ab, als klar wurde, dass eine Stimulation des Phosphoinositidkatabolismus und ein koinzidenter Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration gemeinsame Merkmale der intrazellulären Reaktion einer großen Anzahl verschiedener Zelltypen auf eine Vielzahl extrazellulärer Faktoren darstellt [Review: Berridge und Irvine, 1984]. Weiterführende Arbeiten resultierten in der detaillierten Aufklärung der zugrundeliegenden Signaltransduktionsmechanismen [Review: Berridge 1993].

Allen Mechanismen gemein ist die durch Phospholipase C – Isoenzyme erfolgende hydrolytische Spaltung des Membranphospholipids Phosphatidylinositol 4,5 – bisphosphat (Ptd-Ins(4,5)P<sub>2</sub>) in das lipophile, in der Membran verbleibende *sn*-1,2-Diacylglycerol (DAG) und die hydrophile Kopfgruppe des PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, den diffusiblen, calcium-mobilisierenden Botenstoff Inositol – 1,4,5 – trisphosphat (Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>), siehe Abbildung 1.2. Die Aktivierung der Phospholipase C – Isoenzyme (Familien  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) erfolgt dabei in Abhängigkeit vom jeweiligen extrazellulären Stimulus durch Interaktionen mit den  $\alpha$  - bzw.  $\beta/\gamma$  - Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine (PLC $\beta$ ) oder durch Tyrosinphosphorylierung (PLC $\gamma$ ); der Aktivierungsmechanismus der ein kanonisches Ca<sup>2+</sup>-bindendes EF-Hand-Motif beinhaltenden PLC $\delta$  ist bisher noch unbekannt.

#### **Aktivierung des Pathways über G-Protein gekoppelte Rezeptoren**

Verschiedene Neurotransmitter (z.B. Adrenalin, Glutamat) und Hormone (z.B. Oxytocin, Vasopressin, Melatonin) interagieren mit dem extrazellulären Teil spezifischer G-Protein gekoppelter Rezeptoren (GPCRs), deren molekulare Architektur durch sieben durch intra- und extrazelluläre Loops verbundene Transmembranhelizes charakterisiert ist. Die Ligandenbindung induziert vermutlich eine Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch eine Wechselwirkung der intrazellulären Loops II (zwischen Helix 3 und 4) und III (zwischen Helix 5 und 6) mit (vom Rezeptortyp abhängigen) heterotrimeren G-Proteinen möglich wird. Durch die Bindung des zunächst im inaktiven, GDP-gebundenen Zustand vorliegenden heterotrimeren G-Proteins an den Rezeptor kommt es zur Aktivierung des G-Proteins, wobei zunächst das bis zu diesem Zeitpunkt an die  $\alpha$ -Untereinheit gebundene GDP durch GTP ausgetauscht wird, der Rezeptor wirkt somit im ligandengebundenen Zustand als Guaninnukleotid austauschfaktor (GEF) auf das GDP-gebundene G-Protein. Daraufhin dissoziiert zum einen der  $\beta/\gamma$ -Komplex von der  $\alpha$ -Untereinheit ab, zum anderen geht die Assoziation des G-Proteins mit dem ligandengebundenen Rezeptor verloren, welcher somit zur Aktivierung weiterer, im GDP-gebundenen Zustand vorliegender heterotrimerer G-Proteine zur Verfügung steht. Die

über Lipidanker (Myristoylierung im Fall der  $\alpha$ -Untereinheit, Geranylierung der  $\gamma$ -Untereinheit im Fall des  $\beta/\gamma$ -Komplexes) konstitutiv an der Plasmamembran lokalisierten Untereinheiten des heterotrimeren G-Proteins können somit zweidimensional in der Membran diffundieren. Sowohl die  $\alpha$ -Untereinheit im Komplex mit GTP als auch der  $\beta/\gamma$ -Komplex können nun Phospholipase C – Isoenzyme ( $\alpha$ -Untereinheit: PLC $\beta_1$ ,  $\beta/\gamma$ -Komplex: PLC $\beta_2$ ) aktivieren, was wie oben beschrieben zur hydrolytischen Spaltung des Membranphospholipids PtdIns(4,5)P $_2$  in DAG und Ins(1,4,5)P $_3$  führt. Während das lipophile DAG in der Membran verbleibt und dort, zum Teil im Zusammenspiel mit Ca $^{2+}$ -Ionen und Membranlipiden wie Phosphatidylserin, zur Aktivierung von Serin/Threonin-spezifischen Proteinkinasen C führt, ist das hydrophile Ins(1,4,5)P $_3$  frei im Cytoplasma diffusibel. Durch Bindung von Ins(1,4,5)P $_3$  an ligandengesteuerte Ca $^{2+}$ -Kanäle (Ins(1,4,5)P $_3$ -Rezeptoren) in der Membran intrazellulärer, vom endoplasmatischen Retikulum abgeleiteter Ca $^{2+}$ -Speicherkompartimente kommt es unter Beteiligung verschiedener weiterer Steuersignale (u.a. ATP, Ca $^{2+}$ /Calmodulin, Aktivität von Proteinkinasen) zur Öffnung der Ionenkanäle; Ca $^{2+}$ -Ionen werden aus den intrazellulären Speichern ins Cytosol freigesetzt, was zu einem lokalen Anstieg der im Ruhezustand im submikromolaren Bereich liegenden intrazellulären Ca $^{2+}$ -Konzentration auf Konzentrationen um 1  $\mu$ M führt. Die physiologische Antwort der Zelle erfolgt u.a. in Abhängigkeit von Amplitude und Frequenz des entstehenden intrazellulären Calciumsignals, welches nicht nur durch die Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speicherorganellen, sondern auch durch den Calcium-Einstrom aus dem Extrazellulärraum sowie durch die Ca $^{2+}$ -abhängige Regulation verschiedenster Enzymaktivitäten (z.B. durch die Wechselwirkung mit Ca $^{2+}$ /Calmodulin) determiniert wird.

Die Regulation der Signalübertragung wird auf Ebene der G-Proteine durch die intrinsische GTPase-Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit bestimmt: Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP führt zur Inaktivierung der  $\alpha$ -Untereinheit, durch Bindung an freie  $\beta/\gamma$ -Komplexe entstehen wieder aktivierbare heterotrimere G-Proteine. Im Falle der PLC $\beta_1$  und des zugehörigen Regulatorproteins G $_{q-11}$  konnte gezeigt werden [Bernstein et al., 1992], dass das Effektormolekül (PLC $\beta_1$ ) als GTPase-aktivierendes Protein (GAP) auf G $_{q-11}$  wirkt: Interaktion von PLC $\beta_1$  mit G $_{q-11}$  resultiert in einer Stimulation der intrinsischen GTPase-Aktivität des G $_{q-11}$  um nahezu zwei Größenordnungen. Desweiteren wird das Ins(1,4,5)P $_3$ -Signal selbst durch Metabolisierung des Botenstoffes gelöscht.

### ***Aktivierung des Pathways über Rezeptoren mit intrinsischer oder assoziierter Tyrosinkinaseaktivität***

Stimulation von Zellen mit Wachstumsfaktoren wie EGF und PDGF resultiert ebenfalls in einer Aktivierung des PtdIns(4,5)P $_2$ /Ins(1,4,5)P $_3$ /DAG – pathways, allerdings erfolgt die Aktivie-

Die hier beteiligten  $\text{PLC}\gamma$  nicht über eine Interaktion mit einer der Untereinheiten eines rezeptor-aktivierten heterotrimeren G-Proteins, sondern durch direkte Wechselwirkung und Tyrosinphosphorylierung durch einen Transmembranrezeptor mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität.

Durch die Bindung des Wachstumsfaktors kommt es zu einer Dimerisierung zweier identischer Rezeptoruntereinheiten, eine Untereinheit wird dabei jeweils von einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer einzelnen, darauf folgenden Transmembranhelix und einer intrazellulären Proteinkinasedomäne gebildet. Die Homodimerisierung führt zunächst zu einer gegenseitigen Tyrosinphosphorylierung der Rezeptoruntereinheiten; an die auf diese Weise entstehenden Phosphotyrosinreste können nun SH2-Domänen beinhaltende Adaptor- sowie Effektormoleküle (u.a.  $\text{PLC}\gamma$ ) andocken. Direkte Phosphorylierung der  $\text{PLC}\gamma$  sowie allosterische Effekte führen sodann zu einer Aktivierung des Enzyms; die Signaltransduktionskaskade kann wie bereits oben beschrieben ablaufen. Eine negative Regulation ist auf der Ebene des Rezeptors sowie der Phospholipase durch spezifische Protein-Tyrosinphosphatase möglich.

Ein ähnlicher Weg der Signalweiterleitung wird auch von anderen Rezeptoren wie z.B. dem T-Zell-Antigenrezeptor (TCR)-CD3 Rezeptorkomplex initiiert; diese Rezeptoren besitzen zwar keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität, rekrutieren aber Mitglieder der src-Tyrosinkinasefamilie wie fyn und lck, welche sodann  $\text{PLC}\gamma$  durch Tyrosinphosphorylierung aktivieren.

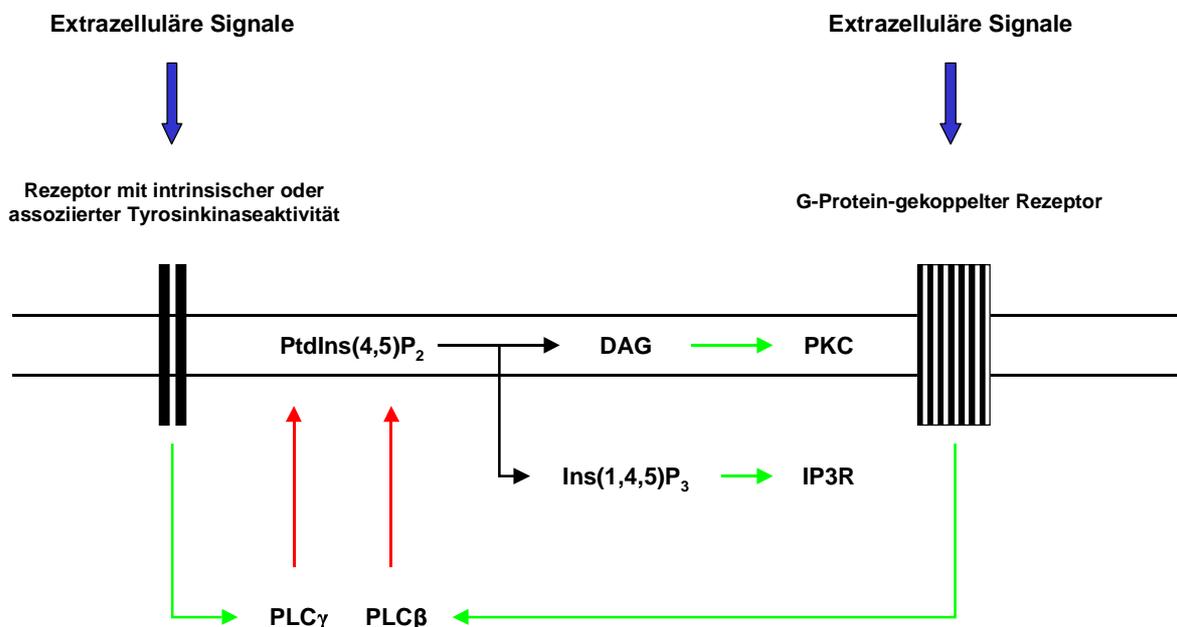


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der intrazellulären Bildung der Botenstoffe Diacylglycerol (DAG) und  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  durch hydrolytische Spaltung des Membranphospholipids  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ . Die Aktivierung der diese Umsetzung katalysierenden PLC-Isoenzyme erfolgt entweder über an heterotrimeren G-Proteine gekoppelte Rezeptoren oder über Transmembranrezeptoren mit intrinsischer oder assoziierter Tyrosinkinaseaktivität.

### **Die Löschung des $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Signals: Dephosphorylierung zur Regeneration von $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ oder Phosphorylierung zu $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$**

Der calciummobilisierende Botenstoff  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  kann in der Zelle entweder durch subsequente Dephosphorylierung durch Inositol-polyphosphat-5-phosphatasen, Inositol-polyphosphat-1-phosphatasen und Inositol-4-monophosphatasen zu Inositol dephosphoryliert werden oder aber auch durch Enzyme mit Inositol 1,4,5-trisphosphat-Kinaseaktivität zu höherphosphorylierten Inositolphosphaten umgesetzt werden. Während das durch die Phosphataseaktivitäten aus  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  gebildete Inositol als Metabolit in die Phosphoinositid-Resynthese einfließt, beeinflussen das durch hochspezifische und –selektive  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinasen (bei *mammalia*: Isoformen A, B, C, siehe Abschnitt 1.3.1.2) gebildete  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  sowie weitere durch eine multifunktionelle Inositolpolyphosphatmultikinase synthetisierte hochphosphorylierte Inositolphosphate und deren Metaboliten nachhaltig den zellulären Stoffwechsel. Einen kurzen Überblick über die häufig noch nicht im Detail aufgeklärten Funktionen dieser Verbindungen gibt der Abschnitt 1.1.4.

#### **1.1.3 Der $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ / $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ Pathway**

Das Membranphospholipid  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  ist nicht nur Substrat für durch extrazelluläre Stimuli regulierbare Phospholipasen C, sondern kann auch durch Phosphatidylinositol 3-Kinasen [Review: Wymann et al., 1998] der Klasse I (PI3K I) zum Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphat ( $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ ;  $\text{PIP}_3$ ) metabolisiert werden. Diese Verbindung ist in ruhenden Zellen praktisch nicht nachweisbar, in Reaktion auf extrazelluläre Stimuli, insbesondere auf mitogene Signale, ist jedoch ein rascher Anstieg der  $\text{PIP}_3$ -Konzentration zu verzeichnen.

Alle bisher identifizierten PI3K I - Isoformen sind Heterodimere, die durch Assoziation einer katalytischen Untereinheit (Molekulargewichte zwischen 110 und 120 kDa) und eines regulativ wirkenden Adaptorproteins (Molekulargewichte zwischen 50 und 100 kDa) gebildet werden. Als Prototyp einer solchen regulativen Untereinheit gilt das p85, welches mit einer SH3-Domäne, einer breakpoint-cluster-region Homologie (BH-Domäne), zwei prolin-reichen Regionen und zwei SH2-Domänen über eine große Anzahl für Protein-Protein-Interaktionen nutzbarer Domänen verfügt. Die Aktivierung der PI3K der Klasse I erfolgt entweder über Rezeptoren mit intrinsischer oder assoziierter Tyrosinkinaseaktivität (Kinasen der Klasse IA) oder über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Kinasen der Klasse IB). Im Fall der Kinasen der Klasse IB erfolgen Aktivierung und Membrantargeting der Kinase dabei über eine Interaktion mit den  $\beta/\gamma$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine, Kinasen der Klasse IA werden unter Ausnutzung der vielfältigen Interaktionsmöglichkeiten der regulatorischen Untereinheit (Bindung an Phosphotyrosinreste von Rezeptorproteinkinasen bzw. deren Substraten über die SH2-Domänen, Interaktion der prolinreichen Regionen mit SH3 Domänen rezeptorassozii-

ter Kinasen, Interaktion der SH3 Domäne mit prolinreichen Regionen rezeptorassoziierter Proteine) an die Membran rekrutiert und aktiviert. Aktivität und Lokalisation sowohl der Kinasen der Klasse IA als auch der Klasse IB werden darüber hinaus durch die Interaktion der katalytischen Untereinheit mit Ras/GTP reguliert. Neben ihrer Lipidkinaseaktivität besitzen alle katalytischen Untereinheiten der PI3-Kinasen vom Typ I (A als auch B) Protein (Serin-)kinaseaktivität; beschrieben wurde sowohl Autophosphorylierung (p110 $\delta$ ) als auch Phosphorylierung regulativer Untereinheiten (p110 $\alpha$ ).

Der Großteil der bis heute beschriebenen PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> abhängigen Regulationsmechanismen wird durch die spezifische Bindung des Phospholipids durch spezielle Adaptordomänen vermittelt; hierdurch wird zum einen eine Membranrekrutierung der über die entsprechenden Domänen verfügenden Proteine herbeigeführt, zum anderen können durch die Bindung auch enzymatische Aktivitäten beeinflussende allosterische Effekte vermittelt werden. Die am besten charakterisierten PIP-bindenden Domänen sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt vermutlich die sogenannten Pleckstrin-Homology-Domänen (PH-Domänen) (Review: [Rebecchi et al., 1998]; [Lemmon et al., 2000]). Diese auf Primärstrukturebene nur geringe Sequenzidentitäten (20 % – 30 %) aufweisenden Proteinmodule umfassen ca. 120 Aminosäurereste und zeichnen sich durch eine den Strukturen der C2-Domänen ähnelnde, stark konservierte Tertiärstruktur mit variablen, in die Ligandenbindung involvierten Loop-Bereichen aus [Bottomley et al., 1999], sowie durch die Fähigkeit, hochaffin und selektiv Inositolphosphate / Phosphatidylinositole zu binden [Lietzke et al., 2000; Kavran et al., 1998]. Für eine große Anzahl verschiedener Proteine konnte bisher eine PH-Domänen mediierte Regulation durch PIP<sub>3</sub> gezeigt werden, darunter befinden sich Serin/Threonin-Proteinkinasen (PDK1, PKB), Guaninukleotidaustauschfaktoren (ARNO) und GTPase-aktivierende Proteine (GAP1<sup>IP4BP</sup>, GAP1<sup>m</sup>).

### 1.1.4 Zelluläre Funktionen höherphosphorylierter Inositolphosphate

Die Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen eröffnen gemeinsam mit den Inositolpolyphosphatmultikinasen durch die Metabolisierung von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> zu Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> bzw. Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub> den bis heute einzigen, in *mammalia* bekannten Syntheseweg zu den höher phosphorylierten Inositolphosphaten InsP<sub>4</sub>, InsP<sub>5</sub>, InsP<sub>6</sub> sowie zu den energiereiche Phosphorsäureanhydridbindungen enthaltenden Diphosphoinositolphosphaten PP-InsP<sub>4</sub>, PP-InsP<sub>5</sub> sowie Bis-PP-InsP<sub>4</sub>. In diesem Kapitel werden nun die zellulären Funktionen dieser Verbindungen (Review: [Irvine R.F. et al., 2001]), deren Vielfalt die Bedeutung der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen im zellulären Stoffwechsel unterstreicht, kurz besprochen. Bis auf wenige Ausnahmen werden diese Effekte durch eine direkte Interaktion der betreffenden Inositolphosphate mit entsprechenden inositolphosphat-bindenden Proteindomänen vermittelt. Zu beachten ist

dabei, dass *in vitro* – Studien inositolphosphat/phosphatidylinositol – bindender Proteine häufig keine definitive Aussage über das tatsächlich *in vivo* mit dem Protein interagierende Inositolphosphat/Phosphatidylinositol zulassen, da in der physiologischen Situation nicht nur die Dissoziationskonstanten der entsprechenden Protein/Inositolphosphat/Phosphatidylinositol – Komplexe, sondern auch Parameter wie die (freie) zelluläre Konzentration der in Frage kommenden Liganden und die subzelluläre Lokalisation sowohl der potentiellen Liganden als auch der Bindungsproteine eine essentielle Rolle spielen.

### ***Interaktion von Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> mit GTPase aktivierenden Proteinen : crosstalk mit dem ras-pathway***

Die komplexe Einbindung der Phosphatidylinositol/Inositolphosphat – Signaling-Pathways in die Regulation zellulärer Prozesse sowie die Bedeutung des Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase-Produkts Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> wird besonders deutlich bei der Betrachtung der Familie der GAP1 Proteine (Review: [Cullen et al., 1998], [Irvine et al., 1999]). Mitglieder dieser Familie mit vorwiegend neuronaler Expression und Molekulargewichten um 100 kDa wurden aus verschiedenen Spezies und Geweben isoliert/kloniert (Drosophila: GAP1 [Powe et al., 1999], Schweinthrombozyten: GAP1<sup>IP4BP</sup> [Cullen et al., 1995a, b], humanes peripheres Blut [Lockyer et al., 1997], Mäusehirn: GAPIII [Baba et al., 1995], Rinderhirn: R-Ras GAP [Yamamoto et al., 1995], humanes Gehirn, peripheres Blut, A431-Zellen: GAP1<sup>m</sup> [Li et al., 1996]). Sie umfassen eine hochkonservierte Ras GAP Domäne, welche zum N-Terminus hin von einer C2A/C2B – Domänenstruktur, zum C-Terminus hin von einer ein Btk-Motiv beinhaltenden PH-Domäne flankiert wird. Letztere vermittelt eine hochaffine ( $K_d(\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4) = 6 \text{ nM}$  bei GAP1<sup>IP4BP</sup>) Bindung von Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>, welche darüberhinaus extrem spezifisch für das Isomer Ins(1,3,4,5)P<sub>3</sub> zu sein scheint, da alle anderen getesteten Inositolphosphatisomere und auch die wasserlöslichen PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> – Analoga GroPIns(3,4,5)P<sub>3</sub> und Diacetyl-GroP Ins(3,4,5)P<sub>3</sub> lediglich mit um mindestens eine Größenordnung höheren  $K_d$  – Werten gebunden wurden (vgl. auch die Modeling- und Docking-Studien in [Cozier et al., 2000a]).

In funktionellen Assays zeigte GAP1<sup>IP4BP</sup> eine stimulierende Wirkung auf die intrinsische GTPase-Aktivität kleiner G-Proteine der ras-Familie (H-ras, N-ras, K-ras und R-ras) sowie von Rap1a; GAP-Aktivität gegenüber kleinen G-Proteinen der Rab, Rac oder Rho-Familie wurde jedoch nicht detektiert [Cullen et al., 1995c, Bottomley. et al., 1998]. Während die GTPase aktivierende Funktion des GAP1<sup>IP4BP</sup> durch die Anwesenheit von Liposomen, deren Zusammensetzung dem inneren Blatt der Plasmamembran nachempfunden war, inhibiert wurde, konnte durch Zugabe von Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>, nicht aber PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> zu diesem System die ras-GAP-Aktivität des GAP1<sup>IP4BP</sup> wiederhergestellt werden [Cullen et al., 1995c]. Dieser *in vitro* entdeckte Mechanismus könnte auch bei der Regulation der ras-GAP-Aktivität der Proteine der GAP1-Familie *in vivo* eine Rolle spielen, da neuere Arbeiten von [Cozier et

al., 2000b] zeigen, dass die PH-Domäne des GAP1<sup>IP4BP</sup> in der Tat, obwohl bisher strukturell als PH Domäne der Klasse I (Bindung von PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> bzw. Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>) eingeordnet, zwar in der Tat mit PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> interagiert, aber mit vergleichbarer Affinität auch an das Membranphospholipid PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> bindet, was eine konstitutive Plasmamembranassoziation des Proteins auch in unstimulierten Zellen bedingt. In vivo Depletion von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, nicht aber von PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, führte zu einer Dissoziation des GAP1<sup>IP4BP</sup> von der Membran. Eine Steigerung der ras-GAP-Aktivität des GAP1<sup>IP4BP</sup> nach Zellstimulation könnte demnach, gemäß dem *in vitro* Modell von [Cullen et al., 1995c], über einen Austausch des in unstimulierten Zellen als Bindungspartner der PH-Domäne agierende (inhibierend wirkende) PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> gegen das (zumindest unter *in vitro* Bedingungen) affiner bindende, in stimulierten Zellen durch die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> – 3-Kinasen aus Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> synthetisierten Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> erfolgen. Dieses Inositolphosphatisomer ist somit als negativ wirkender Signalmediator zwischen initial Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> vermittelten Signalwegen und den ras-Pathways anzusehen, was es unmittelbar in die Regulation zellproliferativer Prozesse einbindet. Desweiteren scheint die Regulation von GAP1<sup>IP4BP</sup> durch Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> auch ein wichtiger Aspekt für die Klärung der bisher äußerst kontrovers diskutierten Frage (vgl. z.B. [Da Silva et al., 1994]; [Shirakawa et al., 1995]; [Taketo et al., 1997]; [Smith et al., 2000]), nach einer Beteiligung des Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> an der Regulation des Calciumeinstroms aus dem Extrazellulärraum zu sein ([O'Rourke et al., 1996]; [Cullen et al., 1997]; [Loomis-Husselbee et al., 1998]; [Lu et al., 1999]; [Higashida et al., 1999]).

### ***Inositolphosphate als (Co-)Regulatoren der Aktivität von Ionenkanälen: Einfluss auf intrazelluläre Calcium-Signale und Osmoregulation***

Die durch extrazelluläre Signale gesteuerte Freisetzung von Calcium aus ER - abgeleitenden Speichervesikeln wird unter anderem durch die hochaffine Bindung des second messengers Inositol 1,4,5-trisphosphat an einen speziellen, ligandengesteuerten Calciumkanal (IP3R) in der Membran dieser Kompartimente mediiert. Neuere Arbeiten zeigen, dass auch andere höherphosphorylierte Inositolphosphate in der Lage sind, regulierend auf Amplitude und Frequenz intrazellulärer Calciumsignale einzuwirken.

[Hermosura et al., 2000] demonstrierten an der Mastzelllinie RBL-2H3 die physiologische Bedeutung der schon seit längerem bekannten kompetitiven Inhibition der 5-Phosphatase durch Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphat: Das auf einen PLC-aktivierenden extrazellulären Stimulus intrazellulär gebildete Inositol 1,4,5-trisphosphat wird durch die 3-Kinaseaktivitäten zu Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphat phosphoryliert. Dieses Isomer bindet mit einer 10fach höheren Affinität als Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> an die 5-Phosphatase, wird jedoch 100mal langsamer von diesem Enzym umgesetzt. Kommt es nun (innerhalb eines bestimmten Zeitfensters) zu einem erneuten Anstieg der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> – Konzentration, unterliegt das neu gebildete Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> infolge der

anhaltenden Inhibition der 5-Phosphatase durch das zuvor gebildete  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  einer geringeren Abbaurate. Auf diese Weise können im Sinne einer Koinzidenzdetektion auch Signale geringerer Stärke zelluläre Antworten wie Freisetzung von Calcium aus dem ER und CRAC (calcium release activated current) auslösen. Der Informationsgehalt intrazellulärer Calciumsignale liegt jedoch nicht nur in ihrer Amplitude; häufig bestimmt auch die Frequenz räumlicher und zeitlicher Oszillationen der intrazellulären Calciumkonzentration die zelluläre Antwort [Berridge, 1997]. Untersuchungen von [Zhu et al., 2000] zeigen, dass die Aktivität der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen und im Zusammenhang damit stehend die intrazelluläre Konzentration von  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  durch einen nicht näher spezifizierten Mechanismus die Frequenz Histamin-induzierter Calciumoszillationen in HeLa-Zellen reguliert. Auch dem hochphosphorylierten  $\text{InsP}_6$  wurde eine Rolle bei der Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration zugeschrieben [Larsson et al., 1997]. Bei dem in der zitierten Arbeit postulierten Mechanismus führt die konzentrationsabhängige Inhibition von Serin/ Threoninphosphatasen durch  $\text{InsP}_6$  zu einer erhöhten Aktivität spannungsgesteuerter L-Typ-Calciumkanäle. Verschiedene Autoren berichten über einen direkt durch  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  [Lückhoff et al., 1992; Fadool et al., 1994; Guse et al., 1992] vermittelten Calciumeinstrom über die Plasmamembran; eine molekulare Identifizierung des diesen Strom mediiierenden Kanals gelang jedoch bis heute nicht.

Für das Inositoltetraakisphosphatisomer  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$  wurde eine Funktion bei der Regulation  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierter Chloridkanäle demonstriert ([Xie et al., 1996, 1998]; [Ismailov et al., 1996], [Nilius et al., 1998]; [Ho et al., 2001]). Das nach einem PLC-aktivierenden Stimulus intrazellulär aus  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  gebildete  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$  hemmt indirekt, vermutlich über die Interaktion mit Proteinphosphatasen, diese Kanäle und trägt so zur Regulation der zellulären Elektrolytkonzentrationen bei.  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  inhibiert kompetitiv die  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$  1-Kinase [Tan et al., 1997] und beeinflusst so auf diese Weise ebenfalls die osmotischen Verhältnisse in der Zelle.

### ***Inositolphosphate/Phosphatidylinositole und die Regulation des Vesikeltransports***

Für eine Anzahl in den Vesikeltransport involvierter Proteinen wurde eine hochaffine Bindung hochphosphorylierter Inositolphosphate, insbesondere von  $\text{InsP}_6$ , beschrieben. Hierzu gehört neben den Clathrin-Assembly-Proteinen AP-2 ([Vogelmaier et al., 1992]; [Timerman et al., 1992]) und AP-3(AP180) ([Norris et al., 1995]; [Ye et al., 1995]) auch das Golgi Coatomer Protein (COP) ([Fleischer et al., 1994]; [Ali et al., 1995]) und die Familie der Synaptotagmine ([Mehrotra et al., 1997]; [Mochida et al., 1997]; [Mizutani et al., 1997]; [Ibata et al., 1998]; [Mikoshiba et al., 1999]). Die tatsächliche Bedeutung dieser *in vitro* untersuchten Interaktionen ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Eine Reihe von Veröffentlichungen weist auf eine

Rolle der membranständigen Produkte der Phosphatidylinositol 3-Kinasen als physiologische Liganden dieser Proteine hin (AP-2: [Beck et al., 1992]; [Gaidarov et al., 1996]; [Rapoport et al., 1997]; [Profit et al., 1998]; AP-3: [Hao et al., 1997]; COP: [Chaudhary et al., 1998]; Synaptotagmin: [Mehrotra et al., 2000]). Dieser Befund schließt jedoch eine z.B. über kompetitive Effekte vermittelte regulatorische Funktion der höherphosphorylierten Inositolphosphate im Bereich des Vesikeltransports und der Exozytose keinesfalls aus ([Llinas et al., 1994]; [Mizutani et al., 1997]). Ein weiterer Mechanismus zur Regulation vesikel-assoziiierter Proteine durch Inositolhexakisphosphat wurde 2001 von Hilton et al. untersucht. In dieser Arbeit konnte eine durch Inositolhexakisphosphat aktivierbare Proteinkinase charakterisiert werden; die durch diese Kinase katalysierte Phosphorylierung des mit synaptischen Vesikeln assoziierten Proteins Pacsin/Syndapin I führt zu einer verstärkten Interaktion des Pacsins mit dem Cytoskelettbestandteil Dynamin I.

### ***Inositolphosphate als (Co-)Regulatoren des nukleären mRNA-Exports***

Untersuchungen von Wente und Mitarbeitern [York et al., 1999] demonstrierten erstmalig die Bedeutung einer die Phospholipase C sowie die Inositolpolyphosphatmultikinase ArgR111 und die Inositol (1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> 2-Kinase ipk1 [Ives et al., 2000] umfassenden Signalkaskade für den mRNA – Export aus dem Kern von *S. cerevisiae*. Der Ausfall eines einzigen dieser drei Enzyme resultierte in einem drastischen Rückgang des nukleären mRNA-Exportes, was auf einen regulierenden Effekt des Endproduktes (InsP<sub>6</sub>) des durch die drei Aktivitäten konstituierten metabolischen Pathways hinweist. Eine Bestätigung dieser Ergebnisse für das Hefesystem bietet die Arbeit von [Saiardi et al., 2000a]. Neueste Resultate zeigen die Bedeutung hochphosphorylierter Inositolphosphate für einen effizienten nukleären mRNA-Export auch in Säugerzellen [Feng et al., 2001].

### ***Inositolphosphate und maligne Transformation: Zellzyklusabhängige Variationen der Inositolphosphatkonzentrationen, anticancerogenes Potential von InsP<sub>6</sub>***

Die zellulären Konzentrationen der hochphosphorylierten Inositolphosphate InsP<sub>5</sub> und InsP<sub>6</sub> variieren drastisch beim Durchlaufen des Zellzyklus in proliferierenden Thymozyten [Guse et al., 1993] und WRK-1 Epithellen [Barker et al., 1995]; in synchronisierten, PDGF-stimulierten NIH 3T3 Fibroblasten wurde ein Konzentrationsanstieg dieser Isomere bei Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus festgestellt [Balla et al., 1994]. Darüber hinaus beobachteten [French et al., 1991] charakteristische Veränderungen der zellulären InsP<sub>5</sub> und InsP<sub>6</sub> – Konzentrationen im Verlauf der Differenzierung von promyeloischen HL60-Zellen zu neutrophilen Granulozyten bzw. Monozyten. Diese Erkenntnisse legen eine Einbindung inositolphosphatvermit-

telter Signalmechanismen in zellproliferative Prozesse nahe; konkrete Mechanismen konnten jedoch bis heute nicht herausgearbeitet werden. Auch die molekularen Ursachen der anti-cancerogenen Wirkung von exogen zugeführtem Inositolhexakisphosphat [Review: Shamsuddin, 1999] sind noch weitgehend ungeklärt. Untersuchungen von [Hawkins et al., 1993] sowie [Phillippy et al., 1997] zeigen, dass über eine 1,2,3-Trisphosphat-Konfiguration verfügende Inositolpolyphosphate wie  $\text{InsP}_6$  effiziente Chelatoren für  $\text{Fe}^{3+}$  darstellen. Über diesen Mechanismus kann eine eisenkatalysierte Bildung von Hydroxylradikalen aus  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Fenton-Reaktion) verhindert werden. Die antineoplastische Wirkung des  $\text{InsP}_6$  könnte somit zum Teil auf einem durch die Chelatierung von Eisen hervorgerufenen Schutz vor oxidativer DNA-Schädigung beruhen.

Auch bei der Reparatur bereits bestehender DNA-Schäden spielt  $\text{InsP}_6$  eine Rolle: [Hanakahi et al., 2000] identifizierten das Inositolphosphat als einen den Reparaturprozess des nicht-homologen Endjoinings (NHEJ) von DNA-Doppelstrangbrüchen stimulierenden Faktor. Die Wirkung des  $\text{InsP}_6$  wird dabei nicht, wie von Hanakahi zunächst postuliert, über die direkte Bindung des Moleküls an die katalytische Untereinheit (DNA-PKcs) der Homologien zur PI3K aufweisenden DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) vermittelt. Vielmehr interagiert das Inositolphosphat mit dem Faktor Ku, welcher zusammen mit der katalytischen Untereinheit DNA-PKcs das DNA-PK-Holoenzym aufbaut [Ma et al., 2002].

Untersuchungen von [Luo et al., 2002] demonstrieren darüber hinaus eine Einbindung der ausgehend vom  $\text{InsP}_6$  durch Inositolhexakisphosphatkinasen gebildeten Inositolpyrophosphate  $\text{InsP}_7$  und  $\text{InsP}_8$  in die homologe DNA-Rekombination bei *S. cerevisiae*.

## 1.2 Inositol 1,4,5-trisphosphat-Rezeptoren: zentrale Regulatoren der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit hoher Signaldiversität

Die  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – abhängige Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration erfolgt, wie oben bereits angesprochen, durch die Bindung des second messengers an  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – spezifische, intrazellulär lokalisierte, ligandengesteuerte Ionenkanäle, welche als  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Rezeptoren bezeichnet werden. Die folgenden Abschnitte geben einen Überblick über den bisherigen Kenntnisstand zur Struktur, Funktion und Regulation der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Rezeptoren; besonders berücksichtigt wurden hierbei die Ligandenbindung betreffende Aspekte.

### ***Isoformen und splice-Varianten in mammalia***

In *mammalia* wurden bisher drei Isoformen des  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Rezeptors nachgewiesen ([Yoshida et al., 1997]; [Mikoshiba, 1997]) ( $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3\text{R1}$ ,  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3\text{R2}$ ,  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3\text{R3}$ ), die von drei verschiedenen Genen codiert werden [Yamada et al., 1994]. Während für die Rezeptortypen 2 und 3 jeweils nur eine Form reifen Transkriptes gefunden wurde, existieren für die Isoform 1 verschiedene gewebs- und entwicklungspezifisch differentiell exprimierte Splicevarianten, welche durch Kombinationen von An- oder Abwesenheit dreier Exons (SI, SII, SIII) charakterisiert sind [Yoshida et al., 1997]. Der Rezeptortyp 1 ist nahezu ubiquitär exprimiert; besonders hohe Protein- und mRNA- Level sind jedoch in den Purkinje-Zellen des Cerebellums zu detektieren ([Yoshida et al., 1997]; [Furuichi et al., 1993]). Bezüglich der Splicevarianten dieser Isoform wurde eine präferenzielle Expression der Splicevariante SII+ (Exon SII im reifen Transkript vorhanden) im Nervensystem gegenüber der Splicevariante SII- in peripherem Gewebe beschrieben. Demgegenüber ist die Gewebsverteilung der Rezeptoren vom Typ 2 und 3 eingeschränkter; die Expressionslevel liegen niedriger als für den Rezeptortyp 1. Im allgemeinen werden in einem Zelltyp mehrere Isoformen koexprimiert, was eine hohe zelltyp- und differenzierungsabhängige regulatorische Diversität der den funktionellen Calciumkanal bildenden homo- bzw. heterotetrameren Komplexe bedingt.

### ***Domänenstruktur von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Rezeptoren***

Die nachfolgende Abbildung 1.3 zeigt anhand eines topologischen Modells zweier Untereinheiten des tetrameren Rezeptorkomplexes die für alle drei  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Rezeptor-Isoformen gültige, dreigeteilte Domänenstruktur [Yoshida et al., 1997]. An eine N-terminal lokalisierte Ligandenbindungsdomäne, die ca. 24 % des gesamten Moleküls ausmacht, schließt sich ein sehr großer mittlerer Bereich des Rezeptors an (ca. 60 % des gesamten Moleküls). Dieser Bereich koppelt zum einen die Ligandenbindungsdomäne mit der weiter C-terminal gelegenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Domäne, zum anderen ist er aber auch Target für regulatorische Mechanismen unterschiedlicher Art wie z. B. die Wechselwirkung mit  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin und die Phos-

phorylierung durch Proteinkinase A. Während die drei IP<sub>3</sub>R-Subtypen eine 68 % -ige bzw. 59 %-ige Sequenzidentität im Bereich der Ligandenbindungsdomäne bzw. der Ca<sup>2+</sup>-Kanal-Domäne aufweisen, beträgt die Sequenzidentität im Bereich der Kopplungs- bzw. regulatorischen Domäne lediglich 53 %; ein Ausdruck der differentiellen Regulierbarkeit der verschiedenen Rezeptorsubtypen.

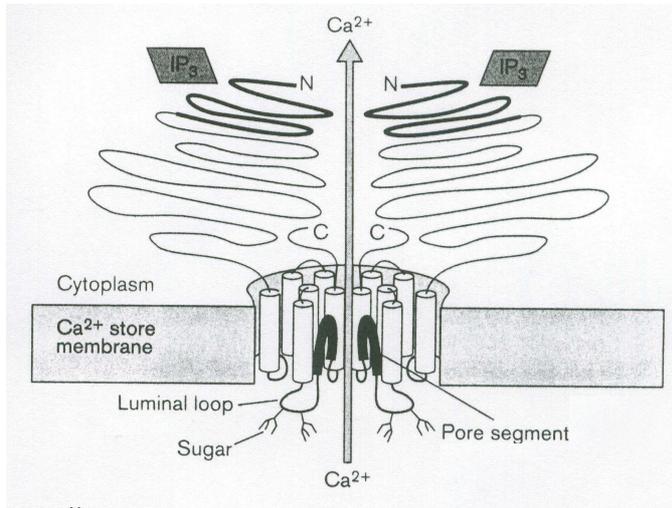


Abbildung 1.3 (verändert nach [Mikoshiba, 1997]) Domänenstruktur von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-Rezeptoren: Auf eine N-terminal lokalisierte Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-Bindungsregion folgt die Regulations-/Kopplungsdomäne sowie der den Ca<sup>2+</sup>-Kanal bildende, 6 putative Transmembrandomänen umfassende C-Terminus. Der funktionsfähige ligandengesteuerte Ionenkanal ist durch ein Homo- oder Heterotetramer gegeben, von dem in der Abbildung lediglich zwei Untereinheiten dargestellt wurden.

### **Die Ligandenbindungsdomäne des Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-Rezeptors: hochaffine und –selektive Erkennung von D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>**

Bereits in frühen Arbeiten an aus Cerebellum aufgereinigten Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-Rezeptoren konnte die Stöchiometrie der Bindung von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> an den Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-Rezeptor (ein Molekül Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> pro Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-Rezeptor Monomer) sowie die Größenordnung des K<sub>d</sub>-Wertes dieser Wechselwirkung (≤ 100 nM) und der die Kooperativität der Bindung beschreibende Hill-Koeffizient (1) ermittelt werden [Supattapone et al., 1988; Maeda et al., 1990]. Eine erste Eingrenzung der Ligandenbindungsdomäne auf die Aminosäuren 1-650 (Bezeichnung der Aminosäurepositionen hier und im Folgenden gemäß des MmIns(1,4,5)P<sub>3</sub>R1(SI+/SII+/SIII-)) des Rezeptormonomers gelang kurz darauf unter Verwendung von rekombinant in COS- [Mignery et al., 1990] bzw. NG108-15-Zellen [Miyawaki et al., 1991] exprimierten wt- sowie trunkierten Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>R-Konstrukten, weitere Untersuchungen an Glutathion-S-Transferase – IP<sub>3</sub>R-Fusionsproteinen zeigten, dass bereits der Bereich der Aminosäuren 1-576 für eine hochaffine Ligandenbindung ausreicht [Newton et al., 1994]. Diese Ergebnisse wurden unterstützt durch die Resultate, die durch Photoaffinitätslabeling des Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>R mit [<sup>3</sup>H] Benzoyldihydrocinnamyl (BZDC)-IP<sub>3</sub> erzielt wurden [Mourey et al., 1993]: nach tryptischem Verdau photoaffinitätsgelabelten Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-Rezeptors konnte ein aus den Aminosäuren 476-501 bestehendes, gelabeltes Peptid isoliert und identifiziert werden.

Aufbauend auf diesen Daten wurden in der Gruppe von K. Mikoshiba umfangreiche, von dem rekombinant in *E.coli* exprimierbaren Fragment T734 (Aminosäuren 1-734) ausgehende Deletions- und zielgerichtete Mutationsstudien durchgeführt [Yoshikawa et al., 1996]. Auf diese Weise konnte eine Einengung des für die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> Bindung essentiellen Bereiches auf die Aminosäuren 224 – 579 vorgenommen werden. Weitere Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe [Yoshikawa et al., 1999a,b] implizieren einen modularen Aufbau der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> – Bindungsdomäne des IP3R aus zwei interagierenden, unabhängig voneinander gefalteten Bereichen, die erst durch ihr Zusammenwirken hochaffine und –spezifische Ligandenbindung ermöglichen. Eine detailliertere Beschreibung dieser Experimente mit Bezug zu den Resultaten der vorliegenden Arbeit findet sich im Abschnitt 4 (Diskussion).

## 1.3 Inositolphosphatkinasen der PDKG-Kinase-Familie: zentrale Enzyme des Inositolphosphatstoffwechsels

Nahezu alle Phosphorylierungen löslicher Inositolphosphate werden durch Enzyme einer drei Unterklassen umfassenden Proteinfamilie katalysiert, die hier aufgrund eines allen der Familie zugerechneten Kinasen gemeinsamen Consensus-Motives **P-X-[VI]-[ML]-D-X-K-[MI]-G** als PDKG-Kinase-Familie bezeichnet wird. Da zwischen den Vertretern der drei Unterklassen (Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen, Inositolhexakisphosphatkinasen, Inositolpolyphosphatmultikinasen) weitere Homologien auf Ebene der Primärstruktur zu verzeichnen sind, können aus den Resultaten der vorliegenden Arbeit nicht nur Erkenntnisse über die Struktur und Funktion der untersuchten Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen gewonnen werden; vielmehr kann ein besseres Verständnis der in dieser Unterklasse verwirklichten Mechanismen bei der Entwicklung eines (experimentell zu verifizierenden) Modells für die in der gesamten Familie realisierten Strategien zur hochaffinen und im allgemeinen hochselektiven Bindung von Inositolphosphaten nützlich sein. Aus diesem Grund wird in diesem Kapitel nicht nur auf die Isoformen der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase, sondern auch auf die Vertreter der beiden anderen Unterklassen der PDKG-Kinase-Familie, d.h. die Inositolphosphathexakisphosphatkinasen und die Inositolpolyphosphatmultikinasen, eingegangen.

### 1.3.1 Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen: zentrale Schaltstellen des Inositolphosphatstoffwechsels

#### 1.3.1.1 Die Rolle der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen im Inositolphosphatstoffwechsel

Die in diesem Abschnitt vorgestellten Vertreter der Klasse der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen katalysieren hochspezifisch und –selektiv die Übertragung des  $\gamma$ -Phosphates von Adenosintriphosphat (ATP) auf die Hydroxylgruppe am Kohlenstoffatom 3 des D-myo-Inositol 1,4,5-trisphosphat, welches intrazellulär durch die PLC-katalysierte Hydrolyse des Membranphospholipids PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> gebildet wird. Sie zeigen die höchste spezifische Aktivität aller hier beschriebenen Inositolphosphatkinasen und eröffnen durch die Bildung des Inositoltetra-kisphosphatisomers D-myo-Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> gemeinsam mit den Inositolpolyphosphatmultikinasen den in *mammalia* vermutlich einzigen Syntheseweg zu den hochphosphorylierten Inositolphosphaten InsP<sub>5</sub> und InsP<sub>6</sub> sowie den energiereiche Phosphorsäureanhydridbindungen enthaltenden Diphosphoinositolphosphaten PP-InsP<sub>4</sub>, PP-InsP<sub>5</sub> und Bis-PP-InsP<sub>4</sub>.

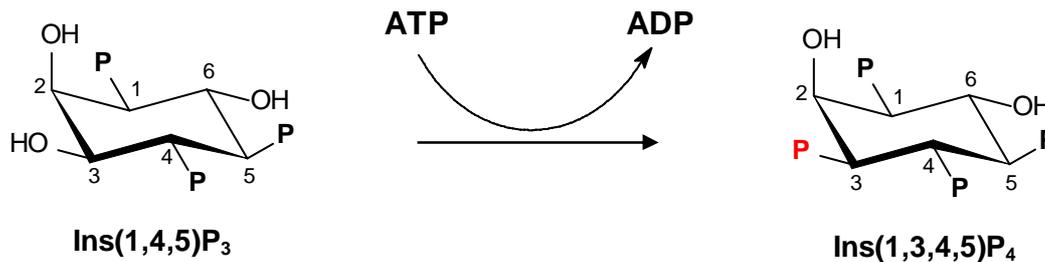


Abbildung 1.4: Von den Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen katalysierte Phosphorylierung des Botenstoffs D-myoinositol 1,4,5-trisphosphat ( $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ) zum D-myoinositol 1,3,4,5-tetrakisphosphat ( $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ ).

### 1.3.1.2 Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen in höheren Eukaryoten

Proteine mit spezifischer  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinase-Aktivität konnten aus einer großen Anzahl verschiedener Geweben bzw. Zelltypen aufgereinigt werden, so z.B. aus der glatten Muskulatur der Schweineaorta [Yamaguchi et al., 1987], aus der cytosolischen Fraktion des Rattenhirns ([Morris et al., 1988], [Johanson et al., 1988], [Takazawa et al., 1990a], [Lee et al., 1990]), aus Rinderhirn [Takazawa et al., 1989], aus der löslichen Fraktion der glatten Muskulatur des bovinen Irissphinkters [Wang et al., 1995], aus humanen Thrombozyten ([Communi et al., 1994], [Lin et al., 1993]), aus der Skelettmuskulatur des Schweins [Hogan et al., 1994], aus dem Ratten-Thymus [D`Santos et al., 1993], aus humanen Lymphozyten [D`Santos et al., 1993] sowie aus Hühnererythrozyten [Bertsch et al., 1999]. Die verschiedenen gereinigten Enzymaktivitäten korrelierten mit nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nachweisbaren Proteinbanden stark unterschiedlichen apparenten Molekulargewichts (z.B. 32 kD [Lee et al., 1990], 70 kD ([Communi et al., 1994], [D`Santos et al., 1993]), 93 kD [Yamaguchi et al., 1987], 98 kD – 114 kD [D`Santos et al., 1993], was als Hinweis auf die Existenz verschiedener Isoformen oder Spleißvarianten des Enzyms interpretiert werden konnte.

#### ***Klonierung der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase – Isoenzyme A, B und C: drei Isoformen mit hohen prozentualen Sequenzidentitäten im C-terminalen Bereich und stark divergenten N-Termini***

Die Klonierung von für Inositol 1,4,5-trisphosphat 3 – Kinasen codierenden cDNAs aus verschiedenen Geweben und Spezies bestätigte die oben geäußerte Vermutung der Existenz verschiedener Isoformen. Bis heute sind bei Vertebraten drei verschiedene Isoformen beschrieben, die entsprechend der Reihenfolge ihrer Entdeckung mit A, B und C benannt werden. Während im Bereich der C-terminalen 275 Aminosäuren hohe prozentuale Sequenzidentitäten (> 70 % auf Aminosäureebene) zu verzeichnen sind, divergieren die Sequenzen

im N-terminalen Bereich der verschiedenen Isoformen drastisch in Länge und Zusammensetzung.

Die ersten Klonierungen von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase cDNAs wurden 1990 von Choi et al. sowie von Takazawa et al. veröffentlicht; hierbei wurde in beiden Arbeiten unter Verwendung von gegen das native, aus dem Rattenhirn isolierbare Protein gerichteten monoklonalen Antikörpern eine Rattenhirn-Expressions-Library gescreent. Die auf diese Weise isolierten cDNA-Klone (Ratten-Isoform A) beinhalten ein für ein 459 Aminosäuren umfassendes Protein (berechnetes Molekulargewicht:  $\approx$  50 kD) codierenden offenen Leserahmen; rekombinante Expression dieser cDNA in COS-Zellen [Choi et al., 1990] resultierte in einem hochsignifikanten Anstieg der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase-Aktivität in diesen Zellen; bakterielle Expression eines N-terminal truncierten Fragmentes der cDNA lieferte eine Ca<sup>2+</sup>/CaM-sensitive Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase-Aktivität. Durch Hybridisierung einer humanen Hippocampus-cDNA-Bibliothek mit der auf die oben beschriebene Weise gewonnenen Ratten-cDNA gelang die Isolierung entsprechender humaner cDNA-Klone [Takazawa et al., 1990c, 1991a, b]). Zum einen wurde eine humane cDNA kloniert, auf welcher ein 1383 Basenpaare umfassender offener Leserahmen identifiziert werden konnte, welcher für ein aus 461 Aminosäuren bestehendes Protein (berechnetes Molekulargewicht  $\approx$  51 kD) mit einer 93 % Sequenzidentität zu der als Sonde eingesetzten Ratten-cDNA codiert (humane Isoform A, [Takazawa et al., 1990c, 1991a]), zum anderen wurde aber auch eine weitere Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase-Isoform (bezeichnet als Isoform B) entdeckt. Die von Takazawa et al. isolierte cDNA beinhalten ein für ein 472 Aminosäuren umfassendes Protein (errechnetes Molekulargewicht  $\approx$  53 kD) codierenden offenen Leserahmen; die Sequenzidentität auf Aminosäureebene zu der zuvor isolierten humanen Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase Isoform A [Takazawa et al., 1991a] betrug im Bereich der C-terminalen 276 Aminosäuren 68 %. Die entsprechende Isoform der Ratte wurde durch Immunoscreening einer Rattenleber-cDNA-Expressionbibliothek isoliert [Thomas et al., 1994]; im Bereich der C-terminalen 468 Aminosäuren betrug die Sequenzidentität auf Aminosäureebene 93 %. Allerdings codierte der auf der Ratten-cDNA detektierte offene Leserahmen für ein im Vergleich zu der zuvor publizierten cDNA der humanen Isoform B [Takazawa et al., 1991b] N-terminal um 204 Aminosäuren längeres Protein. Im Rahmen neuerer Untersuchungen ([Schreiber et al., in preparation]; [Dewaste et al., 2002]) konnte unter Verwendung von RT- und 5'-RACE-PCR-Techniken bewiesen werden, dass beide bisher veröffentlichten B-Isoform-cDNA-Sequenzen unvollständig sind: der komplette offene Leserahmen der Ratten- bzw. humanen B-Isoform umfasst 2802 bzw. 2838 Basenpaare und codiert für ein 934 bzw. 946 Aminosäuren großes Protein (errechnetes Molekulargewicht:  $\approx$ 102 kD). In der Tat lassen sich in Westernblot-Analysen verschiedener Zellysate spezifisch Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinasen in diesem hohen Molekulargewichtsbereich nachweisen (Bertsch et al., unveröffentlicht; vergleiche auch [D`Santos et al., 1993]).

Weitere unvollständige, für eine dritte Isoform (Isoform C) codierende humane cDNA-Sequenzen wurde bereits 1997 von Takazawa et al. bzw. Erneux et al. mittels zweier Datenbankeinträge (GenBank accession number D38169 und Y11999) veröffentlicht. Diese durch ein Screening einer humanen Thyroidea-cDNA-Bibliothek bzw. aus Plazentagewebe erhaltenen Partialsequenzen wurde durch [Dewaste et al., 2000] unter Verwendung eines im Rahmen des humanen Genomprojektes isolierten humanen Testis-cDNA-Klones (GenBank accession number AL044962) vervollständigt. Das codierte, 683 Aminosäuren umfassende Protein (errechnetes Molekulargewicht 75 kD) zeigte auf Aminosäureebene im Bereich der C-terminalen 275 Aminosäuren eine 73,2 % bzw. 73,8 % Sequenzidentität zur humanen Isoform A bzw. B. Unabhängig von diesen Untersuchungen wurde auch die Isoform C der Ratte kloniert (Bertsch et al., unveröffentlicht); das 678 Aminosäuren große Protein weist auf Aminosäureebene eine Sequenzidentität von 64 % mit der humanen Isoform C auf.

Für alle drei humanen Isoformen ist die chromosomale Lokalisation bekannt (Isoform A: 15q14 – q21, Isoform B: 1q41 – q43 [Erneux et al., 1992], Isoform C: 19q13.1).

Bei dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Enzym handelt es sich um eine aus Hühnererythrozyten isolierbare Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase; Sequenzvergleiche mit den oben beschriebenen, bei *mammalia* vorkommenden Isoformen A, B und C lassen eine Einordnung in die Klasse der Isoform A zu. Die Sequenzidentität zu den Isoformen A, B und C beträgt im Bereich der in dieser Arbeit untersuchten katalytischen Domäne (einschließlich der regulativ wirkenden Calmodulin-Bindungsdomäne) 75, 68 bzw. 64 Prozent.

Die Klonierung der für dieses Protein codierenden cDNA erfolgte durch eine Kombination zweier Methoden (Hybridisierungs-Screening einer embryonalen Hühner-cDNA-Bank und 5'-RACE-PCR unter der Verwendung von aus sechs Tage alten Hühnerembryonen präparierter RNA); das von einem 1356 bp langen offenen Leserahmen codierte, 452 Aminosäurereste umfassende Protein besitzt ein berechnetes Molekulargewicht von 51 kDa [Bertsch et al., 1999].

### ***Differentielle Expression der drei mammalia-Isoformen***

Durch Northernblotuntersuchungen an aus verschiedenen Rattengeweben (Thymus, Testis, Gehirn, Milz, Leber, Niere, Herz, Lunge, Darm) gereinigter mRNA konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase-Isoformen in sehr unterschiedlichem Maße in verschiedenen Geweben exprimiert werden [Vanweyenberg et al., 1995]. Während nach der Hybridisierung des Blots mit einer B-Isoform-spezifischen Sonde Signale auf einer Höhe von 6 kb in Lunge, Thymus, Testis, Gehirn und Herz detektiert werden konnten, hybridisierte eine A-Isoform-spezifische Sonde lediglich an einer 2 kb langen mRNA in Gehirn und einer 1,8 – 2 kb langen mRNA in Testis. Die Expression der Isoform B scheint somit gegenüber der Expression der Isoform A weniger stark auf bestimmte Gewebe restringiert zu sein. In Überein-

stimmung mit dieser Annahme steht die Beobachtung, dass die Präsenz der für die entsprechende Isoform codierenden mRNA für die B-Isoform, nicht aber für die Isoform A, in drei getesteten humanen Zelllinien (HL-60, SH-SY5Y, HTB-138) nachgewiesen werden konnte. Für die Isoform B wurde darüber hinaus noch die Expression in Astrozyten bewiesen [Mailleux et al., 1992]. Neuere Untersuchungen zum Expressionsmuster der Isoform C wurden von [Dewaste et al., 2000] unter Verwendung eines humanen multiple tissue Northern Blots der Firma Clontech durchgeführt. In allen untersuchten Geweben (Pankreas, Niere, Skelettmuskel, Leber, Lunge, Placenta, Gehirn, Herz) konnte ein 3,9 kb großes Transkript detektiert werden, wobei die Signalstärke in Niere und Gehirn deutlich geringer war als in den restlichen Geweben.

Die stark gewebsspezifische Expression der Isoform A legte die Annahme einer speziellen Rolle dieser Kinase bei der Aufrechterhaltung der Funktion der entsprechenden Isoform A exprimierenden Gewebe nahe. Detaillierte immunhistochemische Untersuchungen und in situ Hybridisierungsexperimente ([Mailleux et al., 1991, 1992, 1993], [Go et al., 1993]) zeigten besonders hohe Expressionraten der Ins(1,4,5) $P_3$  3-Kinase A in Bereichen des Gehirns, welche in die Steuerung der long-term potentiation (u.a. CA1 Pyramidenzellen des Hippocampus) bzw. -depression (Purkinjezellen des Cerebellums) eingebunden sind, was eine eventuelle Bedeutung der Isoform A für gedächtnisbildende Prozesse suggeriert. Die physiologische Relevanz dieses Befundes wurde 1998 durch Jun et al. im Rahmen einer an einem Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase A defizienten Mausstamm vorgenommenen Studie weiter untersucht. In der Tat war in den (morphologisch unauffälligen) Gehirnen von knock-out-Tieren neben signifikant erniedrigten Ins(1,3,4,5) $P_4$ -Konzentrationen auch eine auf bestimmte Areale (CA1-Region des Hippocampus) beschränkte, signifikante Erhöhung der LTP zu verzeichnen; eine Beeinflussung des räumlichen Lernvermögens, wie es im Morris water maze task bestimmbar ist, war jedoch nicht zu verzeichnen. Auch die Fertilität hetero- und homozygoter knock-out Tiere wird durch das Fehlen der Isoform A nicht beeinflusst, so dass die genaue Bedeutung des Enzyms für die Funktionalität der es exprimierenden Gewebe nach wie vor noch nicht endgültig geklärt ist. Von [Schell et al., 2001] wurde die durch direkte Interaktion mit F-Aktin vermittelte Lokalisation der Isoform A in den dendritischen Dornen neuronaler Zellen beschrieben; zudem wurde eine Kolo-kalisation mit CaMKII beobachtet.

### ***Der modulare Aufbau der Vertebraten Ins(1,4,5) $P_3$ 3-Kinase-Isoformen: N-Terminus, Calmodulin-Bindungsdomäne und katalytische Domäne***

Wie bereits oben beschrieben, zeigen auf Aminosäureebene alle bisher bekannten Ins(1,4,5) $P_3$  3-Kinase-Isoformen hohe wechselseitige Sequenzidentität im Bereich der C-terminalen 276 Aminosäuren, während die N-Termini der verschiedenen Isoformen A, B und C sowohl bezüglich ihrer Länge als auch in der Aminosäuresequenz extrem verschieden sind.

Dieser Sachverhalt legt nahe, dass gewisse, allen Isoformen gemeinsame Eigenschaften (z.B. Bindung von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  und ATP, Katalyse; Bindung von  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ) von Domänen im Bereich des C-Terminus determiniert werden, während für die N-terminalen Regionen bestimmte isoformspezifische Regulations- und/oder Targetingfunktionen zu vermuten sind ([Thomas et al., 1996], [Soriano et al., 1997a, b]). In der Tat konnte unter Verwendung von rekombinant als  $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsprotein exprimierter RnIP3KA gezeigt werden [Takazawa et al., 1991c], dass die Deletion der äußersten 34 C-terminalen Aminosäuren zu einem katalytisch inaktiven Konstrukt mit nach wie vor erhaltener Fähigkeit zur  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Bindung führt; die Untersuchung N-terminaler Deletionsmutanten mit intaktem C-Terminus zeigte, dass die äußersten 275 C-terminalen Reste hinreichend für die Expression eines katalytisch aktiven Polypeptids sind. Ebenfalls durch die Analyse von 5'- sowie 3'- Deletionsmutanten konnte mittels Bindungstests an eine CaM-Sepharosematrix die CaM-Bindungsdomäne der RnIP3KA auf den durch die Reste S-156 und L-189 flankierten Bereich, welcher auch mit bereits beschriebenen Calmodulin-Bindungsdomänen anderer Proteinfamilien ([O'Neil et al., 1990], [Erneux et al., 1993]) aligned werden kann, eingegrenzt werden. Die Funktionalität dieses Bereichs als  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -bindende Domäne wurde in nachfolgenden Arbeiten [Erneux et al., 1993] bestätigt: die  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Stimulierbarkeit des rekombinanten Enzyms wurde sowohl durch ein die Sequenz der putativen CaM-Bindungsdomäne enthaltendes Peptid als auch durch ein von der bereits gut charakterisierten CaM-Bindungsdomäne der Myosin light-chain kinase abgeleitetes Peptid effizient inhibiert. Desweiteren führte die zielgerichtete Mutagenese des auch in den CaM-Bindungsdomänen anderer Proteine vorkommenden, hochkonservierten Tryptophanrestes W-165 zu Alanin bzw. Glycin zu Proteinen, welche zwar enzymatische Aktivität, aber keine Stimulierbarkeit durch  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  mehr aufwiesen.

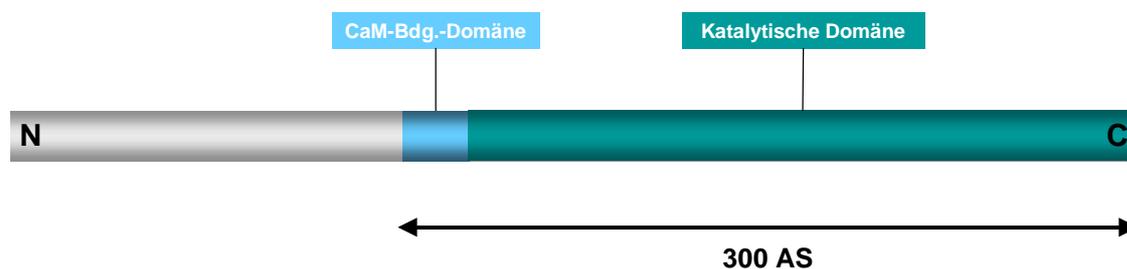


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des Aufbaus der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen. Im Bereich der C-terminal gelegenen katalytischen Domäne sowie der Calmodulin-Bindungsdomäne besteht hohe Sequenzidentität zwischen den Isoformen A, B und C; die N-Termini der verschiedenen Isoformen variieren stark in Länge und Aminosäuresequenz und erfüllen vermutlich sowohl regulative als auch Targeting-Funktionen.

---

**Die katalytische Domäne der *Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>* 3-Kinasen: Bindung von *Mg<sup>2+</sup>/ATP* und *Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>***

In zwei Arbeiten von [Communi et al., 1993, 1995] wurden durch gezielte Mutagenese und chemische Modifikation der rekombinanten RnIP3KA Aminosäurereste identifiziert, die vermutlich eine essentielle Rolle bei der Bindung des Substrates ATP/Mg<sup>2+</sup> spielen. So wurde für die Mutante K197I eine signifikant verringerte Enzymaktivität gemessen, für die Mutante D414N war gar kein Umsatz von *Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>* zu detektieren. Beide Mutanten zeigten eine signifikant schlechtere Bindung an eine ATP-Agarose-Affinitätsmatrix bei gegenüber dem wt-Enzym unveränderten Bindungsdaten für Ca<sup>2+</sup>/CaM und *Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>*. Die von Communi et al. ebenfalls untersuchte Mutation K207I unterschied sich in keiner der untersuchten Eigenschaften von dem wt-Enzym. Ein weiterer, eventuell in die Bindung von ATP/Mg<sup>2+</sup> involvierter Rest konnte durch die Analyse von <sup>14</sup>C-Phenylglyoxal gelabelten RnIP3KA-Peptidfragmenten identifiziert werden. Die enzymatische Aktivität sowohl nativer als auch rekombinant hergestellter RnIP3KA kann durch chemische Modifikation mit dem arginin-spezifischen Reagenz Phenylglyoxal (1,2 mol Phenylglyoxal pro mol Protein bei vollständiger Hemmung) irreversibel inhibiert werden [Communi et al., 1995], ein Effekt, der durch die Anwesenheit von ATP im Reaktionsansatz antagonisiert werden kann, nicht aber durch den Zusatz von *Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>*. Zur Identifikation des modifizierten Restes wurde <sup>14</sup>C-Phenylglyoxal – modifizierte RnIP3KA einer Chymotrypsinbehandlung unterzogen und die entstandenen Peptide sodann analysiert, wobei sich die modifizierte Aminosäure als R317 herausstellte.

Aufbauend auf den Resultaten von [Takazawa et al., 1991c] untersuchten [Togashi et al., 1997] weitere N- und C- terminale Deletionsmutanten sowie gezielt an einzelnen Aminosäurepositionen mutagenisierte  $\beta$ -Galaktosidase-RnIP3KA-Fusionsproteine. Es konnte gezeigt werden, dass ein mit S185 der RnIP3KA beginnendes Konstrukt ( $\beta$ -Gal-RnIP3KA(185-459)) sowohl zur Bindung von *Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>* fähig war, als auch enzymatische Aktivität zeigte, während die N-terminale Deletion weiterer 20 Aminosäuren (Konstrukt  $\beta$ -Gal-RnIP3KA(205-459)) zum Verlust der Kinaseaktivität (vgl. [Communi et al., 1994]) bei nach wie vor erhaltener Fähigkeit zur *Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>* – Bindung führte. Die N-terminale Begrenzung der *Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>* – Bindungsdomäne der RnIP3KA konnte durch die Konstrukte  $\beta$ -Gal-RnIP3KA(259-459) und  $\beta$ -Gal-RnIP3KA(263-459) definiert werden: durch die N-terminale Deletion von nur 4 weiteren Aminosäuren wurde die in  $\beta$ -Gal-RnIP3KA(259-459) noch erhaltene Fähigkeit zur *Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>* – Bindung komplett verloren. Gezielte Mutagenese eines enzymatisch aktiven Konstruktes ( $\beta$ -Gal-RnIP3KA(66-459)) brachte Aufschluss über die Bedeutung einzelner Reste in diesem offenbar für die *Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>* – Bindung essentiellen Bereich: während die Mutante C261S im wesentlichen keine Veränderungen gegenüber dem WT aufwies, war keine Bindung von *Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>* an die Mutante K262A mehr messbar. Neuere Arbeiten von [Saiardi et al., 1999, 2001a, b] zeigen, dass das in dem hier diskutierten Bereich der IP3K-Pri-

märstruktur vorliegende Sequenzmotiv [LV]-[LA]-[DE]-X(3,8)-P-X-[VAI]-[ML]-D-X-K-[ML]-G in allen bisher identifizierten Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen und Inositolhexakisphosphatkinasen sowie den Inositolpolyphosphatmultikinasen aus Hefe und Ratte vorkommt.

Die Untersuchung C-terminaler Deletionsmutanten ( $\beta$ -Gal-RnIP3KA(66-425),  $\beta$ -Gal-RnIP3KA(66-450),  $\beta$ -Gal-RnIP3KA(66-452),  $\beta$ -Gal-RnIP3KA(66-454)) ergab, dass zwar eine Deletion der C-terminal äußersten 34 Aminosäuren zu einem vollständigen Verlust der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Bindungsfähigkeit führt, dass aber Mutanten mit kleineren C-terminalen Deletionen weniger durch eine verschlechterte  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Bindung als vielmehr durch eine signifikant geringere Umsatzgeschwindigkeit gekennzeichnet sind. Die Bedeutung des äußersten C-Terminus scheint somit nicht in einer direkten Beteiligung einzelner Aminosäurereste an der Ausbildung der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Bindungsdomäne zu liegen; vielmehr scheint der gesamte Bereich als solcher essentiell für die strukturelle und funktionale Integrität der katalytischen Einheit zu sein [Togashi et al., 1997].

### **Regulation von Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen**

Ein allen Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen gemeinsamer, die Enzymaktivität der verschiedenen Isoformen unterschiedlich stark beeinflussender Faktor ist die Interaktion der Proteine mit dem Calcium/Calmodulin-Komplex. Während die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  an Kinasen der Isoform A maximal in einer Verdopplung der spezifischen Aktivität des Enzyms resultiert [Communi et al., 1997], wurde für die Isoform B eine bis zu zwanzigfache Aktivierung durch  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  beobachtet [Communi et al., 1999]; bei einer festen Calciumkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  wurde halbmaximale Aktivierung der Isoform A bzw. B bei Calmodulinkonzentrationen von 52 nM bzw. 17 nM erreicht. Die spezifische Aktivität der Isoform C wird durch Calcium/Calmodulin lediglich marginal (Faktor 1,2 – 1,5) gesteigert [Dewaste et al., 2000].

Sowohl die spezifische Aktivität als auch die Aktivierbarkeit durch  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  kann bei den verschiedenen Isoformen durch Phosphorylierung der Enzyme an Serin- und Threoninresten reguliert werden. Für die Isoform A der Ratte wurde von [Communi et al., 1997] sowohl im zellulären System als auch *in vitro* eine von der Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) katalysierte Phosphorylierung des Threoninrestes 311 nachgewiesen; die Auswirkungen dieser posttranslationalen Modifikation bestehen in einer Steigerung der spezifischen Aktivität des Enzyms um den Faktor 8 – 10 sowie in einer, bei gleichbleibender maximaler Stimulierbarkeit, 25fach erhöhten Sensitivität gegenüber dem  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Komplex. Auch die Isoform B der Ratte wird durch CaMKII mit einer Stöchiometrie von 1 mol/mol phosphoryliert [Communi et al., 1999]. Wie im Fall der Isoform A führt die Phosphorylierung auch hier zu einer drastischen Steigerung der spezifischen  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinase-Aktivität (Faktor  $\approx 25$ ); der durch die Proteinkinase modifizierte Aminosäurerest wurde jedoch für die Isoform B nicht experimentell identifiziert. Da jedoch die den betreffenden Threoninrest beinhaltende

CaMKII – Consensussequenz (R-X-X-S/T-X) auch in der Isoform B vorhanden ist, ist die CaMKII – katalysierte Phosphorylierung dieses Threoninrestes mit großer Wahrscheinlichkeit ein sowohl in der A- als auch in der B-Isoform realisierter Regulationsmechanismus der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase-Aktivität. Eine differentielle Regulation der Enzymaktivitäten der verschiedenen Isoformen scheint über Proteinkinase A und Proteinkinase C vermittelte Phosphorylierungen möglich zu sein. *In vitro* – Experimente von [Woodring et al., 1997] zeigten zwar ähnliche Stöchiometrien des PKA bzw. PKC-katalysierten Phosphateinbaus in die Isoformen A und B (1 mol/mol für beide Isoformen bei Phosphorylierung durch PKA, 2 mol/mol bzw. 2,7 mol/mol bei Phosphorylierung der Isoform A bzw. B durch PKC), die Auswirkungen der Phosphorylierungen auf die enzymatische Aktivität sowie die Stimulierbarkeit derselben durch Interaktion mit dem Ca<sup>2+</sup>/CaM-Komplex waren jedoch deutlich unterschiedlich.

Neben der Beeinflussung der katalytischen Aktivität und der Interaktion mit Ca<sup>2+</sup>/CaM kann, wie von [Communi et al., 1999] für die Isoform B gezeigt, auch die durch die isoform-spezifischen N-Termini der Kinasen determinierte intrazelluläre Lokalisation der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinasen durch den Phosphorylierungsstatus des Enzyms verändert werden.

Weitgehend ungeklärt ist noch die Rolle der sich auf Ebene der Primärstruktur zwischen dem N-terminalen Bereich und der Calmodulin-Bindungsdomäne befindenden PEST Sequenz [Choi et al., 1990]. Diese in einer ganzen Anzahl Calmodulin-bindender Proteine vorkommenden Domänen sind suszeptibel für die Proteolyse durch endogene, neutrale, calciumregulierte Proteasen wie Calpain I und II und werden häufig in Proteinen mit nur kurzer Halbwertszeit gefunden ([Barnes et al., 1995]; [Rechsteiner, 1990]). Da Calpaine sowohl in Prozesse der Cytoskelett-Reorganisation [Kawasaki et al., 1996] sowie des Zellzyklus [Santella et al., 1998] involviert sind, könnte eine Untersuchung der regulatorischen Bedeutung der Calpain-katalysierten Proteolyse von Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen weitere interessante Funktionen dieser Enzyme deutlich machen.

## 1.3.2 Inositolpolyphosphatmultikinasen: Inositolphosphatkinasen und Transkriptionsregulatoren ?

### 1.3.2.1 Die Rolle der Inositolpolyphosphatmultikinasen im Inositolphosphatstoffwechsel

Inositolpolyphosphatmultikinasen (IPMK) katalysieren wie Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen die Phosphorylierung des zellulären Botenstoffes Inositol 1,4,5-trisphosphat, allerdings kann die  $\gamma$ -Phosphatgruppe des ATP nicht nur auf die Hydroxylgruppe am Kohlenstoffatom 3 des Inositolrings sondern auch auf die OH-Gruppe an der Position 6 übertragen werden ([Saiardi et al., 2000a], [Odom et al., 2000]). Die sich hier zeigende, gegenüber den Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen verringerte Substratselektivität der Inositolpolyphosphatmultikinasen spiegelt sich auch darin wieder, dass eine Reihe weiterer, von IPMK katalysierter Metabolisierungen beschrieben wurden. So können z.B. die oben genannten, aus  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  gebildeten  $\text{InsP}_4$  – Isomere durch weitere Phosphorylierungsreaktionen zu  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  und einem PP- $\text{InsP}_4$  – Isomer umgesetzt werden ([Zhang et al., 2001], [Saiardi et al., 2001a]); ein weiteres Substrat der *mammalia* IPMK ist das  $\text{InsP}_2$  – Isomer  $\text{Ins}(4,5)\text{P}_2$  [Saiardi et al., 2001a].

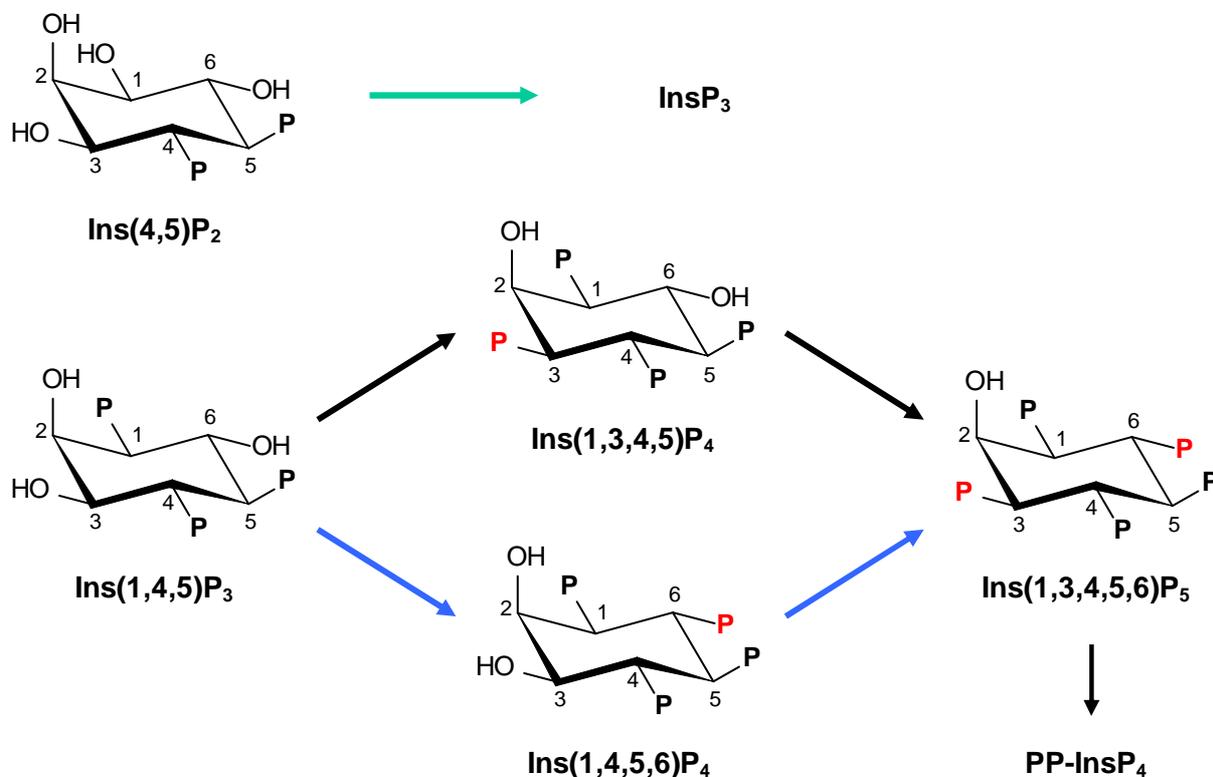


Abbildung 1.6: Bisher beschriebene, von Inositolpolyphosphatmultikinasen katalysierte Metabolisierungen von Inositolphosphaten. Schwarze Pfeile: Umsetzung sowohl für die ScIPMK (ArgRIII) als auch für die RnIPMK gezeigt; blaue Pfeile: Umsetzung bisher nur für ArgRIII bewiesen; grüner Pfeil: Umsetzung bisher nur für RnIPMK gezeigt.

### 1.3.2.2 Inositolpolyphosphatmultikinasen in Hefe und höheren Eukaryoten

Die Inositolpolyphosphatmultikinaseaktivität des in *S. cerevisiae* vorkommenden Proteins ArgRIII (Arg82) wurde erstmals unabhängig voneinander sowohl von [Saiardi et al., 1999] als auch von [Odom et al., 2000] beschrieben; Arbeiten von [York et al., 1999] hatten zu diesem Zeitpunkt bereits erste Hinweise auf die Existenz einer multifunktionalen  $\text{InsP}_3/\text{InsP}_4$  – Kinaseaktivität in dieser Spezies erbracht. Diese Entdeckung war insbesondere deshalb von großem Interesse, da es sich bei ArgRIII um ein bereits gut charakterisiertes Protein handelte, dem eine wichtige Rolle bei der Regulation des Argininmetabolismus der Hefe zugeschrieben werden kann. [El Bakkoury et al., 2000] gelang es zu beweisen, dass der Einfluss des ausschließlich kernlokalisierten Proteins ArgRIII auf die Transkription arginin-regulierter Gene durch eine, die Interaktionspartner stabilisierende Bindung des ArgRIII an in die DNA-Bindung involvierte helikale Bereiche der MADS-Box-Transkriptionsfaktoren ArgRI und Mcm1 vermittelt wird. Diese beiden Faktoren sind essentielle Bestandteile des arginin-regulierten ArgR/Mcm1 – Transkriptionsfaktorkomplexes; ArgRIII sorgt also durch Erhöhung der intrazellulären Halbwertszeit der diesen Komplex konstituierenden Bestandteile für eine den metabolischen Bedürfnissen der Zelle angepasste Transkriptionsregulation. Untersuchungen von [Dubois et al., 2000] zeigten, dass weder die Kinaseaktivität noch die von der Kinase gebildeten Inositolphosphate eine Rolle in der Regulation des Argininmetabolismus spielen; ArgRIII ist somit ein multifunktionelles Protein, welches verschiedene, voneinander unabhängige Funktionen erfüllt.

Der für ArgRIII codierende offene Leserahmen umfasst 1065 bp; das errechnete Molekulargewicht des 355 Aminosäurereste beinhaltenden Proteins beträgt 40 kDa.

Ein in *mammalia* vorkommendes Protein mit Inositolphosphatmultikinaseaktivität konnte von [Saiardi et al., 2001a] durch eine tblastn-Sichtung der Ratten-EST-Datenbank identifiziert und kloniert werden. Das 396 Aminosäurereste große Protein besitzt ein errechnetes Molekulargewicht von 44 kDa und wird durch einen 1188 bp umfassenden ORF codiert. Die Aminosäuresequenz dieses von Saiardi et al. als RnIPMK bezeichneten Proteins zeigte schwache Sequenzhomologie (< 25 %) sowohl zu den bisher bekannten Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen und Inositolhexakisphosphatkinasen als auch zu ArgRIII; erste Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität an rekombinant in *E.coli* exprimierten GST-Fusionsproteinen zeigten ein mit ArgRIII vergleichbares Spektrum möglicher durch RnIPMK katalysierter Inositolphosphatmetabolisierungen. Das humane Ortholog dieses Proteins wurde kürzlich in der Arbeitsgruppe Mayr/Deschermeier (Inst. F. Med. Biochemie und Molekularbiologie, UKE Hamburg) von Nalaskowski et al. (eingereicht) unter Benutzung der htgs- sowie der humanen EST-Datenbank identifiziert. Es handelt sich dabei um ein 416 Aminosäurereste umfassendes Protein, welches von einem 1248 bp langen offenen Leserahmen codiert wird; das errechnete Molekulargewicht beträgt 47 kDa. Der Locus des betreffenden Gens in-

nerhalb des humanen Genoms ist 10q21. Eine interessante, bisher noch unbeantwortete Frage ist, ob die in *mammalia* exprimierten Inositolpolyphosphatmultikinasen analog zum Hefeprotein ArgR111 über ihre Rolle im Inositolphosphatmetabolismus hinaus durch Wechselwirkung mit anderen Proteinen in die Regulation zellulärer Prozesse wie z.B. Transkription eingebunden sind.

### 1.3.3 Inositolhexakisphosphatkinasen: Biosynthese hochphosphorylierter Inositolphosphate

#### 1.3.3.1 Die Rolle der Inositolhexakisphosphatkinasen im Inositolphosphatstoffwechsel

Inositolhexakisphosphatkinasen katalysieren den Transfer der  $\gamma$ -Phosphatgruppe von Adenosin triphosphat (ATP) auf eine der Phosphatgruppen des Inositolhexakisphosphats; das so synthetisierte Diphosphoinositolpentakisphosphat (PP-IP<sub>5</sub>) beinhaltet (wie ATP) eine energiereiche Phosphodiesterbindung. In der Tat zeigen diese Enzyme auch ATP-Synthetase-Aktivität, sie katalysieren also auch die entsprechende Rückreaktion (Transfer einer Phosphatgruppe von PP-IP<sub>5</sub> auf ATP). Als weitere IP<sub>6</sub>K-katalysierte Reaktion wurde der Umsatz eines IP<sub>5</sub>-Isomers zu PP – IP<sub>4</sub> und weiter zu (PP)<sub>2</sub> – IP<sub>3</sub> beschrieben [Saiardi et al., 2000b].

#### 1.3.3.2 Inositolhexakisphosphatkinasen in Hefe und höheren Eukaryoten

Von [Saiardi et al., 1999, 2001b] wurden in *mammalia* drei verschiedene Isoformen der Inositolhexakisphosphatkinase identifiziert. Bei der Isoform 1, welche aus Mensch, Ratte und Maus kloniert werden konnte, handelt es sich um ein 441 (HsIP6K1) bzw. 433 (RnIP6K1, MmIP6K1) Aminosäurereste umfassendes cytosolisches Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 49 kDa, welches gemäß den Untersuchungen von [Luo et al., 2001] mit dem Guaninnukleotidaustauschfaktor GRAB interagiert. Northernblot-Analysen zeigten eine im wesentlichen auf Gehirn und Testis beschränkte Expression. Die im Gegensatz dazu ubiquitär exprimierte Isoform 2 besitzt ebenfalls ein errechnetes Molekulargewicht von 49 kDa und umfasst 426 (HsIP6K2), 424 (RnIP6K2) bzw. 425 (OcIP6K2) Aminosäureresten. Diese ausschließlich nukleär lokalisierte Isoform [Saiardi et al., 2001b] wurde in Experimenten von [Morrison et al., 2001, 2002] als ein essentieller Faktor der Interferon- $\beta$ -induzierten Apoptose identifiziert. Der genaue Mechanismus konnte hierbei noch nicht aufgeklärt werden, jedoch scheint die katalytische Aktivität der IP6K2 dabei von essentieller Bedeutung zu sein.

Die 410 Aminosäurereste umfassende humane Isoform 3 der Inositolhexakisphosphatkinasen (HsIP6K3) wurde von [Saiardi et al., 2001b] aus einer humanen Gehirn-cDNA-Bank kloniert, besitzt ein errechnetes Molekulargewicht von 46 kDa und weist eine 50 bzw. 45 % - ige Sequenzidentität zur HsIP6K1 bzw. HsIP6K2 auf. Das im wesentlichen cytosolisch lokalisier-

te Enzym besitzt einen gegenüber den Isoformen 1 und 2 deutlich höheren theoretischen isoelektrischen Punkt (8,28 gegenüber 6,64 für MmIP6K1 und 6,52 für HsIP6K2) und scheint wie die Isoform 2 ubiquitär exprimiert zu werden.

Die Inositolhexakisphosphatkinase der Hefe *S.cerevisiae*, das Protein KCS1, umfasst 1050 Aminosäuren und besitzt ein errechnetes Molekulargewicht von 119 kDa. Von [Saiardi et al., 2000] und [Dubois et al., 2002] wurde die Bedeutung der Enzymaktivität des KCS1 für die Aufrechterhaltung der Zellwandintegrität und der Vakuolenmorphologie aufgezeigt.

## 1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Intention dieser Arbeit ist es, einen Einblick in die bei den Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen (IP3K) realisierten molekularen Mechanismen zur hochaffinen und -selektiven Bindung des second messenger Moleküls Inositol 1,4,5-trisphosphat ( $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ) zu gewinnen. Die Funktion einzelner Aminosäuren für die Substratbindung und Katalyse soll durch die Analyse gezielt hergestellter GgIP3K-A Mutanten aufgeklärt werden. Durch spezielle PCR-Mutagenesetechniken werden Veränderungen an der in einen prokaryotischen Expressionsvektor einklonierten GgIP3K-A cDNA vorgenommen, die so mutierten Plasmide können zur Expression von rekombinanten, sich lediglich in einer Aminosäureposition vom wt-Enzym unterscheidenden GgIP3K-A-Fragmenten verwendet werden. Nach Anwendung geeigneter Chromatographie-Methoden kann eine Charakterisierung der gereinigten rekombinanten Proteine durch Bestimmung der enzymatischen Parameter (apparente Michaelis-Menten-Konstanten für ATP und  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ , maximale Umsatzgeschwindigkeit) im Rahmen eines gekoppelten enzymatisch-optischen Testes erfolgen.

Weitere Experimente an GgIP3K-A-Mutanten mit deutlichen Veränderungen der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Bindungsaffinität können Anhaltspunkte für die räumliche Organisation der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Bindungsdomäne der IP3K liefern. Zum einen sollen hier weitergehende enzymkinetische Untersuchungen erfolgen, insbesondere die Analyse der kompetitiven Inhibition der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinasereaktion durch andere, nicht durch IP3K metabolisierte Inositolphosphate. Zum anderen soll die Anwendbarkeit der Methode der Saturation Transfer Difference NMR in der Analytik von Inositolphosphat/Protein – Interaktionen demonstriert werden.

Im Rahmen der Diskussion der so erhaltenen experimentellen Daten können durch funktionelle und sequenzbasierte Homologien zwischen der hier untersuchten  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinase und anderen inositolphosphatmetabolisierenden Enzymen Hypothesen für allgemeine molekulare Strategien zur hochaffinen und -selektiven Bindung von Inositolphosphaten abgeleitet werden.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Inositolphosphate

D-myo-Ins(1,4,5)P <sub>3</sub>	Prof. Dr. Mayr, UKE Hamburg
D-myo-Ins(1,4,5)P <sub>3</sub>	Alexis Biochemicals
D-myo-Ins(1,3,4,5)P <sub>4</sub>	Prof. Dr. Mayr, UKE Hamburg
D-myo-Ins(1,4,6)P <sub>3</sub>	B.V.L. Potter, University of Bath, UK
D-myo-Ins(1,4,6)P <sub>3</sub>	Alexis Biochemicals
scyllo-Ins(1,2,3,5)P <sub>4</sub>	B.V.L. Potter, University of Bath, UK

#### 2.1.2 Chemikalien

Acrylamid siehe Rotiphorese <sup>R</sup>	
Adenosin-5'-triphosphat (ATP) Dinatriumsalz	Roche Mol.Bio., 127531
$\gamma$ - <sup>32</sup> P-Adenosintriphosphat	Amersham, PB10132
Agarose Electrophoresis Grade	Gibco, 15510-027
6-Aminohexansäure	Merck, 800145
Ammoniumpersulfat ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> )	Serva, 13375
Ammoniumsulfat ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck, 101217
Benzamidin Hydrochlorid	Fluka, 12073
Bromphenolblau	Merck, 111746
Bovines Serumalbumin (BSA)	Biomol, 01400
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O)	Merck, 102382
Calmodulin	Eigenherstellung
Coomassie brilliant blue G250	Serva, 17524
Coomassie Protein Assay Reagent	Pierce, 1856206
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Gibco, 10297-018
D-Desthiobiotin (5-Methyl-2-oxo-4-imidazolinecaproic acid)	Sigma, D-1411
DAG (2-Arachidonoyl-1-Stearoyl-sn-Glycerol)	Sigma-Aldrich, 10920
Dichlormethan	Merck, 106049
Dimethylformamid (DMF)	Merck, 102937
1,4 Dithiothreitol (DTT)	Biomol, 04010
Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS)	Serva, 20760
Dowex <sup>R</sup> 1 x 8	Serva, 41111
Essigsäure (Eisessig) 100 %	Merck, 100063
Ethanol	Apotheke, UKE

## 2.1 Materialien

---

Ethidiumbromid	Merck, 111608
Ethylendiamintetraessigsäure (Titriplex <sup>R</sup> III, EDTA)	Merck, 108418
EGTA (Titriplex <sup>R</sup> VI)	Merck, 108435
Ficoll 400	Sigma, F-9378
Formaldehyd	Merck, 104003
Gelatine	Serva, 22151
D(+)-Glucose	Merck, 108337
Glutardialdehyd	Merck, 814393
Glycerol 87 %	Merck, 104094
Glycin	Roth, 3908.2
Glycogen	Roche Mol. Bio., 901393
4-Hydroxyazobenzene-2-carboxylic-acid (HABA)	Sigma, H-5126
N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonic acid (HEPES)	Biomol, 05288
Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Diagnostic Chem., 1882
Kaliumacetat	Merck, 104820
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, 104933
Methanol	Merck, 106009
2-Mercaptoethanol	Merck, 805740
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O)	Merck, 105833
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O)	Merck, 105886
Mangan(II)chlorid-Tetrahydrat (MnCl <sub>2</sub> ·4 H <sub>2</sub> O)	Merck, 105927
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Merck, 106129
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, 106404
NADH	Roche Mol. Bio., 107727
Natriumhydroxid (NaOH) Plätzchen	Merck, 106498
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Merck, 822335
Natriumthiosulfat Pentahydrat	Merck, 106516
Natriumcarbonat-Decahydrat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ·10 H <sub>2</sub> O)	Merck, 106391
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O)	Merck, 106346
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Roche Mol. Bio., 1087479
NuSieve <sup>R</sup> 3:1 Agarose	FMC, 1-800-341-1574
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, P-7626
3-sn-Phosphatidyl-L-Serin	Sigma-Aldrich, 79405
Phosphoenolpyruvat (PEP)	Roche Mol. Bio., 108294
Ponceau-S solution	Roche Mol. Biol., 1142372
2-Propanol	Merck, 9634
RbCl	Merck, 107615
Rotiphorese <sup>R</sup> Gel 30 (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)	Roth, 30291

Salzsäure (HCl) 30 % suprapur	Merck, 100318
Silbernitrat (AgNO <sub>3</sub> )	Merck, 1512
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva, 85325
Trichloressigsäure (TCA)	Merck, 100807
Triethanolamin (TEA)	Merck, 108379
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Gibco, 15504-020
Triton X-100 (t-Octylphenoxyethoxyethanol)	Sigma, 9002-93-1
Tween-20	Serva, 37470
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid (X-gal)	Peqlab, 37-2616
5-Brom-4-chloro-3-indolyl-phosphat (X-phosphat)	Roche Mol. Bio., 1017373
Xylencyanol	Merck, 11059

### 2.1.3 Deuterierte Verbindungen für die NMR-Spektroskopie

D <sub>2</sub> O 99,8%	Merck, 1.13366.0100
Tris-d11	Cambridge Isotope Lab. DLM-1814-5

### 2.1.4 Verwendete Kits

Nucleospin	Macherey-Nagel
Quiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QuiaexII Agarose Gel Extraction Kit	Qiagen
Quantum Prep <sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit	Bio-Rad
Silica Spin Kit for Plasmid DNA Minipreparation	Biometra
Nucleobond AX Kit	Macherey-Nagel
Dye-Terminator-Sequencing Kit	Applied Biosystems

### 2.1.5 Enzyme

Zur Anwendung kamen folgende Enzyme der genannten Hersteller:

Lysozym	Roche Molecular Biochemicals, #107255
DNase	Roche Molecular Biochemicals, #104159
Trypsin	Roche Molecular Biochemicals, #109819
Laktatdehydrogenase	Roche Molecular Biochemicals, #106941
Pyruvatkinase	Roche Molecular Biochemicals, #128155
Proteinkinase C	Calbiochem, #539494

Pfu-Polymerase	Stratagene, #600154
Pfu-Polymerase	Promega, #M774
Pwo-Polymerase	Roche Molecular Biochemicals, #1644955
Taq-Polymerase	Gibco, #10342-020
T4-DNA-Ligase	Gibco, #15224-025

**Restriktionsendonukleasen:**

<i>Afl</i> II	5' ...C' TTAGG... 3'	NEB, #R0520S
<i>Apa</i> I	5' ...GGGCC' C... 3'	Roche Mol. Bio., #899208
<i>Ase</i> I	5' ...AT' TAAT... 3'	NEB, #R0526S
<i>Avr</i> II	5' ...C' CTAGG... 3'	NEB, #R0174S
<i>Bam</i> H I	5' ...G' GATCC... 3'	MBI, #ER0051
<i>Bgl</i> I	5' ...GCCNNNN' NGGC... 3'	MBI, #ER0071
<i>Bgl</i> II	5' ...A' GATCT... 3'	Pharmacia, #E1021Y
<i>Bsa</i> B I	5' ...GATNN' NNATC... 3'	NEB, #R0537S
<i>Bsm</i> B I	5' ...CGTCTC 1' 5... 3'	NEB, #R0580S
<i>Bsp</i> 119 I	5' ...TT' CGAA... 3'	MBI, #ER0121
<i>Bsp</i> 120 I	5' ...G' GGCCC... 3'	MBI, #ER0131
<i>Bsr</i> G I	5' ...T' GTACA... 3'	NEB, #R0575S
<i>Bst</i> B I	5' ...TT' CGAA... 3'	NEB, #R0519S
<i>Cfr</i> 42 I	5' ...CCGC' GG... 3'	MBI, #ER0201
<i>Dra</i> I	5' ...TTT' AAA... 3'	MBI, #ER0221
<i>Dpn</i> I	5' ...GA <sup>m</sup> ' TC... 3'	NEB, #R0176S
<i>Eco</i> 47 III	5' ...AGC' GCT... 3'	MBI, #ER0321
<i>Eco</i> 81 I	5' ...CC' TNAGG... 3'	MBI, #ER0371
<i>Eco</i> R I	5' ...G' AATTC... 3'	Roche Mol. Bio., #703737
<i>Eco</i> R V	5' ...GAT' ATC... 3'	Pharmacia, #E1042Y
<i>Ehe</i> I	5' ...GGC' GCC... 3'	MBI, #ER0441
<i>Fsp</i> I	5' ...TGC' GCA... 3'	NEB, #R0135S
<i>Hind</i> III	5' ...A' AGCTT... 3'	MBI, #ER0501
<i>Ksp</i> I	5' ...CCGC' GG... 3'	Roche Mol. Bio., #1117807
<i>Ksp</i> A I	5' ...GTT' AAC... 3'	MBI, #ER1031
<i>Mun</i> I	5' ...C' AATTG... 3'	MBI, #ER0751
<i>Nar</i> I	5' ...GG' CGCC... 3'	NEB, #R0191S
<i>Nco</i> I	5' ...C' CATGG... 3'	NEB, #R0193S
<i>Nde</i> I	5' ...CA' TATG... 3'	NEB, #R0111S
<i>Nhe</i> I	5' ...G' CTAGC... 3'	MBI, #ER0971
<i>Nsi</i> I	5' ...ATGCA' T... 3'	NEB, #R0127S

---

<i>Pae</i> I	5' ...GCATG' C... 3'	MBI, #ER0601
<i>Ppu</i> M I	5' ...PuG' GA(T)CCPy... 3'	NEB, #R0506S
<i>Pst</i> I	5' ...CTGCA' G... 3'	MBI, #ER0611
<i>Pvu</i> II	5' ...CAG' CTC... 3'	Pharmacia, #E1075Y
<i>Sac</i> I	5' ...GAGCT' C... 3'	NEB, #R0156S
<i>Sal</i> I	5' ...G' TCGAC... 3'	NEB, #R0138S
<i>Sap</i> I	5' ...GCTCTTC 1'4... 3'	NEB, #R0569S
<i>Sma</i> I	5' ...CCC' GGG... 3'	MBI, #ER0661
<i>Spe</i> I	5' ...A' CTAGT... 3'	NEB, #R0133S
<i>Sph</i> I	5' ...GCATG' C... 3'	NEB, #R0182S
<i>Stu</i> I	5' ...AGG' CCT... 3'	NEB, #R0187S
<i>Sty</i> I	5' ...C' CA(T)A(T)GG... 3'	NEB, #R0500S
<i>Xba</i> I	5' ...T' CTAGA... 3'	Roche Mol.Bio., #674257
<i>Xho</i> I	5' ...C' TCGAG... 3'	NEB, #R0146S; MBI

### 2.1.6 Plasmide

#### Kommerziell erhältliche Plasmide

pZErO <sup>TM</sup> -2.1	Invitrogen, #K2600-01
pGEM <sup>R</sup> -3z	Promega, #P2151
pGEM <sup>R</sup> -5zf(+)	Promega, # P2241
pGEM <sup>R</sup> -T Easy	Promega, #A1360
pBluescript <sup>R</sup> II SK+	Stratagene, #212205
pET-17b	Novagen, #69663-3

#### Plasmide zur prokaryotischen Expression von wt-GgIP3K-A und wt-HsIP3K-B

Das Plasmid pET-17b-GIK (geeignet zur prokaryotischen Expression eines katalytisch aktiven wt-Fragments der GgIP3K-A) wurde zu Beginn der vorliegenden Arbeit von Prof. Mayr und Dr. Bertsch zur Verfügung gestellt [Bertsch et al., 1999]; das zur Expression eines katalytisch aktiven wt-Fragmentes der HsIP3K-B wurde 1998 von S.Süße im Rahmen einer Diplomarbeit am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie (Abteilung für Zelluläre Signaltransduktion, AG Mayr) hergestellt [Süße, 1998]. Eine detaillierte Beschreibung dieser Plasmide findet sich, zusammen mit der Beschreibung der im Rahmen dieser Arbeit neu hergestellten wt-Expressionsplasmide pSK-A, pSK-B und pSK-C im Abschnitt 3.1.1.

### Als PCR-Templates für die PCR-Megaprimer-Mutagenese nach [Picard et al., 1994] verwendete Plasmide

Die in Abbildung 2.1 abgebildeten Vektoren pGEM3z-IP3K-Xba/Sph und pBluescript-IP3K-UB24/40 wurden in der Megaprimer-PCR-Mutagenese als Templates eingesetzt (siehe auch Abschnitte 2.2.2.8.3.1 und 3.1.2.2.1).

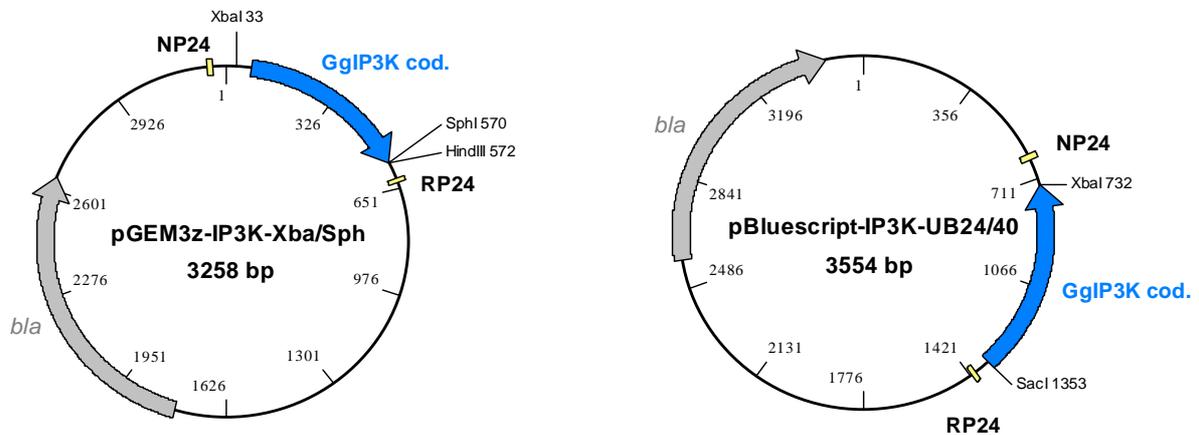


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Vektoren pGEM3z-IP3K-Xba/Sph und pBluescript-IP3K-UB24/40. Dargestellt wurde neben der Position jeweils einklonierten GgIP3K-A-cDNA-Fragmentes (GgIP3K cod.) auch die Lage der zu den Primern NP24 und RP24 komplementären Sequenzen sowie die für das als Selektionsmarker dienende Enzym  $\beta$ -Laktamase codierende Region.

Das Plasmid pGEM3z-IP3K-Xba/Sph wurde erhalten durch Ligation eines 537 bp – *Xba* I / *Sph* I Fragmentes aus dem Vektor pET-17b-GIK (siehe Abschnitt 3.1.1.1) in den mit denselben Enzymen restringierten Vektor pGEM-3z; das einklonierte Fragment umfasst die codierende Region für die Aminosäuren 156 - 300 der GgIP3K-A-Volllänge und somit die Aminosäuren 1 – 166 des auf dem Plasmid pET-17b-GIK codierten Proteins. Dieses Plasmid wurde zu Beginn der Arbeit zur Verfügung gestellt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich das Plasmid pBluescript-IP3K-UB24/40 hergestellt. Hierzu wurde zunächst eine PCR mit den Primern UB24 und UB40 durchgeführt; als Template diente dabei der Vektor pET-17b-GIK (s.o. und Abschnitt 3.1.1.1). Das so erhaltene 638 bp – Fragment wurde sodann mit den Restriktionsendonukleasen *Xba* I und *Sac* I restringiert und in den mit denselben Enzymen verdauten Vektor pBluescript II SK+ einligiert. Das in den Vektor eingebrachte GgIP3K-cDNA-Fragment codiert für die Aminosäuren 264 – 452 der GgIP3K-A-Volllänge, dies entspricht den Aminosäureresten 130 – 318 des auf dem Plasmid pET-17b-GIK codierten Proteins.

### 2.1.7 Antikörper

Anti-GgIP3K-AK (monoklonal, Spezies: <i>Mus musculus</i> )	Dr. Emmrich, Leipzig
Alkaline Phosphatase conjugated IgG goat anti-mouse	Jackson, 115-055-062
Zum spezifischen Nachweis von StrepTagII-Fusionsproteinen im Westernblot:	
Streptavidin-Alkaline Phosphatase	Biorad, 170-3554

### 2.1.8 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von MWG Biotech, Ebersberg bezogen.

#### Universelle Sequenzierprimer:

NP 24 – M13 forward	5' – GAC GTT GTA AAA ACG ACG GCC AGT G – 3'
RP 24 – M13 revers	5' – AAC AGC TAT GAC CAT GAT TAC GCC – 3'
T7 – promoter – primer	5' – TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG – 3'
T7 – terminator – primer	5' – GCT AGT TAT TGC TCA GCG G – 3'

#### Mutageneseprimer für PCR-Mutagenese von GgIP3K-A cDNA nach [Picard et al., 1994]

nicht-primende Basen wurden unterstrichen, neu eingeführte Restriktionsstellen grün markiert

GalP3K – K176L	5' – CA TGA GTA GCG <u>AAG</u> <u>CTT</u> GAA GGG GCT AAT C – 3' antisense, neue <i>Hind</i> III site
UB21 – C209S	5' – AT GAA AAA GAG <u>TCT</u> <u>TTC</u> <u>GAA</u> CGA TTG ATG AAA GAC C – 3' sense, neue <i>Bsp</i> 119 I site
UB15 – C221S	5' – CA CTA CGA TCC <u>TCG</u> <u>GTA</u> <u>CCT</u> TGC TTC CAT GGT G – 3' sense, neue <i>Kpn</i> I site
UB16 – C224S	5' – A TCC TGC GTC <u>CCA</u> <u>AGC</u> <u>TTC</u> CAT GGT GTG GT – 3' sense, neue <i>Hind</i> III site
UB29 – D240A/D241A	5' – CC TAC ATT CAG <u>CTA</u> <u>GCT</u> <u>GCT</u> TTG CTT ACT GAT TTT G – 3' sense, neue <i>Nhe</i> I site
UB28 – D245A/E247L	5' – GAT TTG CTT ACT <u>GCT</u> <u>TTG</u> <u>CTA</u> GGG CCG TGT GTG ATG G – 3' sense, neue <i>Avr</i> II site
UB146 – D245A	5' – G CTT ACT <u>CAT</u> <u>TTC</u> <u>GAA</u> GGG CCG TGT GTG ATG G – 3' sense, neue <i>Bsp</i> 119 I site
UB148A – F246L	5' – G CTT <u>ACA</u> <u>GAT</u> <u>CTT</u> GAA GGG CCG TGT GTG ATG G – 3' sense, neue <i>Bgl</i> II site
UB147 – E247L	5' – G CTT ACT GAT <u>TTG</u> <u>CTA</u> GGG CCG TGT GTG ATG G – 3' sense, neue <i>Avr</i> II site

---

UB22 – C250S	5' – TT GAA <b>GGG CCC</b> TCT GTG ATG GAC TGT AAG – 3' sense, neue <i>Apa</i> I site
UB04 – C254S	5' – GT GTG ATG GAT <b>TCC</b> AAG ATG GGG ATC AGG – 3' sense, neue <i>Bsp119</i> I site
GIK-K255N	5' – ATG GAC TGT AAC <b>ATG GGG ATC</b> AGG ACA TAC – 3' sense, Eliminierung der <i>BsaB</i> I site
GIK-K255A	5' – ATG GAC <b>TGC GCA</b> ATG GGG ATC AGG ACA TAC – 3' sense, neue <i>Fsp</i> I site
GalP3K – K255R	5' – GTG ATG GAC TGT <b>AGA ATG GGG ATC</b> AGG AC – 3' sense, Eliminierung der <i>BsaB</i> I site
GalP3K – R259N	5' – AG ATG GGG <b>ATT AAT</b> ACA TAC CTG GAA GAA G – 3' sense, neue <i>Ase</i> I site
UB05 – E263Q	5' – CA TAC <b>CTG CAG</b> GAA GAG CTG ACT AAA GC – 3' sense, neue <i>Pst</i> I site
UB23 – T267A	5' – GAA GAA GAG <b>CTA GCT</b> AAA GCC CGT GAG – 3' sense, neue <i>Nhe</i> I site
UB24 – K268E	5' – GAA <b>GAG CTC</b> ACT <b>GAA</b> GCC CGT GAG AAA CC – 3' sense, neue <i>Sac</i> I site
GalP3K – R270L	5' – CTG ACT AAA GCC <b>CTC GAG</b> AAA CCA AAG CTG – 3' sense, neue <i>Xho</i> I site
UB07 – K272D	5' – GCC CGT GAG <b>GAT CCA</b> AAG CTG CGT AAA G – 3' sense, neue <i>BamH</i> I site
GalP3K – K272R	5' – GCC CGT GAG <b>AGG CCT</b> AAG CTG CGT AAA GAC – 3' sense, neue <i>Stu</i> I site
GalP3K – K274Q	5' – CGT GAG AAA CCA <b>CAG CTG</b> CGT AAA GAC ATG – 3' sense, neue <i>Pvu</i> II site
UB30 – R276L	5' – G AAA CCA <b>AAG CTI</b> CTI AAA GAC ATG TAC – 3' sense, neue <i>Hind</i> III site
GalP3K – R276K	5' – AAA CCA AAG <b>CTI AAG</b> AAA GAC ATG TAC AAG – 3' sense, neue <i>Afl</i> II site
GalP3K – R277Q	5' – AAA CCA <b>AAG CTI</b> CGT <b>CAA</b> GAC ATG TAC AAG – 3' sense, neue <i>Hind</i> III site
UB08 – D278H	5' – G CTG CGT AAA <b>CAI ATG</b> TAC AAG AAA ATG – 3' sense, neue <i>Nde</i> I site
GalP3K – K282L	5' – GAC ATG TAC AA <b>TTA ATG</b> ATT GAA GTG G – 3' sense, neue <i>Ase</i> I site
GgIP3K – T302D	5' – CG GGG CTT <b>GTC GAC</b> AGC ATG CTG GGC – 3' antisense, neue <i>Sal</i> I site

GalP3K- K303Q	5' – CTG CAT GTA <u>CCG CCG</u> CTG GGT GAC AGC ATG – 3' antisense, neue <i>Cfr42</i> I site
GalP3K – R305L	5' – CCA CTG CAT <u>GTA CAG</u> GGG CTT GGT GAC AGC – 3' antisense, neue <i>BsrG</i> I site
UB170 – R322L	5' – CCC TTC AAT <u>CAG</u> AAA <u>GCC TAG</u> GTT GGC ACT AGA GC – 3' antisense, neue <i>Avr II</i> site
GalP3K – R322K	5' – C TTC AAT <u>CTT</u> AAA <u>GCC TAG</u> GTT GGC ACT AG – 3' antisense, neue <i>Avr II</i> site
UB171 – K327Q	5' – CC ATC TGC TTT <u>CTG GAT</u> CCC TTC AAT CC – 3' antisense, neue <i>BamH</i> I site
GalP3K – K328L	5' – GT TCC ATC TGC <u>AAG CTT</u> AAT CCC TTC AAT C – 3' antisense, neue <i>Hind III</i> site
UB31 – W404Q	5' – GG AAT GCC AAT <u>GTC GAC</u> CTC ATT GAT TTT GGG AAG – 3' sense, neue <i>Sal I</i> site
UB03 – D407S	5' – G TGG CTG AT <u>A AGC</u> TTT GGG AAG ACC AC – 3' sense, neue <i>Hind III</i> site

### Mutageneseprimer für PCR-Mutagenese von GgIP3K-A cDNA nach QuikChange

nicht-primende Basen wurden unterstrichen, neu eingeführte Restriktionsstellen grün markiert

GgIP3K-K303R-F	5' – CAT GCT GTC ACC <u>CGG</u> <u>CCG CCG</u> TAC ATG CAG TGG AG – 3'
GgIP3K-K303R-R	5' – CT CCA CTG CAT GTA <u>CCG CCG</u> <u>CCG</u> GGT GAC AGC ATG – 3' neue <i>Ksp I</i> site
GgIP3K-R310L-F	5' – TAC ATG CAG TGG <u>CTC GAG</u> ACA ATC AGC TCT AGT GC – 3'
GgIP3K-R310L-R	5' – GC ACT AGA GCT GAT TGT <u>CTC GAG</u> CCA CTG CAT GTA – 3' neue <i>Xho I</i> site
GgIP3K-L319A-F	5' – GC TCT AGT GCC AAC <u>GCC GGC</u> TTT AGG ATT GAA GGG – 3'
GgIP3K-L319A-R	5' – CCC TTC AAT CCT AAA <u>GCC GGC</u> GTT GGC ACT AGA GC – 3' neue <i>Nae I</i> site
GgIP3K-I326A-F	5' – GGC TTT AGG ATT GAA <u>GGC GCC</u> AAG AAA GCA GAT GG – 3'
GgIP3K-I326A-R	5' – CC ATC TGC TTT CTT <u>GGC GCC</u> TTC AAT CCT AAA GCC – 3' neue <i>Ehe I</i> site
GgIP3K-R276Q-F	5' – GT GAG AAA CCA AAG <u>CTG CAG</u> AAA GAC ATG TAC AAG – 3'
GgIP3K-R276Q-R	5' – CTT GTA CAT GTC TTT <u>CTG CAG</u> CTT TGG TTT CTC AC – 3' neue <i>Pst I</i> site

GgIP3K-R322Q-F	5' – GT GCC AAC <u>CTG</u> GGC TTT <u>CAG</u> ATT GAA GGG – 3'
GgIP3K-R322Q-R	5' – CCC TTC ATT <u>CIG</u> AAA G <u>CC</u> <u>CAG</u> GTT GGC AC – 3'
	Elimierung der <i>Avr II</i> site aus GgIP3K-R322L cDNA
GgIP3K-F321A-F	5' – GC TCT AGT GCC AAC <u>CTA</u> GGC <u>GCT</u> AGG ATT GAA GGG – 3'
GgIP3K-F321A-R	5' – CCC TTC AAT CCT <u>AGC</u> G <u>CC</u> <u>TAG</u> GTT GGC ACT AGA GC – 3'
	neue <i>Avr II</i> site
GgIP3K-F321D-F	5' – GC TCT AGT GCC AAC <u>CTA</u> GGC <u>GAT</u> AGG ATT GAA GGG – 3'
GgIP3K-F321D-R	5' – CCC TTC AAT CCT <u>TAC</u> G <u>CC</u> <u>TAG</u> GTT GGC ACT AGA GC – 3'
	neue <i>Avr II</i> site
GgIP3K-I323A-F	5'– CT AGT GCC AAC <u>CTA</u> GGC TTT AGG <u>GCT</u> GAA GGG ATT AAG –3'
GgIP3K-I323A-R	5' – CTT AAT CCC TTC <u>AGC</u> CCT AAA G <u>CC</u> <u>TAG</u> GTT GGC ACT AG -3'
	neue <i>Avr II</i> site

### Mutageneseprimer für PCR-Mutagenese von HsIP3K-B cDNA nach [Picard et al., 1994]

nicht-primende Basen wurden unterstrichen, neu eingeführte Restriktionsstellen grün markiert

HsIP3K-B-S764A	5' – C CTT CCG <u>CAG</u> <u>CGC</u> <u>TGG</u> CTT CTT CCG GG – 3'
	antisense, neue <i>Eco47 III</i> site
HsIP3K-B-S764D	5' – C CTT CCG <u>CAG</u> <u>ATC</u> <u>TGG</u> CTT CTT CCG GG – 3'
	antisense, neue <i>Bgl II</i> site
HsIP3K-B-S764E	5' – GTC CTT CCG <u>GAG</u> <u>CTC</u> GGG CTT CTT CCG – 3'
	antisense, neue <i>Sac I</i> site

### Mutageneseprimer für PCR-Mutagenese von HsIP3K-B cDNA nach QuikChange

nicht-primende Basen wurden unterstrichen, neu eingeführte Restriktionsstellen grün markiert

HsIP3K-B-S647D-F	5' – G CAG AAA <u>CCT</u> <u>AGG</u> GTG AGC AAA <u>GAC</u> TGG AGG AAG AT – 3'
HsIP3K-B-S647D-R	5' – AT CTT CCT CCA <u>GTC</u> TTT GCT CAC <u>CCT</u> <u>AGG</u> TTT CTG C – 3'
	neue <i>Avr II</i> site
HsIP3K-B-S663D-F	5' – CT CCC TTC GTC ATG <u>GAC</u> <u>TTT</u> <u>AAA</u> AAG AAG TAC CCC TGG – 3'
HsIP3K-B-S663D-R	5' – CCA GGG GTA CTT CTT <u>TTT</u> <u>AAA</u> <u>GTC</u> CAT GAC GAA GGG AG – 3'
	neue <i>Dra I</i> site
HsIP3K-B-S679D-F	5' – GCA GGA CAC <u>GCC</u> <u>GGC</u> <u>GAT</u> TTC AAG GCA GCT GCC – 3'
HsIP3K-B-S679D-R	5' – GGC AGC TGC CTT GAA <u>ATC</u> <u>GCC</u> <u>GGC</u> GTG TCC TGC – 3'
	neue <i>Nae I</i> site

**genspezifische Primer HsIP3K-B cDNA**

bereits in der cDNA enthaltene Restriktionsstellen sind blau markiert

HsIP3K-B-NcoI-F 5' – C TAC CAT GGG GAT GTG GTG AAG – 3'

HsIP3K-B-StuI-R 5' – CTC TCT GAA GGC CTC GGT GAC C – 3'

**Zur Konstruktion von pET-17b-SiS6 (HsIP3KB-wt-Expressionsplasmid) benutzte Oligonukleotide [Süße, 1998]**

Die durch die Primer eingeführten Restriktionsstellen für *Nhe* I (SB7) bzw. *Nde* I (SB6) wurden grün markiert.

SB6 5' – CTG GAC CAT ATG TCA GCT TTC CTG CAT ACC CTG GAC – 3'

SB7 5' – AGA TGC GCT AGC CTA GGC GAG TGG GGC ATC CTG GGA C – 3'

**zur Konstruktion des Plasmids pSK-A benutzte Oligonukleotide**

neu eingeführte Restriktionssites (*Ehe* I) sind grün markiert; StrepTagII-Sequenz (sense bei StrepTagII-Nde/Nco, antisense bei StrepTagII-Nco/Nde) sind blau markiert.

StrepTagII-Nde/Nco 5' – T ATG GCT AGC TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA GGC GCC TCT TCG AAC – 3'

StrepTagII-Nco/Nde 5' – C ATG GTT CGA AGA GGCG CC TTT TTC GAA CTG CGG GTG GCT CCA GCT AGC CA – 3'

GalIP3K-31kD-5' 5' – ACT GGC GCC GCT GGA CAT ACA GGG AGT TTC AAG – 3'

**zur Konstruktion des Plasmids pSK-B benutzte Oligonukleotide**

SB7 5' – AGA TGC GCT AGC CTA GGC GAG TGG GGC ATC CTG GGA C – 3'

HsIP3K-B/5'-Ehe 5' – AAG GCG CCG CAG GAC ACG CAG GGA GTT TC – 3'

**zur Konstruktion des Plasmids pSK-C benutzte Oligonukleotide**

RP 24 – M13 revers 5' – AAC AGC TAT GAC CAT GAT TAC GCC – 3'

RnIP3K-C/5'-Ehe 5' – ACG GCG CCT CCG GAC ATG CTG GGA ACT TCC – 3'

Als Template für die PCR wurde ein in geeigneter Orientierung in den Vektor pGEM-T Easy einkloniertes RnIP3K-C-cDNA-Fragment eingesetzt.

**Sonstige Oligonukleotide**

UB40 5' – CTG AGT GAT CTC TCT AGA GAA GAA AGT TAG TTA C – 3'

## 2.1.9 Bakterienstämme und Medien

**XL1-Blue strain:** *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proAB lacI*<sup>Δ</sup>M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]

bezogen von Stratagene (#200249)

**BL21(DE3) strain:** *E. coli* B F<sup>-</sup> *dcm ompT hsdS*(rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>) *gal* (DE3)

bezogen von Stratagene (#200131)

**BL21-CodonPlus(DE3)-RIL<sup>a</sup>:** *E. coli* B F<sup>-</sup> *ompT hsdS*(rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>) *dcm+* Tet<sup>r</sup> *gal* λ (DE3) *endA Hte* [*argU ileY leuW Cam*<sup>r</sup>]

bezogen von Stratagene (#230245)

Zur Herstellung der Medien (LB-Agarplatten sowie LB-Flüssigmedium) wurden folgende Chemikalien der angegebenen Hersteller verwendet: Bacto-Pepton (Difco, #0118-15-2), Bacto-Agar (Difco, #0138-17-6), Hefeextrakt (Gibco, #20047-056), NaCl (Merck, #106404).

Nach Bedarf wurden die Medien mit folgenden Antibiotika der angegebenen Hersteller versetzt: Ampicillin (Roche Molecular Biochemicals, #835242), Kanamycin (Fluka, #60615), Chloramphenicol (Calbiochem, #220551), Tetracyclin (Roche Molecular Biochemicals, #109428).

## 2.1.10 Größenstandards für Proteine und doppelsträngige DNA

### Proteinmarker:

LMW-Marker Bio-Rad, #74177

### DNA-Marker:

Lambda-DNA *Hind* III / Φx – 174-RF DNA *Hae* III geschnitten Pharmacia

Φx – 174-RF DNA *Hae* III geschnitten Pharmacia

100 bp Leiter: 100 bp – 1500 bp NEB, #3232L

1000 bp Leiter: 0,5 kb – 10 kb NEB, #3231L

## 2.1.11 Säulenmatrizes

### Ionenaustauschchromatographie:

DEAE-Sephacel Pharmacia, 17-0709-10

Phosphocellulose P11 Whatman, 407 10 10

### Affinitätschromatographie:

Calmodulin-Sepharose Herstellung W. Fanick, AG Mayr

StrepTactin-Sepharose IBA, 2-1201-005

### 2.1.12 Verbrauchsmaterialien

Pipette, Model Reference, 1 - 10 µl	Eppendorf
Pipette, Model Reference, 10 - 100 µl	Eppendorf
Pipette, Model Reference, 100 - 1000 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen, passend für Eppendorfpipetten Reference, Volumen 1 - 1000 µl	Eppendorf
Reaktionsgefäße aus Polypropylen, Volumen 0,2 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße aus Polypropylen, Volumen 0,5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße aus Polypropylen, Volumen 1,5 ml	Greiner
Reaktionsgefäße aus Polypropylen, Volumen 2,0 ml	Eppendorf
Probenröhrchen mit Schraubverschluß aus Polypropylen, Spitzboden, steril, Füllvolumen 50 ml (Falcon Tubes)	Greiner
Küvetten, Halb-Mikro, Quarzglas-Suprasil, Typ 104-QS	Hellma
Küvetten, Halb-Mikro, Polystyrol	Greiner
Uvette 50 µl – 2000 µl	Eppendorf
Centricon YM-10	Millipore, 4206
Centricon Plus-20	Millipore, UFC2BFC08
Mikrotiterplatten Nunc-Immuno Module Maxisorb V16	Nunc, 4-69264
Sterilfilter Millex 0,22 µm	Millipore, SLGS 025 OS
Nitrocellulose Transfer Membrane 0,45 µm	Protran, 10401196
Chromatographie-Papier	Whatman, 3030917
Prepared Dialysis Membrane	Gibco BRL, 11202-033

### 2.1.13 Apparative Ausrüstung

#### Elektrophorese:

Agarose-Gel Kammer, horizontal	MWG-Biotech
SDS-Page Kammer, vertikal	Phase
Power supply Biotech EPS 200	Pharmacia
Power supply GPS 200/400	Pharmacia

#### Westernblotting:

Semi-dry-Blot-Kammer	Phase
----------------------	-------

#### Geltrockner und Zubehör:

Easy Breeze Gel Dryer	Hofer
Precut Cellophane Sheet	Pharmacia, SE1202

### **Video-Dokumentationssystem:**

Kamera: Kappa CF 8/1	FMC
Videoprinter UP-890 CE	Sony
Monitor	Panasonic
UV-Tisch (312 nm)	Bachofer

### **Zentrifugen:**

RC 5C Plus	Sorvall
Superspeed RC2-B	Sorvall
Biofuge pico	Heraeus
Biofuge fresco	Heraeus
Varifuge 3.OR	Heraeus
Rotoren zu den Sorvall-Zentrifugen: SM24, SS34, GSA	Sorvall

### **Autoklav:**

5075 ELV	Systec
----------	--------

### **Sterile Werkbank:**

Microflow Biological Safety Cabinet	MDH
-------------------------------------	-----

### **Waagen:**

PM 480 Delta range	Mettler
Analysenwaage H5C	Mettler

### **Thermomixer, Whirler:**

Thermomixer 5436	Eppendorf
Vortex Genie 2	Scientific Industries

### **pH-Meter:**

pH526	WTW
-------	-----

### **Säulen:**

Econo Column	Biorad
--------------	--------

### **Microplate Reader:**

BioKinetics Reader EL340	Bio-Tek Instruments
--------------------------	---------------------

### **Counter:**

Liquid Scintillation Counter Wallac 1409	Wallac
------------------------------------------	--------

### **Spektralphotometer:**

Lambda 20	Perkin-Elmer
-----------	--------------

### **NMR-Spektrometer:**

Bruker DRX 500 Avance Spektrometer	Bruker
------------------------------------	--------

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Mikrobiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Sterilisation von Lösungen und Geräten

Eppendorfgefäße, Glaswaren, Pipettenspitzen, Medien sowie sonstige temperaturstabile Lösungen wurden bei 121 °C und 1,2 bar für 35 min autoklaviert. Hitze labile Lösungen (z.B. Antibiotika-Stocklösungen) wurden durch 0,2 µm – Sterilfilter filtriert. Die Desinfektion von Arbeitsflächen und verwendeten Geräten erfolgte durch Besprühen mit 80 %-igem, vergälltem Ethanol. Drygalskispatel aus Glas wurden durch Eintauchen in 80%-igem, vergälltem Ethanol und anschließendem Abflammen, Platinösen durch Abflammen desinfiziert.

#### 2.2.1.2 Aufrechterhaltung und Kultivierung von *E.coli* – Stämmen

Die Bakterienstämme wurden als Glycerolstocks (Bakteriensuspension in LB /30 % Glycerol) bei – 20 °C (kurzzeitig) bzw. – 80 °C (längerfristig) gelagert. Für die in Kulturnahme der Stämme (für die Präparation transformationskompetenter Zellen, für Plasmidpräparationen oder für die rekombinante Expression von Proteinen) wurde ein Dreiösenausstrich auf geeignete Antibiotika enthaltenden LB-Agarplatten vorgenommen. Nach einer 12 – 16 stündigen Inkubationszeit (37 °C) wurde eine Einzelkolonie als Übernachtskultur angeimpft (3 ml LB-Medium unter Zusatz geeigneter Antibiotika), über Nacht bei 37 °C in einem Schüttelinkubator bei 250 rpm inkubiert und am nächsten Tag für die Animpfung der Hauptkultur verwendet. Die kurzfristige Lagerung von Bakterienklonen auf LB-Agarplatten erfolgte nach Verschließung der Platten mit Parafilm bei 4 °C für maximal 4 Wochen.

Für die Kultivierung von *E.coli* verwendete Medien:

LB-Flüssigmedium	10 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1000 ml ddH <sub>2</sub> O, pH 7,2 (Einstellung mit NaOH)
LB-Agarplatten	4 g Bacto-Trypton 2 g Hefeextrakt 6 g Bacto-Agar ad 400 ml ddH <sub>2</sub> O

Alle Medien wurden vor dem Zusatz von Antibiotika oder anderen Zusätzen (IPTG, X-gal) autoklaviert und wieder auf ca. 45 °C abgekühlt.

Tabelle 2.1: Antibiotika und andere Zusätze für Bakterienmedien: eingesetzte Konzentrationen

Antibiotikum bzw. Zusatz	zu lösen in	Konzentration Stock	Konzentration (final)
Ampicillin	ddH <sub>2</sub> O	100 mg/ml	100 µg/ml
Chloramphenicol	EtOH	34 mg/ml	34 µg/ml
Kanamycin	ddH <sub>2</sub> O	50 mg/ml	50 µg/ml
Tetracyclin	70% EtOH	12,5 mg/ml	12,5 µg/ml
IPTG	ddH <sub>2</sub> O	1 M	0,25 - 1 mM
X-gal	DMF	24 mg/ml	60 µg/ml

Tabelle 2.2: verwendete Plasmide und dafür benötigte Selektionsantibiotika und sonstige Zusätze

Plasmid basierend auf	Selektions-Antibiotikum	sonstige Zusätze
pZER0-2.1	Kanamycin	IPTG
pGEM-T Easy	Ampicillin	IPTG / X - gal
pBluescript II SK+	Ampicillin	IPTG / X - gal
pGEM-5zf, pGEM-3z	Ampicillin	IPTG / X - gal
pET-17b	Ampicillin	IPTG für Induktion

Tabelle 2.3: verwendete Host-Stämme und deren Antibiotika-Resistenz

<i>E.coli</i> Stamm	resistent gegen
XL1 blue	Tetracyclin
BL21(DE3)	-
BL21(DE3) RIL	Chloramphenicol

Bei der Verwendung von XL1 blue als Host-Stamm wurde lediglich das Selektionsantibiotikum für das betreffende Plasmid den verwendeten Medien zugesetzt, lediglich bei der Präparation kompetenter XL1-blue Zellen wurde Tetracyclin eingesetzt. Hingegen wurde bei der Verwendung von BL21(DE3) RIL als Host-Stamm allen verwendeten Medien neben dem Selektionsantibiotikum für das betreffende Plasmid stets auch Chloramphenicol zugesetzt.

### 2.2.1.3 Herstellung transformationskompetenter *E.coli*

Eine wie oben beschrieben hergestellte Vorkultur des gewünschten *E.coli* – Stammes wurde angelegt und nach einer ca. 16 stündigen Inkubation (37 °C, 250 rpm) für das Anlegen der Hauptkultur benutzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Protokolle zur Erzeugung transformationskompetenter Zellen benutzt; die Methode B erwies sich dabei als der Methode A überlegen (Transformationskompetenz der mit der Methode B erzeugten Zellen: ca.  $10^7$  Klone/ $\mu\text{g}$  DNA gegenüber ca.  $10^5$  Klone/ $\mu\text{g}$  DNA bei der Methode A). Die Bestimmung der Transformationskompetenz der Bakterien wurde dabei durch eine Kontrolltransformation (10 ng pBluescript II SK+ in ein 100  $\mu\text{l}$  Aliquot kompetenter Zellen) und anschließendes Auszählen der entstandenen Klone bestimmt.

Die Antibiotikakonzentrationen sowohl in der Vor-, als auch in der Hauptkultur betragen für XL1 blue 12,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Tetracyclin und für BL21(DE3) RIL 34  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Chloramphenicol. Der Stamm BL21(DE3) wurde ohne Antibiotikazusatz kultiviert (vgl. Tabelle 2.3).

#### Methode A

TfbII-Puffer	10 mM MOPS pH 7,0
	75 mM $\text{CaCl}_2$
	10 mM KCl
	15 % Glycerol

50 ml LB-Flüssigmedium (versetzt mit dem geeigneten Antibiotikum) wurden mit 0,5 ml Übernachtskultur inokuliert. Die Bakterien wurden sodann bei 37 °C unter starkem Schütteln (250 rpm) in einem Schüttelinkubator bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase ( $\text{OD}_{578} = 0,2$ ) inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (820 g, 5 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis unter Benutzung vorgekühlter Lösungen und Gefäße durchgeführt; das Resuspendieren der Zellen wurde stets mit großer Vorsicht unter Vermeidung starker Scherkräfte vorgenommen. Die Zellen wurden zunächst in 20 ml 50 mM  $\text{CaCl}_2$  resuspendiert, 20 Minuten auf Eis inkubiert und dann erneut abzentrifugiert (820 g, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 2 ml TfbII-Puffer aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde in 100  $\mu\text{l}$  Aliquots aufgeteilt, in flüssigen Stickstoff schockgefrostet und bis zur Benutzung bei – 80 °C gelagert.

#### Methode B

RF I	100 mM RbCl
	50 mM $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$
	30 mM K-Acetat
	10 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
	15 % Glycerol
	pH 5,8 , eingestellt mit Essigsäure

---

RFII	10 mM MOPS pH 6,8 10 mM RbCl 75 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 15 % Glycerol pH 6,8 , eingestellt mit Essigsäure
------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

50 ml LB-Flüssigmedium (versetzt mit dem geeigneten Antibiotikum) wurden mit 0,5 ml Übernachtskultur angeimpft. Die Bakterien wurden unter starkem Schütteln (250 rpm) bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 kultiviert. Die Kultur wurde zunächst für ca. 10 – 15 min auf Eis abgekühlt und dann bei 820 g für 12 – 15 min bei 4 °C abzentrifugiert; der Überstand wurde verworfen. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis unter Benutzung vorgekühlter Lösungen und Gefäße durchgeführt; auch hier war die Vermeidung von Scherkräften bei der Resuspendierung der Bakterien nach den Zentrifugationsschritten von essentieller Bedeutung. Das Zellpellet wurde zunächst in 16,7 ml RFI resuspendiert und danach erneut abzentrifugiert (820 g, 12 – 15 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, die Bakterien wurden in 4 ml RFII resuspendiert , 15 Minuten auf Eis inkubiert und in 100 µl Aliquots aufgeteilt. Diese wurden in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bis zur Benutzung bei – 80 °C gelagert.

### 2.2.1.4 Transformation von *E.coli*

Die Transformation von Plasmid-DNA bzw. Ligationsansätzen in *E.coli* wurde nach [Hana-han, 1983] durchgeführt. Für jeden durchzuführenden Transformationsansatz wurde ein 100 µl Aliquot kompetenter *E.coli* auf Eis aufgetaut. Sodann erfolgte die Zugabe des Ligationsansatzes (maximal 10 µl Volumen) bzw. der zu transformierenden Plasmid-DNA (ca. 10 – 20 ng Plasmid). Die Bakterien wurden für 30 Minuten auf Eis inkubiert und dann einem 1 minütigen Hitzeschock (42 °C) ausgesetzt. Danach wurden die gesamten Ansätze in je ein steriles 12 ml - Greinerröhrchen mit 1 ml sterilem LB-Flüssigmedium überführt und für eine Stunde unter starkem Schütteln (250 rpm) bei 37 °C inkubiert. Bei der Transformation von Plasmid-DNA wurden 50 µl dieses Ansatzes auf mit dem geeigneten Antibiotikum versetzte LB-Agarplatten aufgebracht; bei der Transformation von Ligationsansätzen wurden zunächst 200 µl des Ansatzes ausplattiert, der restliche Ansatz wurde abzentrifugiert (820 g, 8 min, RT), 700 µl des Überstandes wurden verworfen, das Pellet in den verbleibenden 200 µl resuspendiert und auf einer zweiten LB-Agarplatte ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

---

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

#### Plasmid-Minipräparation

Zur Gewinnung von Plasmidmengen von 2 µg (low copy Plasmide wie pET17b) bis 30 µg (high copy Plasmide wie pGEM-T Easy) aus Vorkulturen mit einem Volumen von 3 ml wurde entweder das Quantum Prep™ Plasmid Miniprep Kit der Firma Bio-Rad oder das Silica Spin Kit for Plasmid DNA Minipreparation der Firma Biometra verwendet. Beide Kits wurden gemäß den jeweiligen Herstellerangaben angewendet; die Elution der DNA von der Silica-Matrix erfolgte mit 100 µl ddH<sub>2</sub>O.

#### Plasmid-Midipräparation

Zur Gewinnung von Plasmidmengen bis zu 100 µg aus Kulturen mit einem Volumen von 100 ml wurde das Nucleobond AX100 Kit der Firma Macherey und Nagel gemäß den Herstellerangaben eingesetzt.

### 2.2.2.2 Fällung von DNA

#### Fällung mit Ethanol

Die DNA-Lösung wurde zunächst mit einem Zehntel Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) versetzt und gut gevortext. Nach Zugabe von 2,5 Volumen 96 % Ethanol und erneutem Whirlen wurde die Lösung entweder für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert oder für 30 Minuten bis 2 Stunden bei – 20°C gelagert (für quantitatives Ausfällen kleinerer DNA-Mengen). Nach einer 30 minütigen Zentrifugation (Eppendorf-Tischzentrifuge, 13000 rpm, 9 °C) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und 1 Volumen 70 % Ethanol zupipettiert. Ohne vorheriges Whirlen wurde erneut 5 Minuten bei 13000 rpm in der Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet für ca. 10 Minuten luftgetrocknet und dann in einem geeigneten Volumen ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Vor der Fällung sehr geringer DNA-Mengen wurde in einigen Fällen 1 µg Glycogen als Carrier zur ursprünglichen DNA-Lösung zupipettiert.

#### Fällung mit Isopropanol

Die DNA-Lösung wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt und gut gevortext. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur und eine einstündige Zentrifugation in der Eppendorf-Tischzentrifuge (10000 rpm, RT). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet luftgetrocknet und in einem Sechstel Volumen 70 % Ethanol aufgenommen. Nach er-

neutem Whirlen erfolgte eine Inkubation über Nacht bei – 20 °C. Sodann wurde erneut zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, 13000 rpm, 9 °C). Nach Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 2.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde durch photometrische Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Hierbei gilt für doppelsträngige DNA in guter Näherung:  $OD_{260} = 1 \Leftrightarrow \text{conc (DNA)} = 50 \mu\text{g/ml}$ . Zur Überprüfung der Reinheit der jeweiligen DNA-Präparation wurden desweiteren die  $OD_{230}$  (Detektion von Salz-Kontaminationen), die  $OD_{280}$  (Detektion von Protein-Kontaminationen) und die  $OD_{320}$  (Detektion von Ethanol-Kontaminationen) gemessen. Eine DNA-Probe ausreichender Reinheit sollte folgende Absorptionswerte zeigen:

$OD_{260} / OD_{280} \geq 1,8$  ;  $OD_{230} / OD_{260} \leq 1,3$  ;  $OD_{320} \leq 0,005$  bei einer 1:50 –Verdünnung

### 2.2.2.4 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA (i.a. Plasmid-DNA) erfolgte nach der Didesoxy-Methode (modifiziert nach [Sanger et al., 1977]) unter Verwendung des Big Dye Terminator Sequencing Kits (Applied Biosystems) und des Taq Polymerase Puffers Half-Term (GEN-PAK). Es wurden i.a. vektorspezifische Primer (NP24, RP24 für Klonierungs-, T7-Promotor / T7 - Terminator-Primer für pET-basierte Expressionsvektoren) anstelle von gen-(insert)-spezifischen Primern benutzt, um das jeweilige Insert im gesamten Sequenzbereich überprüfen zu können. Ansätze (Gesamtvolumen 20 µl) wurden in 200 µl - Eppendorftubes wie folgt zusammenpipettiert :

250 - 500 ng Plasmid-DNA  
15 pmol Primer  
3 µl Big Dye  
5 µl Half Term  
ad 20 µl ddH<sub>2</sub>O

Die Sequenzierreaktion wurde sodann in einem Eppendorf Mastercycler Gradient gemäß folgendem Programm durchgeführt:

1	Denaturierung	10 sec	96 °C
2	Annealing	5 sec	50 °C
3	Elongation	4 min	60 °C

Wiederholung der Schritte 1 bis 3 : 25 mal

Im Anschluß an die Sequenzierreaktion wurde der gesamte Ansatz in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt und durch Ethanol-Fällung gereinigt: Nach Zugabe von 40 µl 96 % Ethanol und 5 sec starkem Vortexen wurde der Ansatz 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann für 35 Minuten in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert (13000 rpm, RT). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet einmal mit 60 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (Eppendorf-Tischzentrifuge, 13000 rpm, 15 min, RT) wurde der Überstand erneut vorsichtig abpipettiert und das Pellet für ca. 15 Minuten luftgetrocknet. Die so gefällte DNA wurde im Service-Labor des Instituts für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie, UKE abgegeben, wo die weitere Probenvorbereitung, die Polyacrylamid-Gelelektrophorese sowie die Detektion der vier unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Terminatoren mit Hilfe eines Applied Biosystems 373A Sequencer vom Service-Personal durchgeführt wurde.

### 2.2.2.5 Hydrolytische DNA-Spaltungen mit Restriktionsendonucleasen

Sowohl analytische als auch präparative Restriktionsverdauungen wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl unter Verwendung der vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen und Temperaturen durchgeführt (Inkubationszeit 45 Minuten – 2 Stunden). Für analytische Verdauungen wurden DNA-Mengen von 200 ng – 500 ng eingesetzt, präparative Verdauungen wurden mit 500 ng – 2000 ng DNA durchgeführt. Pro µg DNA wurden 2 – 10 U Enzym eingesetzt.

### 2.2.2.6 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

1 x TAE – Puffer	40 mM Tris-Acetat pH 8,3 2 mM EDTA
x % TAE-Agarosegel	x % Agarose/NuSieve Agarose gelöst in 1 x TAE
6 x Auftragspuffer	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol 15 % Ficoll 400
DNA-Standards	100 bp Leiter (NEB #3232L) : 100 bp – 1500 bp 1000 bp Leiter (NEB #3231L): 0,5 kb – 10 kb Φx – 174-RF DNA <i>Hae</i> III geschnitten (Pharmacia) Lambda-DNA <i>Hind</i> III / Φx – 174-RF DNA <i>Hae</i> III geschnitten (Pharmacia)

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in horizontalen Gelelektrophoresekammern. In Abhängigkeit von der Größe der zu trennenden Fragmente wurden 0,75 % (für Fragmente > 1kb), 1 % (für Fragmente zwischen 0,5 kb und 1 kb), 1,5 %- 2 % (für Fragmente zwischen 200 bp und 500 bp) bzw. 4 % (NuSieve Agarose, für Fragmente < 200 bp) Agarosegele verwendet. Vor dem Auftrag auf das Gel wurden alle Proben mit 1/5 Volumen 6 x Auftragspuffer versetzt; pro Gel wurde mindestens eine Lane mit 500 ng eines geeigneten DNA-Längensstandards belegt. Die Gele enthielten Ethidiumbromid (Finalkonzentration 0,2 µg/ml), die Banden konnten somit direkt im Anschluß an den Gellauf im UV-Durchlicht sichtbar gemacht und gegebenenfalls zur weiteren Bearbeitung ausgeschnitten werden. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 5 – 10 V /cm Gellänge für 0,5 – 2 h.

### 2.2.2.7 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde das QUIAEX II Gel Extraction Kit der Firma Quiagen gemäß den Angaben des Herstellers benutzt. Die Elution der Fragmente erfolgte mit 20 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,5.

### 2.2.2.8 PCR-Techniken

10 x <i>Taq</i> – Puffer	100 mM Tris/HCl pH 7,8 50 mM KCl 100 µg/ml Gelatine
10 x <i>Pfu</i> – Puffer	200 mM Tris/HCl pH 8,8 (bei 25 °C) 100 mM KCl 100 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 20 mM MgSO <sub>4</sub> 1 % Triton X-100 1 mg/ml BSA

Analytische PCRs wurden stets mit *Taq*-Polymerase durchgeführt; präparative Ansätze enthielten bis auf wenige Ausnahmen ausschließlich *Pfu* – Polymerase. Alle in präparativen Ansätzen erzeugten PCR-Produkte wurden nach der Klonierung in geeignete Vektoren (z.B. pGEM-T Easy) komplett durchsequenziert, um das PCR-bedingte Auftreten von (second site) Mutationen in den resultierenden Klonen ausschließen zu können.

### 2.2.2.8.1 PCR mit Plasmid-DNA als Template

Zur Erzeugung spezifischer Amplifikate unter Benutzung von Plasmid-DNA als Template wurden Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 20 µl (analytische PCR) bzw. 100 µl (präparative PCR) in 200 µl - bzw. 500 µl - Eppendorf-Tubes zusammenpipettiert. Die Finalkonzentrationen bzw. Mengen wurden wie folgt eingestellt:

analytische PCR-Ansätze mit *Taq*-Polymerase: 1 x *Taq*-Puffer  
 2 mM MgCl<sub>2</sub>  
 10 ng Plasmid-DNA  
 0,4 µM upstream Primer  
 0,4 µM downstream Primer  
 200 µM dNTPs  
 0,5 U *Taq*-Polymerase

präparative PCR-Ansätze mit *Pfu*-Polymerase : 1 x *Pfu*-Puffer  
 10 ng Plasmid-DNA  
 0,4 – 0,5 µM upstream Primer  
 0,4 – 0,5 µM downstream Primer  
 200 µM dNTPs  
 2,4 U *Pfu*-Polymerase

Die PCR-Reaktionen wurden sodann entweder in einem Eppendorf Mastercycler Gradient oder in einem TRIO-Thermoblock von Biometra gemäß folgendem Programm unter Anwendung eines Hotstarts durchgeführt. Die Temperatur des Heizdeckels betrug während der gesamten Reaktion 95 °C.

25 – 30 x	1	initiale Denaturierung	95 °C	2 min
	2	Denaturierung	95 °C	30 sec – 1 min
	3	Annealing	50 °C - 65 °C	30 sec – 1 min
	4	Elongation	72 °C	1 min – 2,5 min
	5	terminale Elongation	72 °C	5 min

Die Annealing-Temperatur wurde unter Berücksichtigung der approximativ berechneten Schmelztemperaturen der in der jeweiligen Reaktion eingesetzten Primer festgelegt und zum Teil auch durch die Ausnutzung der Gradientenfunktion des Eppendorf Mastercycler Gradient experimentell optimiert; die Wahl der Länge der Elongationszeit richtete sich nach der Größe des zu erwartenden Amplifikates (Faustregel: 2 min / 1 kb des zu erwartenden Amplifikates).

### 2.2.2.8.2 PCR zum Screening von E.coli – Klonen

1 x TE      10 mM Tris/HCl pH 8,0  
               1 mM EDTA

Zum schnellen und einfachen Screening einer großen Anzahl von Bakterienklonen auf rekombinante Plasmide ohne die vorherige Durchführung einer Plasmid-Minipräparation wurde das Verfahren des PCR-Screenings angewandt. Hierzu wurde in jede zu untersuchende Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher eingestochen, die Bakterien dann durch leichtes Einstechen mit dem Zahnstocher in eine frische, sterile LB-Agarplatte auf selbige übertragen („Masterplate“) und schließlich durch Rühren mit dem bakterientragenden Zahnstocher in einem sterilen Eppendorf-Tube mit 50 µl sterilem TE-Puffer eine stark verdünnte Bakteriensuspension hergestellt. Diese Suspension wurde dann direkt als PCR-Template eingesetzt. Die Ansätze (Gesamtvolumen 20 µl) wurden in 200 µl – Eppendorf-Tubes wie folgt zusammenpipettiert :

1 µl Template (Bakteriensuspension)  
 1 x *Taq* - Puffer  
 0,5 µM upstream Primer  
 0,5 µM downstream Primer  
 1 mM MgCl<sub>2</sub>  
 200 µM dNTPs  
 0,5 U *Taq* – Polymerase

Die Durchführung der PCR-Reaktion erfolgte entweder in einem Eppendorf Mastercycler Gradient oder in einem TRIO-Thermoblock von Biometra gemäß folgendem Programm:

	1	initiale Denaturierung	95 °C	2 min
30 x	2	Denaturierung	95 °C	1 min
	3	Annealing	50 °C	1 min
	4	Elongation	72 °C	1,5 min
	5	terminale Elongation	72 °C	5 min

Die Ansätze wurden entweder sofort vollständig auf ein analytisches TAE-Agarosegel aufgetragen oder zunächst in zwei Hälften geteilt, die eine Hälfte einem analytischen Restriktionsverdau unterzogen und dann auf dem Gel analysiert. Die zuvor angelegte Masterplate konnte nun zum Animpfen von Vorkulturen von positiven Klonen für spätere Plasmid-Minipräparation genutzt werden.

### 2.2.2.8.3 PCR-Mutagenese

Die gezielte Mutagenese von IP3K-cDNAs wurde entweder gemäß der von Picard et al. beschriebenen Methode oder gemäß dem QuikChange – Protokoll der Firma Stratagene vorgenommen. Die benötigten Mutagenese-Primer wurden für beide Anwendungen so designt, daß sowohl der gewünschte Aminosäureaustausch auf cDNA-Ebene realisiert wurde als auch i.a. durch die Einführung von silent mutations entweder neue Schnittstellen für Restriktionsenzyme eingeführt oder vorhandene Schnittstellen eliminiert wurden. Diese wurden dann zur Unterscheidung von mutierten und nichtmutierten Konstrukten durch Restriktionsverdau genutzt. Desweiteren wurde bei der Konstruktion der Primer darauf geachtet, dass sich sowohl am 3' als auch am 5'-Ende mindestens zehn Basen umfassende, perfekt primende Sequenzbereiche befanden, zum einen um eine effiziente Verlängerung des Mutageneseprimers (Schritt 1, s.u.) bzw. des Megaprimers (Schritt 2, s.u.) zu gewährleisten, zum anderen um sowohl den Mutageneseprimer als auch den Megaprimer vor der 3' – 5' – proof-reading-Exonucleaseaktivität der für die Reaktion eingesetzten *Pfu*-Polymerase zu schützen.

#### 2.2.2.8.3.1 Megaprimer-PCR-Mutagenese nach [Picard et al., 1994]

In einem 500 µl Eppendorf-Tube wurden zusammenpipettiert (Endvolumen 100 µl):

1 x *Pfu* – Puffer  
 10 ng Template-DNA  
 0,1 µM Mutagenese-Primer  
 0,1 µM Flanking Primer 1  
 200 µM dNTPs  
 2,5 U *Pfu* - Polymerase

Dieser Ansatz wurde folgendem Cycling-Protokoll (in einem Eppendorf Mastercycler Gradient oder einem TRIO-Thermoblock von Biometra) unterzogen:

1	10 x	1	initiale Denaturierung	95 °C	2 min
		2	Denaturierung	94 °C	1 min
		3	Annealing	50 °C	1 min
		4	Elongation	72 °C	1,5 min

Zugabe von Flanking Primer 2 (Finalkonzentration 0,4 µM)

<b>2</b>	10 x	→	2	Denaturierung	94 °C	1 min
		↙	3	Annealing	50 °C	1 min
		↘	4	Elongation	72 °C	1,5 min

Zugabe von Flanking Primer 1 (Finalkonzentration 0,4 µM)

<b>3</b>	10 x	→	2	Denaturierung	94 °C	1 min
		↙	3	Annealing	50 °C	1 min
		↘	4	Elongation	72 °C	1,5 min
			5	terminale Elongation	72 °C	5 min

Als Template DNA wurden den zu mutierenden IP3K cDNA-Bereich beinhaltende Plasmide (pET-17b-GIK, pBluescript-IP3K-UB24/40, pGEM3z – IP3K-Xba/Sph, pET-17b-SiS6) eingesetzt; die Flanking Primer (vektorspezifisch die multiple cloning site flankierend oder genspezifisch) wurden so gewählt, dass der entstehende Megaprimer nicht länger als 300 bp, das entstehende PCR-Produkt nicht länger als 700 bp war. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden auf Agarosegelen analysiert, direkt aus dem PCR-Ansatz gereinigt, in geeignete Vektoren zwischenkloniert und sequenziert. Sodann erfolgte die Umklonierung in den entsprechenden prokaryotischen Expressionsvektor, die Transformation in den gewählten *E.coli* Expressionsstamm und die Expression der rekombinanten Mutanten-Proteine.

Die folgende Abbildung 2.2 verdeutlicht die angewandte Mutagenesestrategie.

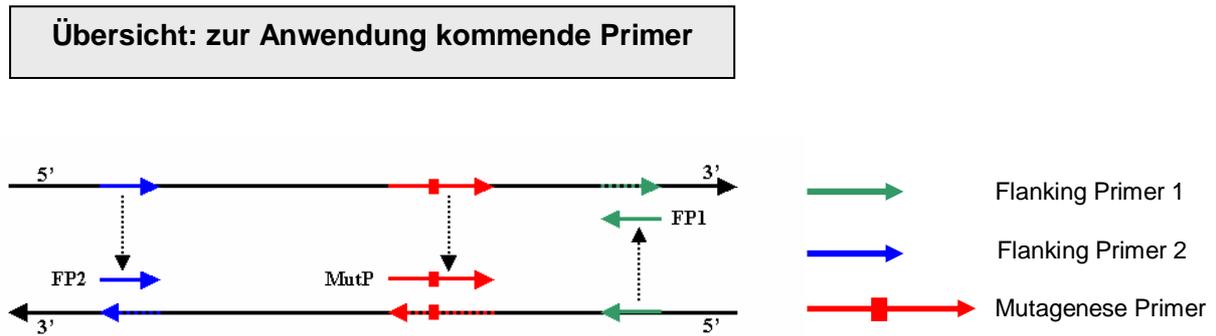
Legende zu Abbildung 2.2:

Primer bzw. Primersequenzen auf dem Template wurden durch durchgezogene Pfeile dargestellt (Pfeilspitze entspricht 3' – Ende); Primer-komplementäre Sequenzen auf dem Template wurden durch gestrichelte Pfeile angedeutet. Die im Mutageneseprimer enthaltene einzuführende Mutation wurde durch ein rotes Kästchen gekennzeichnet.

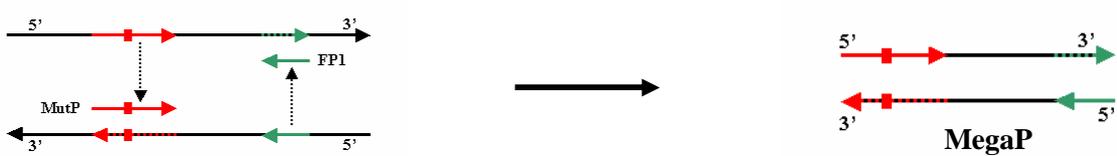
1. In den ersten zehn Zyklen der PCR-Reaktion werden geringe Mengen des Flanking Primers 1 sowie des Mutagenese-Primers benutzt, um den die gewünschte(n) Mutation(en) tragenden Megaprimer zu synthetisieren. Bei optimalem Verlauf sollten nach Ablauf der Reaktion nur noch wenige nicht in Megaprimer eingebaute Primer (FP1, Mutagenese Primer) im Reaktionsansatz vorliegen.

2. Nach Zugabe des Flanking Primers 2 werden weitere zehn Zyklen der PCR-Reaktion vollzogen. Hierbei dient ein Strang des im Schritt 1 synthetisierten Megaprimers als Gegenprimer für den neu hinzugekommenen Flanking Primer 2, so dass nun das gewünschte (mutierte) durch die flankierenden Primer 1 und 2 definierte PCR-Produkt entsteht. Zu beachten ist jedoch, dass im Schritt 1 nicht in Megaprimer eingebaute FP1-Primer ebenfalls als Gegenprimer für FP2 auf dem (nicht die Mutation tragenden) wt-Template dienen können, so dass es im Verlauf des Schrittes 2 auch zur Synthese von PCR-Produkten der richtigen Länge, die jedoch dem wt-Template entsprechen, kommen kann (in der Abbildung 2.2 ist diese Nebenreaktion nicht dargestellt).
3. Vor Durchführung der letzten zehn Zyklen der PCR-Reaktion wird noch einmal FP1 zupipettiert. Mit der restlichen, in Schritt 2 nicht verbrauchten Menge von FP2 als Gegenprimer werden noch einmal alle zu diesem Zeitpunkt im Reaktionsansatz vorhandenen potentiellen Templates (wt sowie mutiert) im Bereich zwischen FP1 und FP2 amplifiziert (in der Abbildung 2.2 nur für das mutierte Template dargestellt). Bei ausreichend effizientem Ablauf der Schritte 1 und 2 sollte jedoch der mutierte Sequenzabschnitt im Reaktionsansatz in wesentlich größeren Mengen vorliegen als das entsprechende wt-Template, so dass nach Ablauf der insgesamt 30 Zyklen langen PCR-Reaktion ca. 60 – 90 % des entstandenen, doppelsträngigen Amplifikates die gewünschte(n) Mutation(en) tragen.

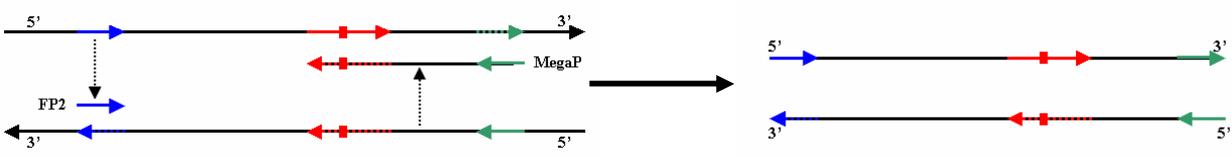
Abbildung 2.2: zielgerichtete Mutagenese nach [Picard et al., 1994]



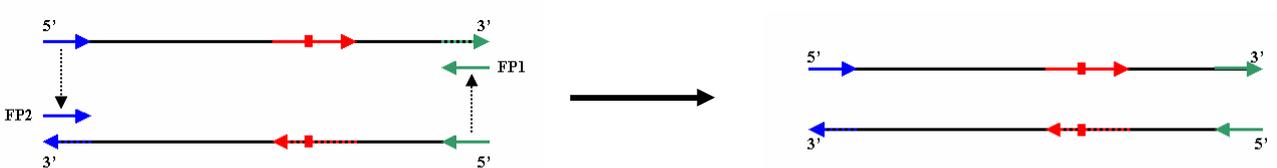
**1 Synthese des Megaprimers ( Primer: Mutageneseprimer + Flanking Primer 1 )**



**2 Synthese des PCR – Produktes ( Primer: Megaprimers + Flanking Primer 2 )**



**3 Synthese des PCR – Produktes ( Primer: Flanking Primer 1 + Flanking Primer 2 )**



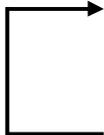
### 2.2.2.8.3.2 QuikChange PCR-Mutagenese

Im Gegensatz zur oben beschriebenen PCR-Mutagenese nach [Picard et al., 1994] erfordert das von der Firma Stratagene entwickelte QuikChange – Protokoll keine Aufreinigung und Zwischenklonierung von mutierten PCR-Produkten, vielmehr wird der gesamte Vektor in einer PCR-Reaktion unter Verwendung von die gewünschten Mutationen tragenden Mutageneseprimern als Ganzes amplifiziert und dann direkt in einen geeigneten *E.coli* – Stamm transformiert. Die Selektionierung auf mutagenisierte Vektoren gegenüber wt – Vektoren erfolgt bereits vor der Transformation über die Verwendung eines methylierungssensitiven Restriktionsenzym (Dpn I).

Zur direkten Mutagenisierung prokaryotischer Expressionsvektoren wurden in einem 500 µl Eppendorf-Tube zusammenpipettiert (Gesamtvolumen 50 µl):

- 1 x *Pfu* – Puffer
- 10 - 40 ng Plasmid-DNA
- 0,3 µM Mutageneseprimer-sense
- 0,3 µM Mutageneseprimer-antisense
- 250 µM dNTPs
- 2,5 U *Pfu* - Polymerase

In einem Eppendorf Mastercycler Gradient wurde unter Anwendung eines Hot-Starts folgendes Cycling-Protokoll durchgeführt:

	1	initiale Denaturierung	95 °C	30 sec	
16 x		2	Denaturierung	94 °C	30 sec
		3	Annealing	55 °C	1 min
		4	Elongation	68 °C	2 min/kb Plasmidlänge

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurde der Reaktionsansatz 2 Minuten auf Eis gehalten um eine Abkühlung auf eine Temperatur  $\leq 37$  °C zu bewirken. Sodann wurden 10 U des Restriktionsenzym *Dpn* I zugegeben und der Ansatz bei 37 °C für 1h inkubiert.

*Dpn* I besitzt die (palindromische) Erkennungssequenz 5' – GA<sub>meth</sub>TC – 3' und schneidet somit nur entsprechend (hemi)methylierte DNA (z.B. aus *dam*<sup>+</sup> *E.coli* – Stämmen wie XL1 blue isolierte Plasmide); aufgrund der kurzen Erkennungssequenz zeigt die Schnittstelle sehr

hohe Abundanz in allen üblichen Klonierungs- und Expressionsvektoren. Während der einstündigen Inkubation des Reaktionsansatzes mit *Dpn* I wird somit die (i.a. durch Plasmid-Minipräparation aus *dam*-positiven *E.coli* gewonnene) wt-Template-DNA quantitativ hydrolysiert, während die neu synthetisierten, mutierten Plasmide aufgrund der fehlenden Methylierung intakt bleiben.

1 µl des so behandelten Ansatzes wurde daraufhin in transformationskompetente *E.coli* (XL1 blue) transformiert. Die in den entstandenen Bakterienkolonien enthaltenen Plasmide wurden mittels Plasmid-Minipräparation isoliert und unter Verwendung geeigneter analytischer Restriktionsverdau auf den Gehalt von mutierten Inserts getestet. Da bei Anwendung des QuikChange-Protokolls das gesamte Plasmid mittels PCR amplifiziert wird, wurde zur Detektion eventuell aufgetretener second site mutations stets der gesamte codierende Bereich der mutierten cDNA sequenziert. Derart getestete Vektoren wurden sodann in den jeweils gewählten *E.coli* Expressionsstamm transformiert und die entsprechend codierten Mutanten-Proteine zur Expression gebracht.

Die folgende Abbildung verdeutlicht die durch das QuikChange-Protokoll realisierte Mutagenesestrategie.

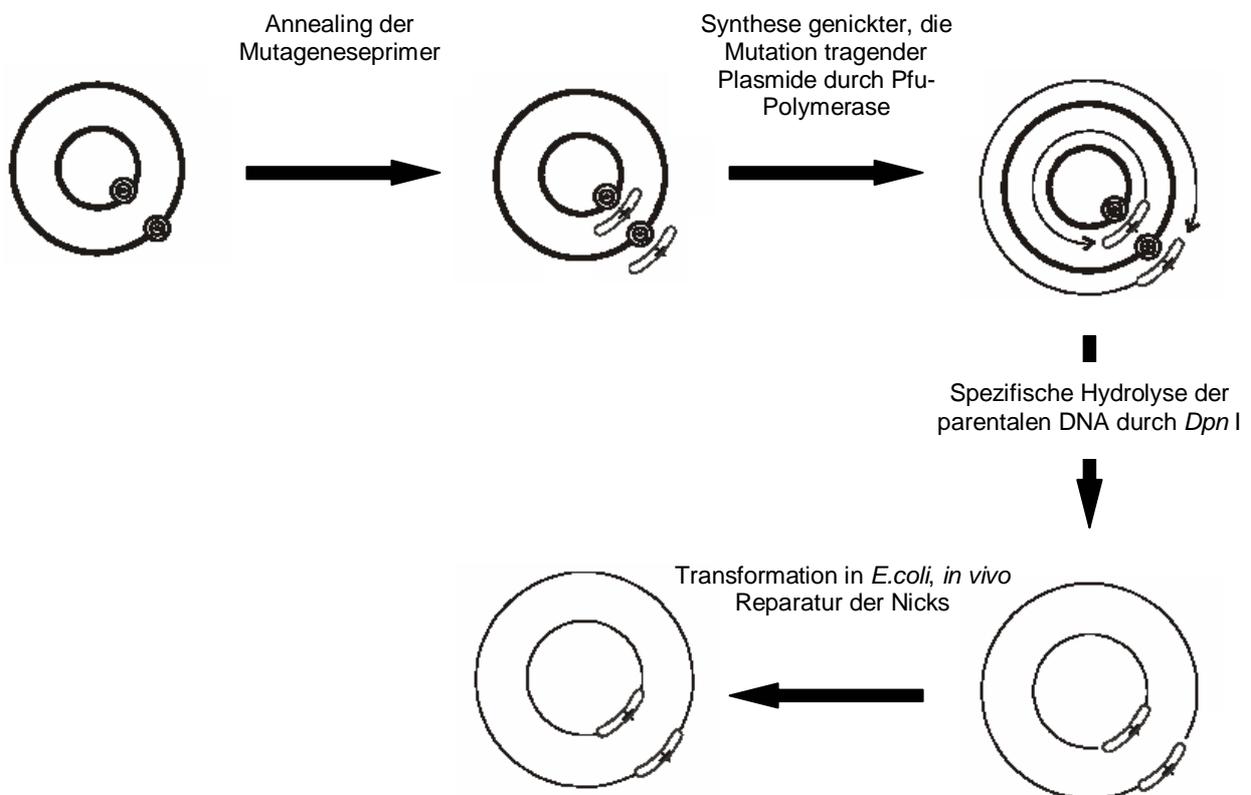


Abbildung 2.3: zielgerichtete Mutagenese gemäß dem QuikChange – Protokoll (nach: QuikChange™ Site-directed mutagenesis kit; Stratagene Instruction Manual)

### 2.2.2.9 Direkte Aufreinigung von PCR-Produkten aus dem Reaktionsansatz

Zur direkten Aufreinigung von PCR-Produkten aus dem Reaktionsansatz (ohne vorherige Auftrennung auf einem Agarosegel) wurde das Nucleo-Spin-Extract-Kit von Macherey & Nagel benutzt. Die Elution erfolgte mit 50 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,5.

### 2.2.2.10 A-Tailing von PCR-Produkten zur Klonierung in pGEM-T Easy

Zur Zwischenklonierung von PCR-Produkten wurde häufig der Vektor pGEM-T Easy verwendet. Diese Klonierung erfordert keine speziellen Restriktionsschnittstellen von seiten des Amplifikates; vielmehr ist nur ein einzelnes, 3'- überhängendes Desoxyadenosin für die effiziente Ligation von PCR-Produkten in das Plasmid notwendig. Während mit *Taq* – Polymerase erzeugte Amplifikate direkt ohne weitere Behandlung in die Ligation eingesetzt werden konnten, da die *Taq* - Polymerase template-unabhängig 3'- Desoxyadenosin-Überhänge erzeugt, mußten mit *Pfu* – Polymerase amplifizierte (blunt end - ) Produkte nach geeigneter Aufreinigung (direkt aus dem PCR-Ansatz oder über eine Gelextraktion) zunächst gemäß folgendem Protokoll behandelt werden (Endvolumen 10 µl):

In einem 0,5 ml Eppendorf-Tube wurden zusammenpipettiert:

- 2 µl gereinigtes PCR – Produkt
- 1 x *Taq* - Polymerase-Puffer
- 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 200 µM dATP
- 5 U *Taq* - Polymerase

Dieser Ansatz wurde dann in einem TRIO-Thermoblock von Biometra (mit Heizdeckel) für 30' bei 70 °C inkubiert: Nach Abkühlung der Reaktion auf Raumtemperatur wurden 1 – 2 µl ohne weitere Reinigung direkt für die Ligasereaktion eingesetzt.

### 2.2.2.11 Ligation von DNA mit T4 - DNA – Ligase

- 5 x Ligationspuffer
- 250 mM Tris-HCl pH 7,8
- 50 mM MgCl<sub>2</sub>
- 50 mM DTT
- 5 mM ATP
- 125 µg/ml BSA

Ligationsreaktionen wurden meist in einem Gesamtvolumen von 10 µl durchgeführt:

50 ng Vektor-DNA  
x ng Insert-DNA  
2 µl 5 x Ligationspuffer  
1 µl T4-DNA-Ligase (1U/µl)  
ad 10 µl ddH<sub>2</sub>O

Die einzusetzende Insertmenge in ng richtete sich nach der jeweiligen Anzahl bp von Vektor und Insert und wurde so gewählt, dass ein dreifacher molarer Überschuß an Insert im Reaktionsansatz vorlag. Die Ansätze wurden entweder für 3 h bei RT (sticky-end-Ligationen) oder bei 16 °C über Nacht (blunt und semi-blunt-end-Ligationen) inkubiert.

### **2.2.3 Proteinbiochemische Methoden**

#### **2.2.3.1 Einfache Analysemethoden für Proteinlösungen**

##### **2.2.3.1.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen**

Zur Quantifizierung von Proteinkonzentrationen wurde in einer Mikrotiterplatte zunächst eine Eichreihe (BSA in den Mengen 0 µg, 0,5 µg, 1 µg, 1,5 µg, 2 µg, 2,5 µg, 3 µg, 4 µg, 5 µg in einem Endvolumen von 100 µl) angelegt und die zu analysierenden Proben in geeigneten Mengen/Verdünnungen in die vorgesehenen Wells pipettiert (ad 100 µl ddH<sub>2</sub>O; für präzise Messungen als Doppel- bzw. Dreifachbestimmung). Bei Triton-haltigen Proben wurde die Triton-Konzentration in allen Wells auf denselben Wert eingestellt, um systematische Meßfehler durch die Störung des Assays durch Triton zu vermeiden. Nach Zugabe von 100 µl Pierce Bradford Reagenz zu jedem Well wurde die Platte 10 – 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann die Absorption bei 578 nm in einem Microplate-Reader ausgelesen. Die Auswertung der Meßdaten (Regression der Eichreihe-Werte-Paare, Berechnung der Proteinmengen und -konzentrationen in den Proben) erfolgte mithilfe des Programms Microsoft Excel.

### 2.2.3.1.2 Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

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 % $\beta$ -Mercaptoethanol 0,04 % Bromphenol-blau 16 % Glycerol
Proteinmarker (low molecular weight, Bio-Rad, #74177)	
	Phosphorylase B            107 kD
	Rinderserumalbumin        76 kD
	Ovalbumin                    52 kD
	Carboanhydrase            36,8 kD
	Trypsininhibitor            27,2 kD
	Lysozym                      19,0 kD
1 x Laemmli-Laufpuffer	0,025 M Tris 0,192 M Glycin 0,1 % SDS

Für die analytische Trennung von Proteinen gemäß ihrem Molekulargewicht wurde die Standard-Methode ([Laemmli, 1970], [Ornstein, 1964]) für diskontinuierliche Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen angewandt. Alle Gele waren 13,5 cm breit, 6 cm lang und 0,1 cm dick; die Elektrophorese erfolgte in vertikalen Gelelektrophoresekammern der Firma Phase.

Die Polymerisation wurde durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat (Endkonzentration 0,05 %) initiiert. Nach abgeschlossener Polymerisation des Trenngels (ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur) wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Kamm zur Erzeugung von 21 Taschen (maximales Füllvolumen 40 µl) eingesetzt. Nach abgeschlossener Polymerisation des Sammelgels (ca. 20 Minuten bei Raumtemperatur) wurde das Gel in eine vertikale Elektrophoresekammer eingespannt, beide Puffertanks wurden mit 1 x Laemmli-Laufpuffer befüllt und der Kamm herausgezogen. Daraufhin wurden die Taschen mit 1 x Laemmli-Laufpuffer von eventuellen Gelresten freigespült und eventuelle Luftblasen am unteren Rand des Geles entfernt.

Aliquots der zu analysierenden Proteinproben wurden im Verhältnis 3:1 mit 4 x Probenpuffer verdünnt, 5 bis 8 Minuten bei 95 °C gekocht und kurz zentrifugiert. Als Molekulargewichtsstandard wurde auf jedem Gel mindestens eine Lane mit analog behandeltem low molecular weight Proteinmarker (1,2 µg/Protein für Coomassie-gefärbte Gele und Ponceau-gefärbte Blots, 0,12 µg/Protein für Silber-gefärbte Gele) beschickt.

Pellets von gefällttem Protein und Bakterienpellets wurden zunächst in geeigneten Solubilisierungspuffern resuspendiert (siehe Kapitel 2.2.4.3 und 2.2.3.2.1) und dann wie oben beschrieben mit Probenpuffer verdünnt.

Der Auftrag der Proben (Endvolumen 12 µl – 32 µl) erfolgte mit Hilfe einer Hamiltonspritze; die Elektrophorese wurde bis zum Eintritt der Farbstofffront in das Trenngel bei 95 – 100 V, danach bei 120 – 150 V durchgeführt. Der Gellauf wurde bei Erreichen der unteren Trenngelkante durch die Bromphenolblau-Front beendet.

### **2.2.3.1.3 Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Brilliant-Blue**

Coomassie-Färbelösung	0,5 % Coomassie brilliant blue 9 % Essigsäure 45,25 % Methanol 45,2 % ddH <sub>2</sub> O
Coomassie-Entfärber	8 % Essigsäure 25 % Ethanol 67 % ddH <sub>2</sub> O

Die Gele wurden bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken in 50 ml Coomassie-Färbelösung für 20 Minuten gefärbt, kurz mit Wasser abgespült und dann in 50 ml Coomassie-Entfärbler für 2 h (unter Zugabe von Dowex) – 12 h (ohne Dowex) entfärbt. Die untere Detektionsgrenze dieser Färbemethode beträgt ca. 100 ng Protein/Bande.

### 2.2.3.1.4 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Fixierlösung	30 % Ethanol 10 % Essigsäure 60 % ddH <sub>2</sub> O
Oxidationslösung	0,5 M Na-Acetat 30 % Ethanol 0,5 % Glutardialdehyd 0,3 % Na-Thiosulfat
Silbernitratlösung	0,1 % AgNO <sub>3</sub> 0,02 % Formaldehyd
Entwickler	2,5 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,01 % Formaldehyd

Die Gele wurden 30 Minuten lang in 50 ml Fixierlösung, dann weitere 30 Minuten in Oxidationslösung geschwenkt. Bei diesen und allen nachfolgenden Schritten wurde darauf geachtet, das Gel möglichst nicht zu berühren; insbesondere erfolgte die Entfernung von Lösungen stets unter Verwendung einer an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Pasteurpipette. Nach einem Waschschrift (4 x 5 Minuten in ddH<sub>2</sub>O) wurden die Gele in 50 ml Silbernitratlösung eingebracht und unter leichtem Schwenken für 15 Minuten darin belassen. Danach wurden die Gele kurz mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und sodann in 50 ml Entwickler eingelegt. Nach Ablauf der Farbentwicklung (ca. 2 – 5 min) wurde die Färbung durch Überführung der Gele in Fixierlösung und anschließendes Spülen mit ddH<sub>2</sub>O abgestoppt. Die untere Detektionsgrenze dieser Färbemethode beträgt ca. 10 ng Protein/Bande.

### 2.2.3.1.5 Dokumentation und Lagerung von Coomassie- und Silbergefärbten SDS – Polyacrylamid-Gelen

Gefärbte SDS-Polyacrylamidgele wurden entweder (für kurzzeitige Aufbewahrung) in 10 % Essigsäure gelagert oder (für längerfristige Konservierung) für 2 Stunden in 35 % Ethanol eingelegt und dann in Plastikfolie eingeschweißt. Für weitere Dokumentation und Bearbeitung von Gelen (z.B. Einscannen von Gelen und densitometrische Bestimmung von Proteinmengen) wurde ein Computer-unterstütztes Photodokumentationssystem verwendet.

### 2.2.3.1.6 Immunoblotting (Western Blotting und Immunprinting) von SDS-Polyacrylamidgelen

Die Detektion geringer Mengen von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase bzw. von rekombinant hergestellter Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase in bakteriellen Rohlysaten und nur partiell gereinigten Fraktionen wurde mittels Immunoblotting-Techniken realisiert.

#### Semi-Dry-Blotting

Kathodenpuffer	25 mM Tris 40 mM 6-Aminocaprinsäure 20 % Methanol
Anodenpuffer I	25 mM Tris 20 % Methanol
Anodenpuffer II	300 mM Tris 20 % Methanol
Ponceau Lösung	0,2 % Ponceau-S 3 % Essigsäure

Nach Auftrennung der Proteinproben mittels SDS-PAGE wurden die Proteine gemäß folgendem Protokoll auf eine Nitrocellulosemembran übertragen: Drei auf Gelgröße zugeschnittene, in Kathodenpuffer getränkte Whatman-Filterpapierstücke wurden auf der Kathode einer Semi-Dry-Blotkammer platziert. Das Gel wurde kurz in Kathodenpuffer eingelegt und auf den vorbereiteten Filterpapierstapel gelegt; darauf wurde vorsichtig die ebenfalls auf Gelgröße zurechtgeschnittene, zuvor in Anodenpuffer I eingelegte Nitrocellulosemembran zurechtgelegt. Der Transfer-Filterstapel wurde sodann durch das Auflegen von drei Anodenpuffer I – und drei Anodenpuffer II – getränkten Whatman-Filterpapierstücken fertiggestellt. Nachdem alle sich eventuell zwischen den Filterpapieren befindenden Luftblasen durch vorsichtiges Rollen mit einer 10 ml Glaspipette entfernt wurden, wurde die Blotkammer durch Auflegen der Anode geschlossen. Der Transfer wurde bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA / cm<sup>2</sup> Gelfläche für 1 Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt. Zur Überprüfung des Transfers sowie zur Visualisierung der Markerbanden wurde die Membran dann für 5 Minuten in Ponceau-Lösung eingelegt, überschüssige Farbreste wurden mit ddH<sub>2</sub>O abgespült und die Membran bis zur weiteren Verwendung auf Whatman-Filterpapier dunkel gelagert.

---

**Immunprinting**

1 x TBS	50 mM Tris/HCl pH 7,5 150 mM NaCl
1 x TTBS	50 mM Tris/HCl pH 7.5 150 mM NaCl 0,06 % Tween 20
Blockierlösung	3 % BSA in TBS
Inkubationslösung	0,3 % BSA in TTBS
Alkalische Phosphatase-Puffer	100 mM Tris/HCl pH 9,5 5 mM MgCl <sub>2</sub> 100 mM NaCl
BCIP-Lösung	5 % BCIP in 100 % DMF
NBT-Lösung	7,7 % NBT in 100 % DMF

Die Ponceau-gefärbten Membranen wurden zunächst 30 Minuten lang in 50 ml Blockierlösung geschwenkt, dann in 10 ml einer geeigneten Antikörperverdünnung (1:2000 – 1:10000 in Inkubationslösung, in Abhängigkeit vom verwendeten Antikörper und der erforderlichen Sensitivität) überführt und über Nacht bei 4 °C – 10 °C unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach einem Waschschrift (3 x 5 Minuten in je 50 ml AK-Inkubationslösung) wurden die Membranen in 10 ml einer 1:2000- Verdünnung des sekundären Antikörpers (anti-mouse alkaline phosphatase conjugated IgG from goat in AK-Inkubationslösung) eingelegt und darin eine Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert. Danach erfolgte ein erneuter Waschschrift (3 x 2 min in 50 ml TTBS). Die Farbentwicklung erfolgte durch Einbringen der Membran in 5 ml Färbelösung (Alkalische-Phosphatase-Puffer mit 0,04 % NBT, 0,02 % BCIP) für ca. 2 – 10 Minuten; die Färbung wurde gestoppt durch Spülen des Blots mit ddH<sub>2</sub>O.

**Spezifische Detektion von StrepTagII-Fusionsproteinen mit Streptavidin-AP**

Die Ponceau-gefärbten Membranen wurden zunächst 30 Minuten lang in 50 ml Blockierlösung geschwenkt, dann in 10 ml einer 1:3000 – Verdünnung des Alkalische-Phosphatasegekoppelten Streptavidins (in Inkubationslösung) überführt und über Nacht bei 4 °C – 10 C unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach einem Waschschrift (3 x 2 Minuten in je 50 ml 1 x TTBS) erfolgte die Farbentwicklung durch Einbringen der Membran in 5 ml Färbelösung (Alkalische-Phosphatase-Puffer mit 0,04 % NBT, 0,02 % BCIP) für ca. 2 – 10 Minuten; die Färbung wurde gestoppt durch Spülen des Blots mit ddH<sub>2</sub>O.

### 2.2.3.2 Expression und Reinigung rekombinanter Proteine

#### 2.2.3.2.1 Rekombinante Expression in *E.coli*

RP            50 mM HEPES pH 7,5  
                  1 mM EDTA

Alle in dieser Arbeit verwendeten Vektoren zur Expression von IP3K-cDNA-Fragmenten in *E.coli* leiten sich von dem speziell für induzierbare, prokaryotische Expression entwickelten Plasmid pET-17b der Firma Novagen ab; die Transkription der einklonierten cDNA steht somit unter der Kontrolle eines T7-Promotors. Die cDNA der zur Transkription notwendigen T7-RNA-Polymerase ist bei den in der Arbeit verwendeten *E.coli*-Expressionsstämmen BL21(DE3) und BL21(DE3) – RIL über den lysogenen Phagen DE3 in das Bakteriengenom integriert, ihre Transkription steht dort unter der Kontrolle des lac-Promotors. Bei Anzucht plasmidhaltiger Bakterien in Lactose-freiem Medium in Anwesenheit von Glucose findet keine Transkription der einklonierten cDNA statt: zum einen wird die Transkription durch den lac-Repressor (im Lactose-ungebundenen Zustand) aktiv reprimiert (s.u.), zum anderen liegt bei ausreichend hohem Glucoseangebot das bakterielle catabolite activating protein (CAP) in cAMP-ungebundenem Zustand vor, so daß es zu keiner Transkriptionsaktivierung durch CAP-cAMP kommen kann. Die nachstehende Abbildung 2.4 (leicht verändert nach: Novagen-Newsletter, Volume 1, Nummer 1, Mai 1994) zeigt den oben beschriebenen Sachverhalt, ohne auf die Rolle des CAP-Proteins einzugehen:

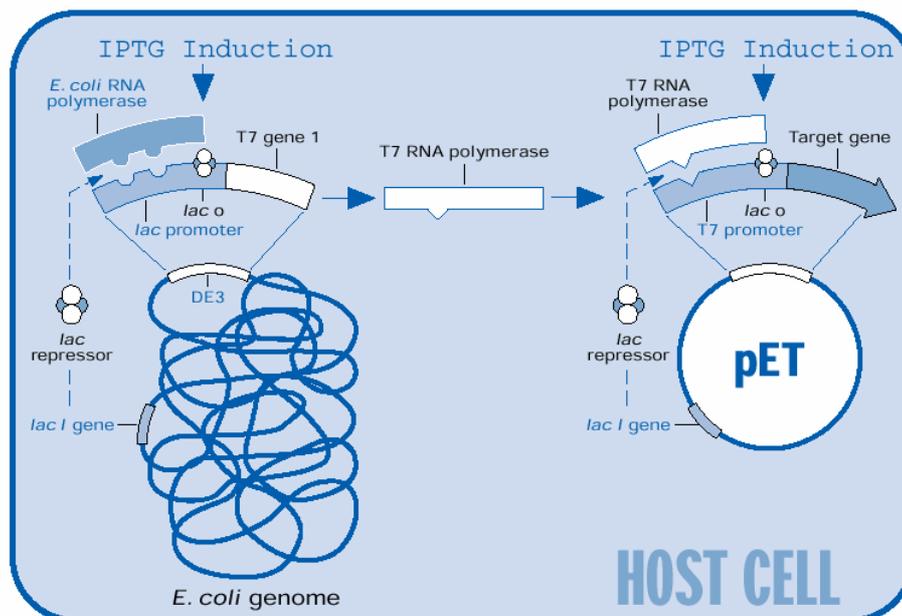


Abbildung 2.4: Regulation der Expression bei Verwendung des BL21(DE3)-pET-Systems

Die prokaryotische Expression aller rekombinanten Proteine wurde wie folgt durchgeführt: Eine geeignete Menge (25 ml für Testexpressionen zur Optimierung von Expressionsbedingungen, 250 – 500 ml für präparative Ansätze) frisches, 100 µg/ml Ampicillin sowie 0,2 % Glucose enthaltendes LB-Medium wurde mit 1/500 Volumen einer Übernachtskultur angeimpft. Die Kultur wurde sodann unter starkem Schütteln (250 rpm) bei 37 °C bis zum Erreichen einer optischen Dichte (Einstrahlwellenlänge 600 nm) von 0,5 inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt (i.a. ca. 4-5 Stunden nach Animpfen der Kultur) wurde die Expression des jeweiligen rekombinanten Proteins durch Zugabe von IPTG (Finalkonzentration 0,1 – 0,5 mM) induziert. Die weitere Inkubation erfolgte entweder bei Raumtemperatur oder bei 37° C für weitere 2 Stunden unter starkem Schütteln (250 rpm). Danach wurde die Kultur abzentrifugiert (5000 rpm, 10 Minuten, 4 °C, GSA-Rotor), der Überstand wurde verworfen, das Bakterienpellet in 1/17 Volumen Puffer RP resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C eingefroren.

Bei analytischen Expressionen zur Optimierung der Bedingungen wurde jeweils zum Zeitpunkt 0 (direkt vor der Induktion mit IPTG), zum Zeitpunkt 1 (1 h nach Induktion) sowie zum Zeitpunkt 2 (2 h nach Induktion) die optische Dichte bei 600 nm gemessen. Zur Analyse des Gesamtproteins (löslich sowie unlöslich) auf einem SDS-Polyacrylamidgel wurden zu jedem der oben genannten Zeitpunkte Aliquots genommen. Hierzu wurden 100/OD<sub>600</sub> µl der Kultur abgenommen, die Bakterien bei 5000 rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert und in 24 µl 1% SDS resuspendiert. Diese Bakterien suspension wurde sodann direkt mit 8 µl 4 x Probenpuffer für SDS-PAGE versetzt, wie im Kapitel 2.2.3.1.2 beschrieben gekocht und auf das Gel aufgetragen. Durch die Einrechnung der an den verschiedenen Zeitpunkten vorliegenden Bakteriendichte in der Kultur in das Volumen der abzunehmenden Aliquots wird gewährleistet, daß jedes Aliquot unabhängig vom Zeitpunkt, an dem es abgenommen wurde, in etwa die gleiche Bakterienmenge umfaßt, so dass anhand der auf dem Gel sichtbaren Banden bereits der Erfolg und Verlauf der Expression bei hinreichend großen Mengen an gebildetem rekombinanten Protein im Coomassiegefärbten Gel, bei geringeren Mengen im Western Blot, qualitativ beurteilt werden kann. Desweiteren wurde für die Durchführung einer analytischen Testlyse und anschließender SDS-PAGE / Western Blot (zur Bestimmung des Anteils an löslichem rekombinanten Protein) sowohl zum Zeitpunkt 1 als auch zum Zeitpunkt 2 jeweils 1 ml der Kultur abgenommen und bei 5000 rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Bakterienpellet in 200 µl RP resuspendiert und bis zur Durchführung des Lyseversuches bei – 20 °C gelagert.

### 2.2.3.2.2 Lyse von E.coli - Bakterien; Separation der löslichen Fraktion

Der Aufschluß der Bakterien zur weiteren Präparation der exprimierten rekombinanten Proteine wurde alternativ gemäß folgenden Protokollen durchgeführt:

#### Lyse A

Das in Puffer RP resuspendierte Bakterienpellet wurde bei 37 °C in einem Wasserbad aufgetaut. Durch Zugabe bei Raumtemperatur wurden folgende Endkonzentrationen eingestellt:

- 0,5 % Triton-X100
- 0,1 mg/ml DNase
- 0,5 mg/ml Lysozym
- 1 mM PMSF
- 0,5 mM Benzamidin
- 1 mM DTT

Der Ansatz wurde 15 – 30 Minuten bei 37 °C unter regelmäßigem Mischen in einem Wasserbad inkubiert, danach erfolgte die Abtrennung der unlöslichen Fraktion durch Zentrifugation (10000 rpm, 10 Minuten, 4 °C, SS34-Rotor). Der Überstand wurde abgenommen und für die weiteren Aufreinigungsschritte weiterverwendet, das Pellet wurde in einem Volumen Puffer RP + 0,5 % Triton X-100 aufgenommen und für eventuelle Gelanalyse bei – 20 °C gelagert oder direkt verworfen.

#### Lyse B

Wie sich herausstellte, kann die Verwendung von (i.a. aus Pankreas aufgereinigter) DNase zur Verringerung der durch die Freisetzung von hochpolymerer DNA aus den lysierten Zellen bedingten hohen Viskosität des Gesamtlysats insbesondere bei Proteolyse-anfälligen rekombinanten Proteinen auch in Gegenwart von Protease-Inhibitoren zu extremen Ausbeuteverlusten führen. Dies ist offensichtlich durch nicht unbeträchtliche Protease-Kontaminationen in den käuflichen DNase-Präparationen bedingt. Aus diesem Grund wurde das oben geschilderte Protokoll so abgewandelt, daß der Einsatz von DNase (und auch Lysozym) für einen effizienten und für das rekombinante Protein schonenden Bakterienaufschluß überflüssig wurde.

Das in Puffer RP aufgenommene Bakterienpellet wurde bei 37 °C in einem Wasserbad aufgetaut. Bei Raumtemperatur wurden folgende Endkonzentrationen eingestellt:

0,5 % Triton-X-100

1 mM PMSF

0,5 mM Benzamidin

1 mM DTT

Der Ansatz wurde 10 Minuten auf Eis inkubiert und danach kurz sonifiziert (i.a. 3 x 5 sec, bis eine ausreichende Verringerung der Viskosität erreicht wurde). Die unlösliche Fraktion wurde wie oben beschrieben durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand den weiteren Präparationsschritten zugeführt.

### 2.2.3.2.3 Chromatographische Aufreinigung rekombinanter IP3K

#### 2.2.3.2.3.1 Ionenaustauschchromatographie

##### 2.2.3.2.3.1.1 P11-Phosphocellulose

Bei der P11-Phosphocellulose handelt es sich um eine preiswerte Kationenaustauschermatrix (funktionelle Gruppe -  $\text{PO}_4\text{H}_2$ ), welche im Rahmen dieser Arbeit für die effiziente Vorreinigung bakterieller Rohlysate benutzt wurde. Alle GgIP3K-A-abgeleiteten Proteine (Mutanten und/oder verkürzte Fragmente) wurden vor dem Auftrag auf die entsprechend zur Anwendung kommenden Affinitätsmatrizes über P11-Phosphocellulose vorgereinigt. Da HsIP3K-B-abgeleitete Proteine bei pH 7,5 nur sehr ineffizient an P11-Phosphocellulose banden, wurde in diesen Fällen auf eine Vorreinigung verzichtet und direkt der Affinitätschromatographieschritt durchgeführt.

#### Vorbereitung und Aktivierung der P11-Phosphocellulosematrix

Für die Vorbereitung und Aktivierung von ca. 30 ml gebrauchsfertiger P11-Phosphocellulosematrix wurden 5 g Matrix eingewogen und in einen 500 ml Glasmeßzylinder überführt. Die Matrix wurde in 133 ml 0,5 M NaOH durch Überkopfmischen suspendiert und 4 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Suspension mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  auf ca. 600 ml aufgefüllt, erneut gemischt und ca. 15 Minuten bei Raumtemperatur stengelassen bis sich die Matrix am Grund des Meßzylinders abgesetzt hatte. Ca. 500 ml des Überstandes wurden durch vorsichtiges Abkippen entfernt und der Waschschrift nochmals wie beschrieben wiederholt. Daraufhin wurde die Matrix in 200 ml 0,5 M HCl suspendiert und erneut 4 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, zwei Waschschrift wurden analog der oben beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt. Danach wurde die Matrix zweimal in je ca. 150 ml 1 M Tris/HCl pH 7,5 gewaschen und in die gewählte Säule überführt (Volumen siehe Kapitel 3.3). Die Säule wurde sodann solange mit 1 M Tris/HCl pH 7,5 gespült (1 – 2 Säulenvolumen), bis der pH-Wert des Durchflusses gleich 7,5 war, danach wurde die Säule mit ca. 20 Säulenvolumen 25 mM Tris/HCl pH 7,5; 0,1 % Triton X-100 gewaschen bis die Leitfähigkeit des Durchflusses mit der Leitfähigkeit des aufgetragenen Puffers übereinstimmte (ca. 1,6 mSiemens/cm). Solcherart vorbereitete Säulen können einige Tage bei 4 – 10 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

#### Durchführung der P11-Phosphocellulosechromatographie

Verdünnungspuffer VP11	0,5 mM EDTA
	3 mM DTT

Puffer A	25 mM HEPES pH 7,5 2 mM DTT 1 mM EDTA 0,1 % Triton X-100
Puffer B	25 mM HEPES pH 7,5 2 mM DTT 1 mM EDTA 0,1 % Triton X-100 500 - 750 mM NaCl

Der wie im Kapitel 2.2.3.2.2 beschrieben präparierte Überstand des bakteriellen Rohlysats wurde mit einem Volumen Verdünnungspuffer VP11 verdünnt und auf eine zuvor mit ca. 5 Säulenvolumen vorequilibrierte P11-Phosphocellulosesäule aufgetragen (Flußrate < 1 ml/min, entweder unter Schwerkrafteinfluß oder unter Verwendung einer Schlauchpumpe). Danach wurde die Säule mit 4 Säulenvolumen Puffer A gewaschen. Die Elution erfolgte mittels einer Salzstufe (500, 650 oder 750 mM NaCl) mit 10 x ¼ Säulenvolumen Puffer B. Die erhaltenen Eluate wurden mittels SDS-PAGE und/oder Bradford-Assay analysiert und entweder direkt weiteren Chromatographiestufen zugeführt oder mittels Centricon-Konzentratoren aufkonzentriert, glycerinisiert (siehe Kapitel 2.2.3.2.6) und bei – 20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### 2.2.3.2.3.1.2 DEAE-Sephacel

Die Anionenaustauschermatrix DEAE-Sephacel wurde in dieser Arbeit zur Nachreinigung und Aufkonzentration von Eluaten der StrepTactin-Sepharose-Affinitätssäule benutzt (funktionelle Gruppe – O – (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> – N<sup>+</sup>H(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

DEAE-Auftragspuffer	25 mM HEPES pH 7,5 1 mM EDTA 1 mM DTT
DEAE-Elutionspuffer	25 mM HEPES pH 7,5 1 mM EDTA 1 mM DTT 300 mM NaCl
DEAE-Regenerationspuffer	25 mM HEPES pH 7,5 1 M NaCl

Die Säulenmatrix (ca. 0,5 ml pro mg aufzutragendes Protein) wurde zunächst mit 10 Säulenvolumen DEAE-Auftragspuffer equilibriert. Danach wurden die nachzureinigenden/aufzukonzentrierenden Proben auf die Säule aufgetragen. Nach kurzem Waschen (3 Säulenvolumen

DEAE-Auftragspuffer) wurde mit 12 x 1/5 – Säulenvolumen DEAE-Elutionspuffer eluiert. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und/oder Bradford-Assay analysiert und weiteren präparativen Schritten zugeführt. Die Säule wurde zum Abschluß mit 10 Säulenvolumen DEAE-Regenerationspuffer gewaschen und dann erneut mit DEAE-Auftragspuffer equilibriert.

### 2.2.3.2.3.2 Affinitätschromatographie

#### 2.2.3.2.3.2.1 CaM-Sepharose

Die CaM-Affinitätschromatographie wurde in dieser Arbeit zur Aufreinigung aller die CaM-Bindungsdomäne umfassender IP3K-Konstrukte benutzt. Bakterielle Lysate, die GgIP3K-A-WT oder -Mutanten enthielten, wurden vor dem Auftrag auf die CaM-Sepharosematrix einer P11-Phosphocellulose-Vorreinigung unterzogen, während Lysate, die HsIP3K-B-Mutanten enthielten, direkt auf die Säule aufgetragen wurden.

CaM-S-Puffer A	25 mM HEPES pH 7,5 1 mM DTT 1 mM CaCl <sub>2</sub> 200 mM NaCl optional 0,1 % Triton X-100
CaM-S-Puffer B	25 mM HEPES pH 7,5 1 mM DTT 1 mM CaCl <sub>2</sub> 500 mM NaCl optional 0,1 % Triton X-100
CaM-S-Puffer C	25 mM HEPES pH 7,5 1 mM DTT 1 mM EGTA 500 mM NaCl optional 0,1 % Triton X-100

Die Säulenmatrix wurde zunächst mit 7 Säulenvolumen CaM-S-Puffer A equilibriert. Danach wurden die auf die Konzentrationen des CaM-S-Puffer A eingestellten P11-Eluat aufgetragen. Die Säule wurde dann zunächst mit 3 Säulenvolumen CaM-S-Puffer A, danach mit 5 Säulenvolumen CaM-S-Puffer B gewaschen. Die Elution erfolgte mit 1/2,5 Säulenvolumen CaM-S-Puffer C. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und/oder Bradford-Assay analysiert, mittels Centricon – 10 Konzentratoren aufkonzentriert, mit Einfrierpuffer versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C gelagert.

### 2.2.3.2.3.2.2 StrepTactin-Sepharose

Die StrepTactin-Sepharose-Affinitätschromatographie wurde in dieser Arbeit zur Aufreinigung von mit einem N-terminalen StrepTagII (N-WSHPQFEK-C) fusionierten IP3K-Fragmenten benutzt. Bakterielle Lysate, die StrepTagII-Fusionsproteine enthielten, wurden zunächst über eine P11-Phosphocellulose-Chromatographie vorgereinigt.

Puffer W                    25 mM HEPES pH 7,5  
                                  1 mM EDTA  
                                  1 mM DTT

Puffer E                    25 mM HEPES pH 7,5  
                                  1 mM EDTA  
                                  1 mM DTT  
                                  2,5 mM Desthiobiotin

Puffer R                    25 mM HEPES pH 7,5  
                                  1 mM EDTA  
                                  1 mM HABA

Die StrepTactin-Sepharose-Affinitätssäule wurde zunächst mit zwei Säulenvolumen Puffer W equilibriert. Die aufzutragenden Fraktionen wurden auf die Konzentrationen des Puffers W eingestellt und bei niedriger Flussrate (< 1ml/min, entweder unter Schwerkrafteinfluss oder unter Verwendung einer Schlauchpumpe) über die Säule gegeben. Nach Beendigung des Probenauftrags wurde die Matrix mit 5 x 2 Säulenvolumen Puffer W gewaschen; die Elution erfolgte mit 10 x 0,5 Säulenvolumen Puffer E. Abschließend wurde die StrepTactin-Sepharose-Matrix mit 3 x 5 Säulenvolumen Puffer R regeneriert, mit 2 x 4 Säulenvolumen Puffer W gespült und erneut mit zwei Säulenvolumen Puffer W equilibriert.

### 2.2.3.2.4 Dialyse von Proteinlösungen

Zur Entfernung eventuell störender Pufferbestandteile (z.B. Glycerin, NaCl) bzw. zur Überführung gereinigter Proteine in andere Puffersysteme (z.B. HEPES oder Phosphatpuffer) wurde die entsprechende Proteinlösung in einer 8-Well-Durchfluss-Dialysekammer (maximales Füllvolumen pro Well: 500 µl) der Firma BioRad gegen den entsprechenden Puffer dialysiert. Hierzu wurde eine Dialysemembran (Ausschlussgrenze 10 kDa, Gibco) in die Dialysekammer eingebaut, die Wells mit den zu dialysierenden Proben beschickt und die Dialyse bei hoher Durchflussrate 3 – 4 mal gegen 500 ml Puffer im Kühlraum (4 – 9 °C) durchgeführt.

### 2.2.3.2.5 Aufkonzentration von Proteinlösungen

Zur besonders schonenden Aufkonzentration von Proteinlösungen wurde die Bindung und nachfolgende Elution der Proteine an eine / von einer DEAE-Sephacel-Anionenaustauschermatrix (siehe Kapitel 2.2.3.2.3.1.2) benutzt; für Standardanwendungen wurden die Konzentratoren Centricon-YM10 (für Volumina bis 10 ml) bzw. Centricon Plus 20 (für Volumina > 10 ml) der Firma Amicon gemäß der jeweiligen Bedienungsanleitung verwendet. Die Konzentratoreinheit Centricon YM-10 wurde desweiteren für die Umpufferung von für NMR-Untersuchungen vorgesehenen Proteinpräparationen in Tris-d11/D<sub>2</sub>O Puffer verwendet, da hier aus Kostengründen nicht gegen größere Volumina des deuterierten Puffersystems dialysiert werden konnte. In diesen Fällen wurde die Proteinlösung 4 – 7 mal auf ein Volumen von 100 – 200 µl aufkonzentriert, in 1 ml des deuterierten Puffers verdünnt und erneut konzentriert. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis keine störenden Signale mehr im NMR-Spektrum des Durchflusses zu detektieren waren.

### 2.2.3.2.6 Lagerung von Proteinlösungen

Einfrrierpuffer	86 % Glycerin
	0,9 mM EDTA
	0,9 mM Benzamidin
	1,7 mM DTT
	17 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

Kurzfristig (d.h. für einige Tage) wurden zur Weiterbearbeitung oder direkten Analyse vorgesehene Proteinproben auf Eis im Kühlraum gelagert. Für längerfristige Lagerung (bis zu mehreren Monaten) wurden die Proteinpräparationen nach gegebenenfalls vorangegangener Aufkonzentrierung mit 1,4 Volumen Einfrrierpuffer versetzt und nach guter Durchmischung bei – 20 °C gelagert. Unter diesen Bedingungen können IP3K-Präparationen über mehrere Monate ohne nennenswerten Verlust der enzymatischen Aktivität gelagert werden.

## 2.2.4 Analyse rekombinant exprimierter Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase

### 2.2.4.1 Enzymatisch-optischer Test für rekombinante IP3K

Zur Detektion von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase-Aktivität, zur Bestimmung enzymatischer Parameter ( $K_m$ ,  $v_{max}$ , Ca<sup>2+</sup>/CaM - Aktivierbarkeit) sowie zur Charakterisierung der Inhibierbarkeit durch nicht metabolisierte Inositolphosphate von wt- und gezielt mutierten Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinasen wurde ein gekoppelter enzymatisch-optischer Test eingesetzt. Dieser Test ermöglicht eine direkte Beobachtung der Kinaseaktivität während der laufenden Messung sowie die schnelle und einfache Bestimmung von apparenten  $K_m$ -Werten durch single-transient-Messungen.

#### 2.2.4.1.1 Assaybedingungen, Erzeugung der Rohdaten

1 x Reaktionsmix A (durch Zugabe von Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> zu startende Messungen)	10 mM TEA pH 7,5 5,0 mM MgCl <sub>2</sub> 30 mM KCl 1,0 mM DTT 0,2 mM NADH 1,0 mM PEP 0,5 mM ATP 5,0 U/ml Laktatdehydrogenase 2,5 U/ml Pyruvatkinase
1 x Reaktionsmix B (durch Zugabe von ATP zu startende Messungen)	10 mM TEA pH 7,5 5,0 mM MgCl <sub>2</sub> 30 mM KCl 1,0 mM DTT 0,2 mM NADH 1,0 mM PEP 25 µM Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> 5,0 U/ml Laktatdehydrogenase 2,5 U/ml Pyruvatkinase
Verdünnungspuffer	25 mM HEPES pH 7,5 1 mM DTT 200 mM NaCl 2 mg/ml BSA

Die Kopplung der von der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase katalysierten Reaktion mit der durch Extinktionsmessung (Einstrahlwellenlänge 365 nm) bestimmbarer NADH-Konzentration in der Küvette durch die Enzymaktivitäten der Laktatdehydrogenase sowie der Pyruvatkinase ist in untenstehender Abbildung dargestellt.

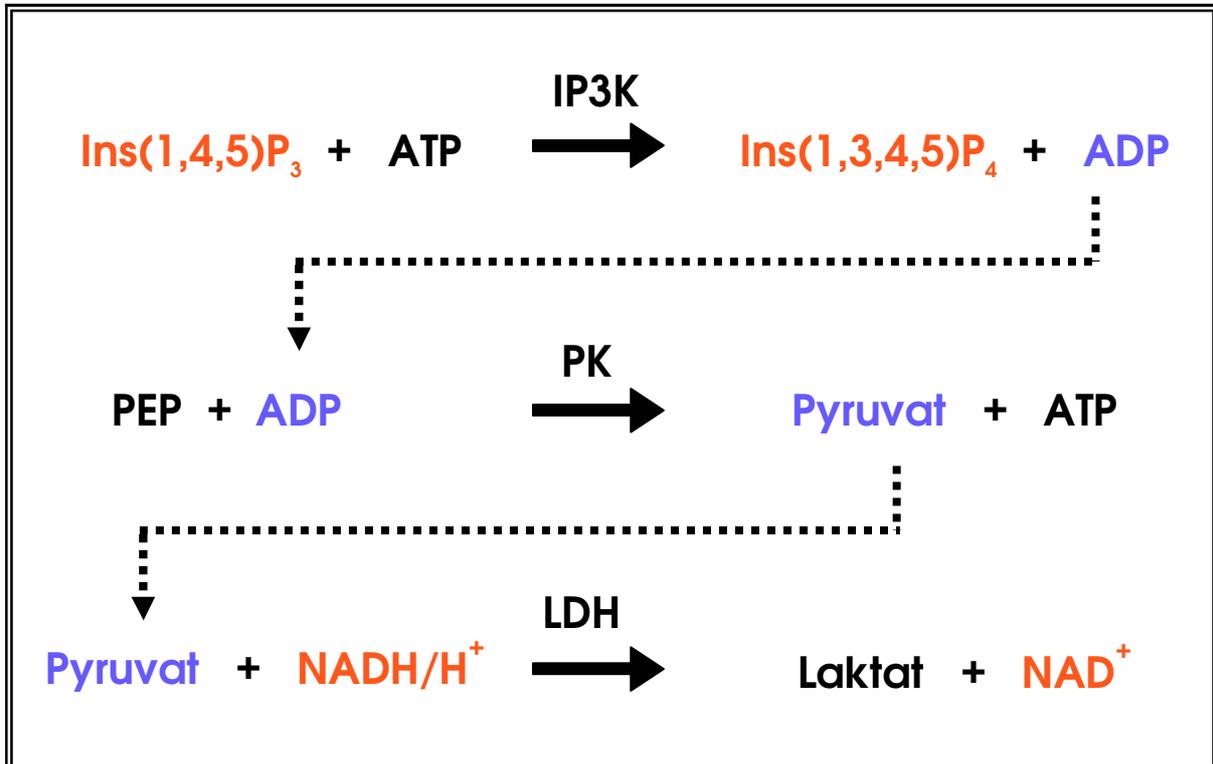


Abbildung 2.5: Gekoppelter enzymatisch-optischer Test: Das durch die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3 – Kinase – Reaktion erzeugte ADP wird durch die Pyruvatkinaseaktivität zu ATP regeneriert; dabei wird das im Reaktionsmix enthaltene Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat umgesetzt. Dieses wird sodann durch die Laktatdehydrogenase unter NADH-Verbrauch zu Laktat reduziert. Da der Umsatz von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> zu Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> equimolar zum Umsatz von NADH/H<sup>+</sup> zu NAD<sup>+</sup> erfolgt, kann aus dem zeitlichen Verlauf der Absorption bei 365 nm direkt auf die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3 – Kinase – Aktivität unter den für die Reaktion gewählten Bedingungen geschlossen werden.

Die Durchführung der Messungen erfolgte entweder in einem Pharmacia Ultrospec III UV-Spektralphotometer (Messgenauigkeit 0,001 OD; Messintervall 2 sec) oder in einem Lambda 20 UV-Spektralphotometer der Firma Perkin Elmer (Messgenauigkeit 0,0001 OD, Messintervall 0,2 sec) bei einer konstanten Temperatur von 30 °C. Bei dem Ultrospec III Photometer wurde diese Temperatur mittels eines Wasserbades und einer Durchflusseinrichtung eingestellt, bei dem Lambda 20 Photometer erfolgte die Temperaturregulation mittels eines Peltier-Elements. Alle Messungen wurden in einem finalen Volumen von 800 µl in reduzierten Quarzküvetten durchgeführt.

Reaktionsmix A bzw. B (nur für Bestimmungen des apparenten  $K_m$ -Wertes für ATP), Enzymlösung (bei Bedarf vorverdünnt mit Verdünnungspuffer) sowie eventuelle weitere Substanzen (Calmodulin,  $Ca^{2+}$ , potentiell als kompetitive Inhibitoren wirkende Inositolphosphate und –analoge) wurden in vorgewärmte Küvetten vorgelegt und die Absorption bei 365 nm für 10 – 15 Minuten aufgezeichnet, um eine eventuelle  $Ins(1,4,5)P_3$  - unabhängige Extinktionsabnahme detektieren zu können. Bei sauberen Enzympräparationen und niedrigen ATP-Konzentrationen trat ein solcher „Vorlauf“ in der Regel nicht oder in nur sehr geringem Maße auf; bei der Messung von Enzymaktivitäten in nur partiell gereinigten Fraktionen und insbesondere bei der Detektion von  $Ins(1,4,5)P_3$  3-Kinase-Aktivität in ungereinigten Bakterienlysaten ist jedoch die Aufzeichnung der Absorptionsabnahme vor der Zugabe des Inositolphosphates von essentieller Wichtigkeit, um  $Ins(1,4,5)P_3$  3-Kinase-Aktivität-spezifische von unspezifischer Absorptionsabnahme unterscheiden zu können.

Nach ausreichender Temperierung der Probe und Aufzeichnung des eventuell vorhandenen Vorlaufs wurden die Messungen durch Zugabe des Inositolphosphates bzw. von ATP gestartet und der weitere Verlauf der Absorptionsabnahme aufgezeichnet.

Die Umrechnung der gemessenen Absorptionsänderungen ( $\Delta OD_{365nm}$ ) in NADH- bzw.  $Ins(1,4,5)P_3$  - Konzentrationsänderungen ( $\Delta c_{NADH}$  bzw.  $\Delta c_{IP_3}$ ) wurde gemäß dem Lambert-Beer-Gesetz wie folgt vorgenommen:

$$\Delta c_{NADH} = \Delta c_{IP_3} = \Delta OD_{365nm} / (\epsilon * d)$$

mit  $\epsilon = 3,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$   
molarer Extinktionskoeffizient von NADH  
bei einer Einstrahlwellenlänge von  
365 nm  
 $d = 1 \text{ cm}$   
Schichtdicke der Küvette

---

### 2.2.4.1.2 Bestimmung enzymatischer Parameter

#### 2.2.4.1.2.1 Bestimmung der spezifischen Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3 – Kinase-Aktivität

Zur Bestimmung der spezifischen Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase-Aktivität von wt – sowie mutagenisierten Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinasen wurden zwischen 10 nM und 500 nM rekombinante IP3K wie oben beschrieben in 1 x Reaktionsmix A 10 – 15 Minuten bei 30 °C vorinkubiert. Der Start der Messung erfolgte sodann durch Zugabe von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> zu einer Endkonzentration von 25 µM; bei den so eingestellten Substratkonzentrationen (0,5 mM ATP, 25 µM Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>) liegt für fast alle in dieser Arbeit untersuchten Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase-Konstrukte für beide Substrate Substratsättigung vor. Der Extinktionsabfall wurde über einen Zeitraum von 5 – 30 Minuten (in Abhängigkeit von der vorliegenden Enzymaktivität) aufgezeichnet. Durch lineare Regression (durchgeführt mit der dem jeweiligen Spektrometer zugehörigen Software) wurde aus dem vorderen, linear verlaufenden Teil der Zeit-Extinktions-Rohdatenkurve die Steigung in  $\Delta OD_{365nm} / \text{min}$  ermittelt und unter Verwendung des Lambert-Beer-Gesetzes die IP<sub>3</sub> – Konzentrationsänderung pro Zeit ( $\Delta c_{IP_3} / \text{min}$ ) errechnet. Unter Verwendung der im Vorwege durch Bradford-Assay bestimmten Proteinkonzentration der eingesetzten Proteinlösung konnte nun die spezifische Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase-Aktivität in mU/mg bestimmt werden.

#### 2.2.4.1.2.2 Bestimmung des apparenten K<sub>m</sub>-Wertes für ATP

Der apparente K<sub>m</sub>-Wert für ATP von wt- und mutagenisierten Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinasen wurde durch die Messung von Anfangsgeschwindigkeiten bei konstanter initialer Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> – Konzentration (25 µM) und variablen initialen ATP-Konzentrationen (25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM, 150 µM, 250 µM, 500 µM, 1 mM, 2 mM) ermittelt. Hierzu wurden zwischen 10 nM und 500 nM rekombinanter Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase wie oben beschrieben in 1 x Reaktionsmix B für 10 – 15 Minuten vorinkubiert und die Messung sodann mit der gewünschten ATP-Konzentration gestartet. Wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben wurde sodann mittels linearer Regression die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion bei den entsprechenden Substratkonzentrationen in mU/mg bestimmt; die Bestimmung des apparenten K<sub>m</sub>-Werts für ATP erfolgte unter Verwendung der Lineweaver-Burke-Auftragung.

### 2.2.4.1.2.3 Bestimmung des apparenten $K_m$ -Wertes für Ins(1,4,5) $P_3$ , single-transient-Messungen

Der apparente  $K_m$ -Wert für Ins(1,4,5) $P_3$  wurde entweder analog zur oben beschriebenen Messung des apparenten  $K_m$ -Wertes für ATP mit Hilfe von Einzelmessungen bei verschiedenen Ins(1,4,5) $P_3$ -Initialkonzentrationen (1,25  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 18,75  $\mu$ M, 25  $\mu$ M) bei fester ATP-Konzentration (0,5 mM bzw. 2 mM) durchgeführt oder aber mittels single-transient Messungen bei fester Ins(1,4,5) $P_3$ -Initialkonzentration von 5  $\mu$ M und fester ATP-Konzentration (0,5 mM bzw. 2 mM) bestimmt. Hierzu wurde eine geeignete Konzentration rekombinanter Ins(1,4,5) $P_3$  3-Kinase in 1 x Reaktionsmix A 10 – 15 Minuten bei 30 °C vorinkubiert und die Messung sodann durch Zugabe von 5  $\mu$ M Ins(1,4,5) $P_3$  gestartet. Der Extinktionsverlauf wurde bis zum vollständigen Ablauf der Reaktion, d.h. bis aufgrund der quantitativen Umsetzung des eingesetzten Ins(1,4,5) $P_3$  keine Extinktionsänderung mehr auftrat, aufgezeichnet. Da der Zusammenhang zwischen den Größen  $\Delta OD_{365nm}$  und  $\Delta c_{IP_3}$  bekannt ist (Lambert-Beer-Gesetz, siehe Kapitel 2.2.4.1.1) konnte nun unter der Voraussetzung, dass die sich nach vollständigem Ablauf der Reaktion einstellende Extinktion der Ins(1,4,5) $P_3$ -Konzentration 0 entspricht, die zu jedem beliebigen Zeitpunkt in der Küvette vorliegende Ins(1,4,5) $P_3$ -Konzentration berechnet werden. Durch Berechnung der der Umsatzgeschwindigkeit direkt proportionalen Tangentensteigung in den für die Auswertung gewählten Zeitpunkten (entweder durch einen Polynomfit (3. Grad) an die Rohdaten  $OD_{365nm}(t)$  und anschließende algebraische Bildung der Ableitung oder durch ein numerisches Ableitungsverfahren) konnten nun Wertepaare der Form ( $c_{IP_3}$ , Umsatzgeschwindigkeit) gebildet werden, welche direkt zur Auftragung in einem Substrat-Sättigungsdiagramm oder, als reziproke Werte, in einem Lineweaver-Burke-Diagramm, genutzt werden können.

Der Vorteil der single-transient-Auswertung gegenüber den konventionellen Anfangsgeschwindigkeitsmessungen bei verschiedenen Initialkonzentrationen ist zum einen in der Materialersparnis zu sehen (4 nmol Ins(1,4,5) $P_3$  gegenüber > 50 nmol Ins(1,4,5) $P_3$  pro  $K_m$ -Wertmessung); zum anderen können auf diese Weise auch schnell statistisch signifikante Ergebnisse liefernde Mehrfachbestimmungen durchgeführt werden. Allerdings kann bei single-transient-Auswertungen insbesondere bei den kleineren Substratkonzentrationen die Inhibition der Ins(1,4,5) $P_3$  3-Kinasen durch das Reaktionsprodukt Ins(1,3,4,5) $P_4$  durchaus eine Rolle spielen, ein Faktum, dem bei der Interpretation der auf diese Weise gewonnenen Daten Rechnung getragen werden muss.

### 2.2.4.1.2.4 Bestimmung der $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Aktivierbarkeit von IP3K

Für die wt-Ins(1,4,5) $\text{P}_3$  3-Kinasen sowie für einige ausgewählte gezielt mutierte Ins(1,4,5) $\text{P}_3$  3-Kinasen wurden Messungen zur Stimulierbarkeit des jeweiligen Enzyms durch  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  durchgeführt. Hierbei wurde zum einen die maximale Aktivierbarkeit (Steigerung der spezifischen Aktivität) durch  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  der jeweiligen Enzyme untersucht, zum anderen wurde auch die Sensitivität der Enzyme auf den  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Komplex ermittelt (Bestimmung der CaM-Konzentration, bei der halbmaximale Aktivierung eintritt).

Die Messungen wurden unter Einsatz einer geeigneten Menge rekombinanter Ins(1,4,5) $\text{P}_3$  3-Kinase (12 nM – 50 nM) in 1 x Reaktionsmix A bei 30 °C durchgeführt. Die Vorinkubation erfolgte in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  und der für die entsprechende Messung einzustellenden Calmodulin-Konzentration (0,5 nM, 1 nM, 2,5 nM, 5 nM, 10 nM, 100 nM, 1  $\mu\text{M}$ ), die Messung wurde durch Zugabe von Ins(1,4,5) $\text{P}_3$  gestartet (Initialkonzentration 25  $\mu\text{M}$  oder 5  $\mu\text{M}$ ). Die Auswertung erfolgte gemäß dem in Kapitel 2.2.4.1.2.1 beschriebenen Verfahren zur Bestimmung spezifischer Aktivitäten/Initialgeschwindigkeiten. Zur Bestimmung von apparenten  $K_m$ -Werten für Ins(1,4,5) $\text{P}_3$  in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  kann das im vorhergehenden Kapitel beschriebene single-transient Verfahren effizient eingesetzt werden.

### 2.2.4.1.3 Inositolphosphate als kompetitive Inhibitoren der Ins(1,4,5) $\text{P}_3$ 3-Kinase-Reaktion

Nicht durch die Ins(1,4,5) $\text{P}_3$  3-Kinase phosphorylierbare Inositolphosphate wurden auf ihre Potenz zur kompetitiven Inhibition der Ins(1,4,5) $\text{P}_3$  3-Kinase-Reaktion untersucht. Hierzu wurde eine geeignete Menge rekombinanter Ins(1,4,5) $\text{P}_3$  3-Kinase (Endkonzentration 10 nM – 500 nM) in 1 x Reaktionsmix A in Gegenwart verschiedener Konzentrationen (10  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ ) des zu untersuchenden Inositolphosphats 10 – 15 Minuten bei 30 °C vorinkubiert. Die Messung wurde sodann durch Zugabe von Ins(1,4,5) $\text{P}_3$  gestartet (Initialkonzentration 5  $\mu\text{M}$ ) und bis zum vollständigen Ablauf der Reaktion (quantitativer Umsatz des eingesetzten Ins(1,4,5) $\text{P}_3$ ) aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte sodann für jede einzelne Messung gemäß dem im Kapitel 2.2.4.1.2.3 (single transient Messung) gesagten. Auf diese Weise kann mit Hilfe der Lineweaver – Burke – Auftragung für jede Inhibitorkonzentration sowohl der  $v_{\text{max}}$ -Wert sowie der apparente  $K_m$ -Wert für Ins(1,4,5) $\text{P}_3$  bestimmt werden. Auftragung der so erhaltenen apparenten  $K_m$ -Werte für Ins(1,4,5) $\text{P}_3$  gegen die Inhibitorkonzentrationen, lineare Regression und Bestimmung des Konzentrations (x-) Achsenabschnittes liefert den  $K_i$  Wert für den eingesetzten Inhibitor am untersuchten Enzym.

### 2.2.4.1.4 Inhibition der IP3K-Aktivität durch N-Ethylmaleimid

Das rekombinante wt-Enzym sowie die IP3K-Mutante C250S wurden im Hinblick auf ihre Inhibierbarkeit durch das Sulfhydrylgruppen alkylierende Reagenz N-Ethylmaleimid (NEM) untersucht. Eine Inhibition der IP3K-Aktivität durch NEM wurde bereits von [Haefs, 1994] demonstriert.

In Vorversuchen wurde zunächst die für ein quantitatives Ablaufen der Modifikationsreaktion erforderliche Reaktionszeit ermittelt. Hierzu wurde folgender Ansatz in einem 1,5 ml – Eppendorfreaktionsgefäß zusammenpipettiert (Endvolumen 28,8 µl):

130 nM – 150 nM rekombinante, affinitätsgereinigte IP3K

25 mM HEPES pH 7,5

125 mM NaCl

0,5 mM NEM

Identische Ansätze wurden sodann für verschieden lange Zeiten  $t_{\text{Reaktion}}$  (0,25 min, 0,5 min, 1 min, 2,5 min, 5 min, 10 min, 12 min, 20 min) bei 30°C im Heizblock inkubiert. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Reaktionen durch Zugabe von 3,2 µl 0,1 M DTT (resultierende Endkonzentration 10 mM) gestoppt und weitere 5 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Ansätze (Volumen 32 µl) wurden dann quantitativ in eine Küvette mit bereits auf 30°C vorgewärmtem Reaktionsmix überführt. Nach weiteren 5 Minuten Inkubationszeit wurde die Aktivitätsmessung durch Zugabe von 8 µl 2,5 mM Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> (Endkonzentration in der Küvette: 25 µM) gestartet (Gesamtvolumen des Ansatzes: 800 µl).

Diese Vorversuche zeigten (siehe Ergebnisse Abschnitt 3.5.1.2), dass unter den gewählten Versuchsbedingungen bei einer Reaktionszeit von 15 Minuten der quantitative Ablauf der Modifikation der IP3K durch NEM gewährleistet war. Deshalb wurde bei allen weiteren Experimenten die Inkubationszeit  $t_{\text{Reaktion}}$  konstant auf 15 Minuten gehalten, die eingesetzte Konzentration des NEM jedoch variiert (0,01 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 1,8 mM). Alle weiteren Schritte wurden wie oben für den Vorversuch beschrieben durchgeführt.

### 2.2.4.2 Limitierte tryptische Proteolyse rekombinanter IP3K in Anwesenheit/Abwesenheit von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>

Zur Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der limitierten tryptischen Proteolyse (Konzeption und Entwicklung dieses Assays: Prof. Mayr, W. Fanick) in Anwesenheit bzw. Abwesenheit ihres Substrats Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> wurden folgende Ansätze in 1,5 ml – Eppendorf-Reaktionsgefäßen zusammenpipettiert (Endvolumen 50 µl; Stocklösung Trypsin: 0,5 mg/ml in 1mM HCl):

Ansatz	mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,8	mg/ml IP3K	µM Ins(1,4,5)P <sub>3</sub>	mg/ml Trypsin
1	50	0,48	250	0,01
2	50	0,48	---	0,01

Die Ansätze wurden bei 30°C im Heizblock inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten (5 min, 20 min) wurde jeweils ein 10 µl umfassendes Aliquot entnommen. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte dann durch sofortige Zugabe von 3,3 µl 4 x Probenpuffer (siehe Abschnitt 2.2.3.1.2) und eine 8 minütige Inkubation bei 95°C im Heizblock. Die so für die Gelelektrophorese vorbereiteten Proben wurden auf einem 15% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt; dieses wurde dann zur Visualisierung der Proteinbanden mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt.

### 2.2.4.3 In vitro PKC-Phosphorylierungsassays

Solubilisierungspuffer  
 50 mM Tris pH 8,5  
 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 1 % SDS

Die Phosphorylierung von HsIP3K-B-Konstrukten (wt und gezielt mutiert) durch Proteinkinase C wurde mit Hilfe eines in vitro Phosphorylierungsassays untersucht. Ansatz 1 ist der eigentlichen Versuchsansatz; die Ansätze 2 und 3 dienen zur Kontrolle der PKC-Autophosphorylierung bzw. der Phosphorylierungseffekte eventueller, durch die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase-Präparation eingeschleppter Proteinkinase-Kontaminationen (oder auch Proteinkinase-Aktivitäten der IP3K selbst). Die Ansätze 2 und 3 stellen somit für quantitative Analysen unabdingbare Kontrolleexperimente dar. Da die im Ergebnisteil (Abschnitt 3.6) präsentierten Resultate jedoch auf ersten, im Wesentlichen zur Etablierung des Assays durchgeführten Experimenten beruhen, wurden hier zunächst nur Ansätze vom Typ 1 ausgewertet. Die dargestellten Ergebnisse sind somit als vorläufig und qualitativ zu betrachten.

Volumen eines Ansatzes: 120 µl

Ansatz	mM HEPES pH 7,5	mM MgCl <sub>2</sub>	mM DTT	mg/ml PS	µg/ml DAG	µM free Ca <sup>2+</sup>	µg Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> - 3-Kinase	µg/ml PKC	µM ATP*
1	20	10	2	0,25	20	10	2,5	0,83	40
2	20	10	2	0,25	20	10		0,83	40
3	20	10	2	0,25	20	10	2,5		40

Die spezifische Aktivität des eingesetzten ATP\* wurde durch Mischung von ATP mit <sup>32</sup>P-γ-ATP auf 1,25 nCi/pmol eingestellt; die zum Erreichen der freien Ca<sup>2+</sup> Konzentration von 10 µM einzusetzende Konzentration von CaCl<sub>2</sub> wurde unter Berücksichtigung der durch die Proteinpräparation in den Reaktionsansatz eingebrachten Konzentrationen von EDTA bzw. EGTA mit Hilfe des Programmes Maxchelator berechnet. Die Ansätze wurden auf Eis zusammenpipettiert (Finalvolumen 120 µl); vor dem Start der Reaktion durch die Zugabe des radioaktiven ATP\* wurden zur späteren gelelektrophoretischen Kontrolle der eingesetzten Proteinmengen jeweils 20 µl eines jeden Ansatzes abgenommen und bis zur weiteren Bearbeitung bei – 20 °C gelagert. Direkt nach Zugabe des radioaktiven ATP\* wurden weitere 20 µl als Nullwert abgenommen und wie unten beschrieben sofort mit TCA behandelt. Das verbleibende Reaktionsvolumen wurde bei 37 °C in einem Heizblock inkubiert. 2 min, 5 min, 10 min und 30 min nach Start der Reaktionen wurden jeweils 20 µl eines jeden Ansatzes abgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß, in dem bereits 5 µl 1 µg/µl BSA vorgelegt waren, überführt. Diese Aliquots wurden sofort mit 500 µl eiskalter 10 % TCA versetzt, unter leichtem Schwenken gemischt und für mindestens 10 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin erfolgte eine einminütige Zentrifugation (Eppendorf-Tischzentrifuge, 13000 rpm, Raumtemperatur). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen, das Pellet erneut in 500 µl eiskalter 10 % TCA aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation und Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet in 500 µl eiskalter 2 % TCA aufgenommen und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen, die Zentrifugation wiederholt und die restliche TCA quantitativ entfernt. Die Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden nun in Plastik-Zählgläschen eingehängt und im Szintillationszähler gemessen (Cerenkov-Strahlung, Messzeit: 1 min).

Zusätzlich wurden die TCA-gefällten Pellets nach Beendigung der Messung in je 24 µl Solubilisierungspuffer aufgenommen, mit 8 µl 4 x Probenpuffer versetzt, 8 Minuten bei 95 °C gekocht und kurz anzentrifugiert. Diese Proben wurden sodann auf ein 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen; nach dem Gellauf erfolgte die Anfärbung der Proteinbanden mit Coomassie brilliant blue. Das entfärbte Gel wurde auf einem Gelrockner getrocknet und für 2 – 6 Stunden auf einen <sup>32</sup>P-Phosphoimager-Screen und/oder einen Röntgenfilm aufgelegt.

## 2.2.4.4 Saturation Transfer Difference NMR Spektroskopie

### 2.2.4.4.1 Das Prinzip der Saturation Transfer Difference NMR Spektroskopie

Mithilfe der Methodik der Saturation Transfer Difference NMR – Spektroskopie können Interaktionen zwischen makromolekularen Rezeptorproteinen und niedermolekularen Verbindungen (z.B. Peptide, Mono- und Oligosaccharide) analysiert werden. Die Bedeutung intermolekularer Spindiffusionseffekte für die Untersuchung von Protein/Ligand-Interaktionen wurde zwar bereits vor längerem erkannt [Akasaka, 1979], eine systematische Untersuchung des Effektes erfolgte jedoch erst in neuerer Zeit ([Mayer, 2001]; [Mayer und Meyer, 1999]). Mehrere Arbeiten demonstrieren die Anwendbarkeit der Methode auf Fragestellungen des pharmazeutischen Wirkstoffscreenings sowie zur Identifizierung der an der Bindung beteiligten Epitope niedermolekularer Liganden ([Mayer und Meyer, 1999]; [Klein et al., 1999]; [Maaheimo et al., 2000]; [Weimar et al., 2000]; [Meinecke und Meyer, 2001]). Das Prinzip eines STD-NMR-Experimentes ist in der nachstehenden Abbildung 2.6 schematisch dargestellt.

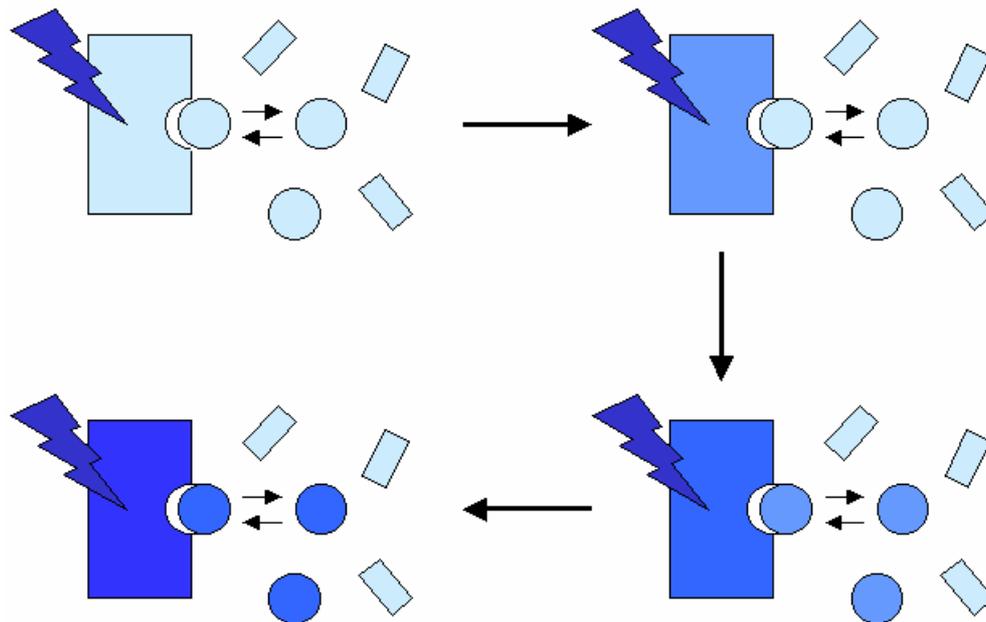


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung des der Saturation Transfer Difference NMR Spektroskopie zugrundeliegenden Effektes (nach [Mayer und Meyer, 1999]): Intermolekularer Sättigungstransfer zwischen einem durch einen selektiven Puls (Zickzacklinie) gesättigten makromolekularen Rezeptorprotein (großes Rechteck) im Spindiffusionslimit und einem niedermolekularen, reversibel an den Rezeptor bindenden Ligandenmolekül (Kreis) führt zur Sättigung von Ligand-Resonanzen; die Resonanzen nicht - bindender Moleküle (kleine Rechtecke) bleiben hingegen unbeeinflusst. Das Ausmaß der Sättigung des makromolekularen Rezeptors sowie des bindenden Ligandenmoleküls nimmt mit der Sättigungsdauer zu (angedeutet durch die Pfeile sowie die zunehmend dunklere Einfärbung).

Der Begriff „Sättigung“ beschreibt dabei eine durch einen Pulse Train mit Gauss-Pulsen geeigneter Frequenz und Amplitude hervorgerufene Unterdrückung der zu bestimmten Resonanzen gehörigen Magnetisierung. Bei den hier gezeigten Experimenten betrug die Dauer eines Gausspulses 50 ms; gesättigt wurde mit 10, 20, 40 oder 60 Gausspulsen, dies entspricht Sättigungszeiten von 0,5 s, 1 s, 2 s und 3 s. Wird nach einem Sättigungspuls ein NMR-Spektrum aufgenommen, zeigen die zu diesen Resonanzen gehörigen Peaks geringere Amplituden als in Spektren ohne Vorsättigung oder treten gar nicht mehr auf.

Wie in Abbildung 2.6 dargestellt, beruht das STD-NMR-Experiment auf dem Effekt des intermolekularen Sättigungstransfers zwischen einem durch einen selektiven Puls vorgesättigten makromolekularen Rezeptorprotein und einem mit diesem Rezeptor interagierenden niedermolekularen Liganden. Da sich Polypeptide mit Molekulargewichten von mehr als 10 kDa im allgemeinen im Spindiffusionslimit befinden, kann über die selektive Sättigung einzelner Proteinresonanzen eine effiziente Sättigung sämtlicher Proteinresonanzen erreicht werden. Bei der Untersuchung eines Systems aus einem makromolekularen Rezeptorprotein und niedermolekularen (putativen) Ligandenmolekülen ist die zur Vorsättigung gewählte Einstrahlungsfrequenz somit im allgemeinen so wählbar, dass keine direkte Beeinflussung von Ligandresonanzen durch den Sättigungspuls zu erwarten ist. Wird nun der Rezeptor selektiv gesättigt, kann über den Mechanismus der intermolekularen Spindiffusion Sättigung von dem Rezeptorprotein auf mit dem Protein interagierende Moleküle übertragen werden; auf nicht mit dem Rezeptor wechselwirkende Moleküle wird keine Sättigung transferiert. Bei reversibler Protein/Ligand-Interaktion geht der Ligand nach einer bestimmten Verweildauer am Protein (während durch intermolekulare Spindiffusion der Sättigungstransfer stattfindet) wieder in den freien Zustand über; die während des Bestehens des gebundenen Zustands aufgenommene Sättigung verbleibt initial im Spinsystem des Liganden und klingt mit der Relaxationszeit  $T_1$  ab.

Zur Detektion der STD-Effekte werden nun nacheinander zwei NMR-Spektren aufgenommen. Hierbei wird bei einem der Spektren („on resonance spectrum“) mit einem die Proteinresonanzen treffenden Vorsättigungspuls gearbeitet, bei dem anderen Spektrum („off resonance spectrum“) erfolgt die Einstrahlung außerhalb des die Proteinresonanzen beinhaltenden spektralen Fensters. Bei der Aufnahme beider Spektren werden die Proteinresonanzen über einen Spinlock-Puls unterdrückt. Die so erhaltenen Spektren (im Rahmen dieser Arbeit wurden nur 1D- $^1\text{H}$ -Spektren betrachtet, möglich sind aber auch 2D-Experimente wie COSY und TOCSY-Spektren) werden nun voneinander subtrahiert; das erhaltene Differenzspektrum („saturation transfer difference spectrum“ := off-resonance spectrum – on-resonance spectrum) beinhaltet nur Resonanzen bindender Moleküle bzw. Epitope, da nur für solche Ligandresonanzen ein Unterschied zwischen dem „on resonance“ und dem „off resonance“ Zustand vorhanden ist.

Mayer [1999, 2001] zeigte am Beispiel von Lektin/Oligosaccharid- bzw. Lektin/Monosaccharid-Interaktionen, dass auf diese Weise nicht nur eine Identifikation bindender Moleküle in komplexen Mischungen möglich ist, vielmehr können auch die an der Bindung beteiligten Epitope des Liganden definiert werden. Dies ist möglich, da die Intensität der Signale im STD-Spektrum in hohem Maße durch den Abstand zwischen den Proteinprotonen und den Ligandenprotonen in dem für den Sättigungstransfer relevanten gebundenen Zustand bestimmt wird: Ligandenprotonen, die sich im gebundenen Zustand in großer räumlicher Nähe zu Proteinprotonen befinden, erfahren einen effizienteren Sättigungstransfer und zeigen somit höhere Signalintensitäten im STD-Spektrum als weiter entfernt vom Protein liegende Protonen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig ein aus einem metabolisch hochaktiven Enzym und seinem Substrat bestehendes System mit den Methoden der STD-NMR-Spektroskopie untersucht.

### 2.2.4.4.2 Durchführung und Auswertung der Messungen

#### Vorbereitung der Proben

Deuterierter Tris-Puffer: 50 mM Tris-d11      pH 7,5  
Hergestellt durch Lösen von Tris-d11 in D<sub>2</sub>O (99,8 %) ;  
Einstellen des pH 7,5 mit DCI unter Benutzung von Neutralität-pH-Indikatorstäbchen (Merck) ohne Korrektur für D<sub>2</sub>O

Für die STD-NMR-Messungen wurde ein IP3K-Fragment verwendet, welches lediglich die katalytische Domäne des Enzyms umfasst. Um trotz des Fehlens der Calmodulin-Bindungsdomäne eine affinitätschromatographische Aufreinigung durchführen zu können, wurde das Fragment als StrepTagII-Fusionsprotein exprimiert (siehe Abschnitte 3.1.1.3 und 3.2.2). Die zu untersuchenden Proteine (WT und ausgewählte Mutanten) wurden aus der löslichen Fraktion des Bakterienlysats zunächst über eine P11-Phosphocellulose-Chromatographie (siehe Abschnitt 2.2.3.2.3.1.1) vorgereinigt, danach erfolgte eine StrepTactin-Affinitätschromatographie (Abschnitt 2.2.3.2.3.2.2). Die Eluate wurden zunächst über eine DEAE-Sephacel-Ionenaustauschchromatographie ankonzentriert (Abschnitt 2.2.3.2.3.1.2), eine weitere Konzentrierung der Proben erfolgte unter Verwendung einer Centricon-10-Konzentratoreinheit. Die Proteinkonzentration wurde gemäß der in 2.2.3.1.1 beschriebenen Methode nach Bradford bestimmt; durch Analyse von Aliquots auf SDS-Polyacrylamidgelen (Coomassie- und Silberfärbung) wurde die Reinheit der Proteinpräparation überprüft (siehe 3.3.2).

Im allgemeinen wurden für die STD-NMR-Experimente jeweils zwischen 600 µg und 2 mg rekombinantes, hochreines Protein (Molekulargewicht 31 kDa) eingesetzt. Die benötigte Proteinmenge wurde in eine Centricon-10-Konzentratoreinheit überführt und durch wiederholtes Konzentrieren und Auffüllen (ca. 5 mal) mit jeweils 1 ml deuteriertem Tris-Puffer für die NMR-Analysen umgepuffert. Die fertig umgepufferte Probe wurde sodann in ein NMR-Röhrchen überführt und dabei auf ein Volumen von 500 µl eingestellt.

Der Ligand Inositol 1,4,5-trisphosphat (bezogen als Natriumsalz, Firma Alexis) wurde in lyophilisierter Form geliefert; durch Lösen in 99,8 % D<sub>2</sub>O wurde eine 50 mM Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> – Stocklösung hergestellt, die dann für die Einstellung der gewünschten Konzentrationen im NMR-Röhrchen eingesetzt wurde.

### Durchführung der Messungen

Alle Experimente wurden an einem DRX 500 Spektrometer (Bruker) durchgeführt. Bei fast allen Messungen wurde ein inverser 5mm Tripelresonanz-Probenkopf mit z-Gradient und abgeschirmten Spulen verwendet; lediglich ein Experiment (Variation der Sättigungszeit bei konstanter Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> – Konzentration von 1,6 mM, WT-IP3K) wurde unter Verwendung eines 5mm-Multikern-Probenkopfes durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei einer konstanten Temperatur von 280 K. Die Aufzeichnung der Spektren sowie die Prozessierung der Rohdaten wurde mit Hilfe des Programms XWINNMR Vers. 2.5 (Bruker) vorgenommen. Alle im Folgenden genannten Pulsprogramme sowie die Werte der bei den Experimenten konstant gehaltenen Variablen können im Anhang (Abschnitt 7.1) eingesehen werden.

Die 1D-<sup>1</sup>H-STD-NMR-Spektren wurden durch Anwendung des Pulsprogrammes stdslsp generiert [Mayer, 2001]. Dieses Programm ermöglicht die Aufnahme eines eindimensionalen Sättigungstransfer-Differenzspektrums, bei dem zusätzlich über einen T<sub>1ρ</sub>-Filter die Proteinresonanzen unterdrückt werden. Durch Variation des die Anzahl der zur Vorsättigung verwendeten Gausspulse definierenden Parameters I7 können verschiedene Sättigungszeiten eingestellt werden; bei einer Pulslänge von 50 ms entspricht z.B. ein Wert von I7 = 40 einer Sättigungszeit von 2 sec. Um auf zeitliche Schwankungen der Temperatur oder des Magnetfeldes zurückzuführende Subtraktionsartefakte zu minimieren, wird jeweils alternierend ein Scan unter „on resonance“ - und ein Scan unter „off-resonance“ - Bedingungen durchgeführt und dann sofort die Subtraktion durchgeführt. Eine Anzahl n<sub>s</sub> von Scans entspricht im Differenzmodus somit einer Aufsummierung von n<sub>s</sub>/2 Scans.

Für jede eingesetzte Ligandenkonzentration wurde zusätzlich ein Referenzspektrum ohne Vorsättigung unter ansonsten identischen Bedingungen aufgenommen (Pulsprogramm zgsl). Erst eine solche Vorgehensweise ermöglicht die Berechnung des prozentualen STD-Effektes sowie, bei bekannter Protein- und Ligandenkonzentration, des STD-Amplifikationsfaktors [Mayer, 2001].

## Auswertung der Messungen

Die Rohdatensätze zusammengehöriger Einzelexperimente (z.B. STD-Spektren, die bei gleicher Ligandenkonzentration aber unterschiedlicher Sättigungszeit aufgenommen wurden und das zugehörige Referenzspektrum) wurden identisch unter XWINNMR prozessiert. Insbesondere wurde die Apodisierung des FID-Signals vor der Fourier-Transformation in gleicher Weise durchgeführt; der Linienverbreiterungsfaktor wurde hierbei auf einen Wert zwischen 0,3 Hz und 3 Hz eingestellt. Die mit 32k Datenpunkten aufgenommenen Spektren wurden vor der Fouriertransformation auf 64k mit Nullen aufgefüllt („zerofilling“). Nach erfolgter Fourier-Transformation wurden die Spektren manuell phasenkorrigiert. Bei Spektren mit gutem Signal/Rausch (S/N)-Verhältnis wurde die Integrationsfunktion von XWINNMR zur Bestimmung der Integrale der einzelnen Peaks verwendet; die im zgsl-Referenzspektrum manuell festgelegten Integralgrenzen wurden dabei in einer Datei abgespeichert und auf die dazugehörigen Sättigungstransfer-Differenz-Spektrum übertragen. Spektren mit schlechterem S/N - Verhältnis wurden unter Verwendung der dual-display-Funktion mit dem zugehörigen Referenzspektrum verglichen. Die dual-display-Funktion wurde ferner zur Auswertung von sich partiell überlappenden Mehrfachpeaks verschiedener Protonen herangezogen.

Die Quantifizierung der STD-Effekte der in den Spektren differenzierbaren Protonensignale erfolgte wie in [Mayer, 2001] durch Angabe des prozentualen STD-Effektes [% STD] bzw., bei bekannter Protein- und Ligandenkonzentration, durch die Angabe des STD-Amplifikationsfaktors [SAF]. Diese können aus den im STD-Spektrum sowie dem zugehörigen Referenzspektrum bestimmten Integralen wie folgt berechnet werden:

$$\% \text{ STD} = 100 \frac{I_{\text{STD}}}{I_{\text{ref}}}$$

hierbei ist

$\% \text{ STD}$	prozentualer STD-Effekt
$SAF$	STD-Amplifikationsfaktor
$I_{\text{STD}}$	Integral im STD-Spektrum
$I_{\text{ref}}$	Integral im Referenzspektrum
$C_{\text{lig}}$	Ligandenkonzentration
$C_{\text{prot}}$	Proteinkonzentration

$$SAF = \frac{I_{\text{STD}}}{I_{\text{ref}}} \frac{C_{\text{lig}}}{C_{\text{prot}}}$$

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Vektoren zur prokaryotischen Expression von GgIP3K-A / HsIP3K-B cDNA; gezielte Mutagenese der wt-Plasmide

#### 3.1.1 Die wt-Expressionsvektoren

Alle Konstrukte basieren auf dem Vektor pET-17b (Firma Novagen). Dieser Vektor erlaubt eine effiziente cytoplasmatische Expression der einklonierten cDNA unter der Kontrolle eines T7-Promotors in Bakterien des *E.coli* K12-Sicherheitsstammes wie BL21(DE3) bzw. BL21(DE3)RIL.

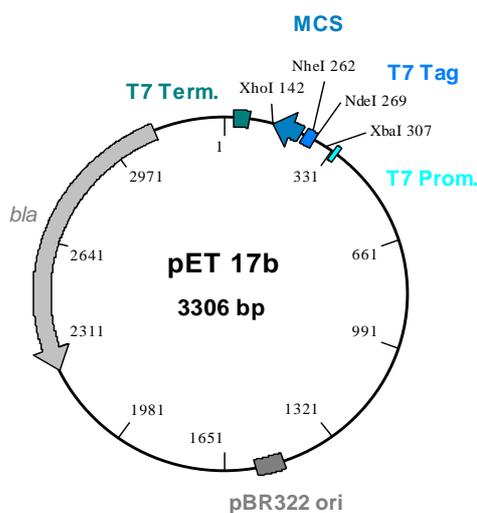


Abbildung 3.1

Schematische Darstellung des Vektors pET-17b; dargestellt sind der T7-Promotor, die T7-Tag-Sequenz, die multiple cloning site (MCS), der T7-Terminator-Bereich, der pBR322 ori, die für den Selektionsmarker  $\beta$ -Laktamase codierende Region (*bla*) sowie einige, für die nachfolgend beschriebenen Klonierungen benutzte Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen (*Xba* I, *Nde* I, *Nhe* I, *Xho* I)

#### 3.1.1.1 pET-17b-GIK [Bertsch et al., 1999]

Dieses zu Beginn der vorliegenden Arbeit von Prof. Mayr/Dr. Bertsch zur Verfügung gestellte Plasmid erlaubt die prokaryotische Expression eines N-terminal trunkierten, die Calmodulin-Bindungsdomäne sowie die katalytische Domäne umfassenden Fragmentes (AA 156 – 452; errechnetes Molekulargewicht: 36 kDa) der Ins(1,4,5) $P_3$  3 – Kinase aus *Gallus gallus*.

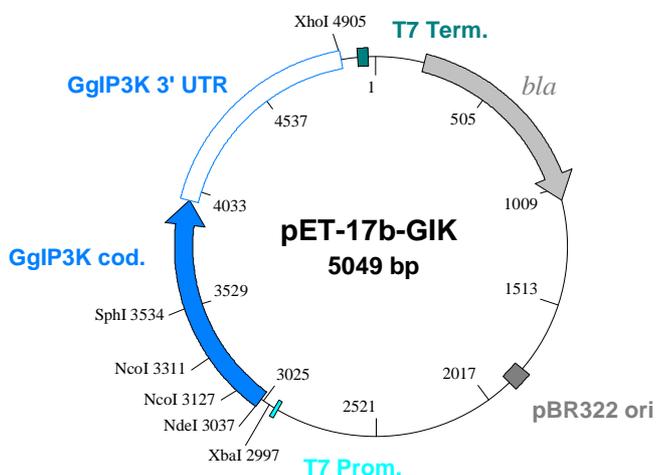


Abbildung 3.2

Schematische Darstellung des Vektors pET-17b-GIK; dargestellt sind der T7-Promotor, der T7-Terminator-Bereich, der pBR322 ori, die für den Selektionsmarker  $\beta$ -Laktamase codierende Region (*bla*) sowie einige, für nachfolgend beschriebene Klonierungen benutzte Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen (*Xba* I, *Nde* I, *Nco* I, *Xho* I). Das einklonierte cDNA-Fragment ist blau dargestellt und beinhaltet sowohl einen codierenden Abschnitt als auch einen Bereich aus dem 3'UTR der GgIP3K-A.

## 3.1 Ergebnisse

Das Plasmid wurde erzeugt durch die Ligation eines aus dem IP3K-positiven Lambda-Phagen LC13 stammenden 499 bp *Spe* I / *Sph* I - Fragmentes und eines 1368 bp *Sph* I / *Xho* I – Fragmentes aus dem Phagen ZAP2.2MH [Bertsch et al., 1999] in den mit *Nhe* I / *Xho* I restringierten pET-17b-Vektor. Es ermöglicht die Expression eines 318 Aminosäurereste umfassenden Proteins, dessen Sequenz und Domänenstruktur in Abbildung 3.3 dargestellt ist.

1	ATG GCT AGT GGA TCC CCC GGG CTG CAG GAA TTC CGG AAC AGA AGA	45
1	M A S G S P G L Q E F R N R R	15
46	GAA AAT CAT GGA GGA AAG AAA AAG GCA TGG CAT ACA ATT AAA ACC	90
16	E N H G G K K K A W H T I K T	30
91	ATG GTT AAC TTA CCA GTG ATT AGC CCC TTC AAG AAA CGC TAC TCA	135
31	M V N L P V I S P F K K R Y S	45
136	TGG GTG CAG CTG GCT GGA CAT ACA GGG AGT TTC AAG GCA GCT GAT	180
46	W V Q L A G H T G S F K A A D	60
181	AGT GGT AAG ATT CTC AAA CGC TTC TCA GAG AAT GAA AAA GAG TGT	225
61	S G K I L K R F S E N E K E C	75
226	TTT GAG CGA TTG ATG AAA GAC CCA CTA CGA TCC TGC GTC CCT TGC	270
76	F E R L M K D P L R S C V P C	90
271	TTC CAT GGT GTG GTG GAA AGA GAT GGA GAG ACC TAC ATT CAG CTG	315
91	F H G V V E R D G E T Y I Q L	105
316	GAT GAT TTG CTT ACT GAT TTT GAA GGG CCG TGT GTG ATG GAC TGT	360
106	D D L L T D F E G P C V M D C	120
361	AAG ATG GGG ATC AGG ACA TAC CTG GAA GAA GAG CTG ACT AAA GCC	405
121	K M G I R T Y L E E E L T K A	135
406	CGT GAG AAA CCA AAG CTG CGT AAA GAC ATG TAC AAG AAA ATG ATT	450
136	R E K P K L R K D M Y K K M I	150
451	GAA GTG GAT CCT CTT GCT CCT ACA GCT GAG GAG AAT GCC CAG CAT	495
151	E V D P L A P T A E E N A Q H	165
496	GCT GTC ACC AAG CCC CGA TAC ATG CAG TGG AGG GAA ACA ATC AGC	540
166	A V T K P R Y M Q W R E T I S	180
541	TCT AGT GCC AAC CTG GGC TTT AGG ATT GAA GGG ATT AAG AAA GCA	585
181	S S A N L G F R I E G I K K A	195
586	GAT GGA ACA TGC AAC ACA AAC TTC AAA ACT ACG AAG ACA CAG GAG	630
196	D G T C N T N F K T T K T Q E	210
631	CAA GTT CTC CAG GTT TTT GTG GAA TTC ATT GAG GGC AAC ACA ACT	675
211	Q V L Q V F V E F I E G N T T	225
676	ATT CTG AAA AAA TAC CTC AAG CGT CTG CAG GAA ATT CAT ATC ATT	720
226	I L K K Y L K R L Q E I H I I	240
721	CTT GAA TCC TCA GAC TTC TTC AAG CGA CAT GAG GTC GTT GGA AGT	765
241	L E S S D F F K R H E V V G S	255
766	TCA CTA CTT TTT GTA CAT GAT GGC AGT GGG AAT GCC AAT GTG TGG	810
256	S L L F V H D G S G N A N V W	270
811	CTG ATT GAT TTT GGG AAG ACC ACC CTT CTC CCT GAT GGG CAG ACG	855
271	L I D F G K T T L L P D G Q T	285
856	CTG GAT CAT AGG ATC CCC TGG CAA GAA GGC AAC AGG GAG GAT GGA	900
286	L D H R I P W Q E G N R E D G	300
901	TAC TTG TTG GGA CTG GAC AAT TTG ATT CGC ATC TTG GAA AGC ATC	945
301	Y L L G L D N L I R I L E S I	315
946	ACT GAA AGA TGA	
316	T E R *	

Abbildung 3.3

cDNA- und AS-Sequenz des auf pET-17b-GIK codierten Proteins

hellgrau: von Vektorsequenz abgeleitete AS

dunkelgrau: LC13-spez. Exon  
blau: Calmodulin-Bindungsdomäne

grün: katalytische Domäne

### 3.1.1.2 pET-17b-SiS6 [Süße, 1998]

Dieses Plasmid (hergestellt von Silke Süße (1998)) erlaubt die prokaryotische Expression eines N-terminal trunkierten, die Calmodulin-Bindungsdomäne sowie die katalytische Domäne umfassenden Fragmentes der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3 – Kinase Isoform B aus Homo sapiens.

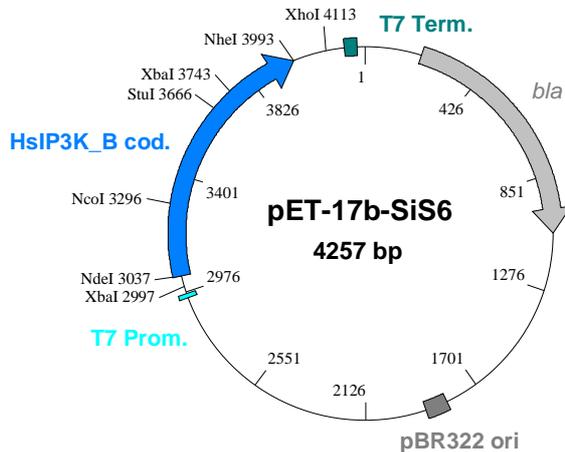


Abbildung 3.4

Schematische Darstellung des Vektors pET-17b-SiS6; dargestellt sind der T7-Promotor, der T7-Terminator-Bereich, der pBR322 ori, die für den Selektionsmarker  $\beta$ -Laktamase codierende Region (*bla*) sowie einige, für nachfolgend beschriebene Klonierungen benutzte Schnittstellen (*Xba* I, *Nde* I, *Nco* I, *Nhe* I, *Stu* I, *Xho* I). Das einklonierte cDNA-Fragment ist blau dargestellt und beinhaltet ausschließlich ein Fragment des codierenden Bereichs der humanen Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase Isoform B.

Das Plasmid wurde im Rahmen einer Diplomarbeit von Silke Süße erzeugt. Unter Verwendung eines durch RT-PCR auf aus TF-1 Zellen isolierter RNA generierten Templates wurde ein 976 bp großes Fragment mittels PCR (Primer SB6, SB7) amplifiziert und über die durch die Primersequenzen eingeführte Schnittstellen (*Nde* I, *Nhe* I) in den Vektor pET-17b einligiert. Die einklonierte cDNA codiert für ein 317 Aminosäurereste umfassendes Protein (AA 631 – 946 der HsIP3K-B-Volllänge; errechnetes Molekulargewicht 37 kDa), dessen Sequenz und Domänenstruktur aus Abbildung 3.5 entnommen werden kann.

1	ATG TCA GCT TTC CTG CAT ACC CTG GAC CAG CAG AAA CCT AGA GTG	45
1	<b>M S A F L H T L D Q Q K P R V</b>	15
46	AGC AAA TCA TGG AGG AAG ATA AAA AAC ATG GTG CAC TGG TCT CCC	90
16	<b>S K S W R K I K N M V H W S P</b>	30
91	TTC GTC ATG TCC TTC AAG AAG AAG TAC CCC TGG ATC CAG CTG GCA	135
31	<b>F V M S F K K K Y P W I Q L A</b>	45
136	GGA CAC GCA GGG AGT TTC AAG GCA GCT GCC AAT GGC AGG ATC CTG	180
46	<b>G H A G S F K A A A N G R I L</b>	60
181	AAG AAG CAC TGT GAG TCA GAG CAG CGC TGC CTG GAC CGG CTG ATG	225
61	<b>K K H C E S E Q R C L D R L M</b>	75
226	GTG GAT GTG CTG AGG CCC TTC GTA CCT GCC TAC CAT GGG GAT GTG	270
76	<b>V D V L R P F V P A Y H G D V</b>	90

## 3.1 Ergebnisse

271	GTG AAG GAC GGG GAG CGC TAC AAC CAG ATG GAC GAC CTG CTG GCC	315
91	V K D G E R Y N Q M D D L L A	105
316	GAC TTC GAC TCG CCC TGT GTG ATG GAC TGC AAG ATG GGA ATC AGG	360
106	D F D S P C V M D C K M G I R	120
361	ACC TAC CTG GAG GAG GAG CTC ACG AAG GCC CGG AAG AAG CCC AGC	405
121	T Y L E E E L T K A R K K P S	135
406	CTG CGG AAG GAC ATG TAC CAG AAG ATG ATC GAG GTG GAC CCC GAG	450
136	L R K D M Y Q K M I E V D P E	150
451	GCC CCC ACC GAG GAG GAA AAA GCA CAG CGG GCT GTG ACC AAG CCA	495
151	A P T E E E K A Q R A V T K P	165
496	CGG TAC ATG CAG TGG CGG GAG ACC ATC AGC TCC ACG GCC ACC CTG	540
166	R Y M Q W R E T I S S T A T L	180
541	GGG TTC AGG ATC GAG GGA ATC AAG AAA GAA GAC GGC ACC GTG AAC	585
181	G F R I E G I K K E D G T V N	195
586	CGG GAC TTC AAG AAG ACC AAA ACG AGG GAG CAG GTC ACC GAG GCC	630
196	R D F K K T K T R E Q V T E A	210
631	TTC AGA GAG TTC ACT AAA GGA AAC CAT AAC ATC CTG ATC GCC TAT	675
211	F R E F T K G N H N I L I A Y	225
676	CGG GAC CGG CTG AAG GCC ATT CGA ACC ACT CTA GAA GTT TCT CCC	720
226	R D R L K A I R T T L E V S P	240
721	TTC TTC AAG TGC CAC GAG GTC ATT GGC AGC TCC CTC CTC TTC ATC	765
241	F F K C H E V I G S S L L F I	255
766	CAC GAC AAG AAG GAA CAG GCC AAA GTG TGG ATG ATC GAC TTT GGG	810
256	H D K K E Q A K V W M I D F G	270
811	AAA ACC ACG CCC CTG CCT GAG GGC CAG ACC CTG CAG CAT GAC GTC	855
271	K T T P L P E G Q T L Q H D V	285
856	CCC TGG CAG GAG GGG AAC CGG GAG GAT GGC TAC CTC TCG GGG CTC	900
286	P W Q E G N R E D G Y L S G L	300
901	AAT AAC CTC GTC GAC ATC CTG ACC GAG ATG TCC CAG GAT GCC CCA	945
301	N N L V D I L T E M S Q D A P	315
946	CTC GCC TGA	
316	L A *	

Abbildung 3.5: cDNA- und AS-Sequenz des auf pET-17b-SiS6 codierten Proteins

blau: Calmodulin-Bindungsdomäne

grün: katalytische Domäne

3.1.1.3 pSK-A, pSK-B, pSK-C

Diese Plasmide ermöglichen die prokaryotische Expression der katalytischen Domänen der Gg Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase Isoform A (pSK-A), der Hs Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase Isoform B (pSK-B) bzw. der Rn Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase Isoform C (pSK-C) als StrepTagII-Fusionsproteine.

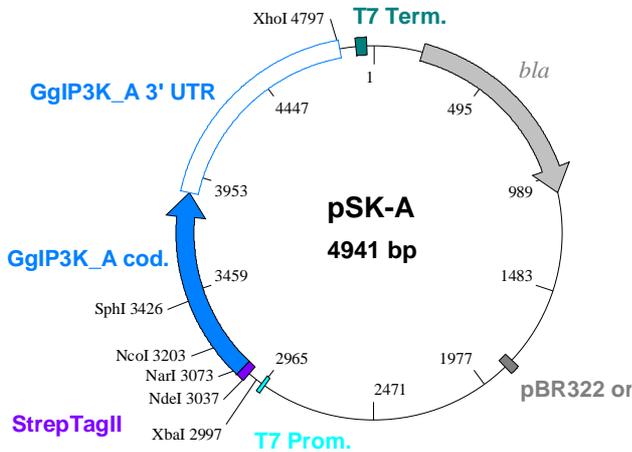


Abbildung 3.6

Schematische Darstellung des Vektors pSK-A; dargestellt sind der T7-Promotor, der T7-Terminator-Bereich, der pBR322 ori, die für den Selektionsmarker  $\beta$ -Laktamase codierende Region (*bla*) sowie einige, für nachfolgend beschriebene Klonierungen benutzte Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen (*Xba* I, *Nar* I, *Nde* I, *Nco* I, *Sph* I, *Xho* I). Das inklonierte IP3K-cDNA-Fragment ist blau dargestellt und beinhaltet ausschließlich ein Fragment des codierenden Bereichs der Gg Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase Isoform A; die im korrekten Leserahmen davor inklonierte für das StrepTagII codierende cDNA ist violett eingezeichnet.

Zunächst wurde das Plasmid pSK-A wie folgt hergestellt:

Durch Annealing der Primer StrepTagII-Nde/Nco und StrepTagII-Nco/Nde wurde ein 47 bp langes, doppelsträngiges DNA-Fragment mit zu *Nde* I bzw. *Nco* I – generierten Überhängen kompatiblen einzelsträngigen Enden erzeugt. Dieses wurde sodann in den mit diesen Restriktionsendonukleasen spezifisch hydrolysierten pET-17b-GIK Vektor einligiert. Das auf diese Weise hergestellte 4825 bp große Plasmid pEGIK-StrepTagII-21kD wurde nun mit *Sph* I und dem *Nar* I – Isoschizomer *Ehe* I verdaut und ein mit den Primern RP24 und GalP3K-31kD-5' erzeugtes, *Ehe* I / *Sph* I restringiertes PCR-Produkt einligiert. Als Template für die genannte PCR-Reaktion wurde der Vektor pGEM3z-IP3K-Xba/Sph (2.1.6) verwendet.

Die auf diese Weise in den Vektor klonierte cDNA codiert für ein 282 Aminosäuren großes, die Aminosäuren 184 – 452 der GgIP3K-A-Volllänge umfassendes StrepTagII-Fusions-Protein (errechnetes Molekulargewicht 32 kDa), welches mittels einer StrepTactin-Sepharose Matrix aus dem Bakterienlysat aufgereinigt werden kann.

1	ATG GCT AGC TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA GGC GCC GCT GGA	45
1	M A S W S H P Q F E K G A A G	15
46	CAT ACA GGG AGT TTC AAG GCA GCT GAT AGT GGT AAG ATT CTC AAA	90
16	H T G S F K A A D S G K I L K	30
91	CGC TTC TCA GAG AAT GAA AAA GAG TGT TTT GAG CGA TTG ATG AAA	135
31	R F S E N E K E C F E R L M K	45
136	GAC CCA CTA CGA TCC TGC GTC CCT TGC TTC CAT GGT GTG GTG GAA	180
46	D P L R S C V P C F H G V V E	60
181	AGA GAT GGA GAG ACC TAC ATT CAG CTG GAT GAT TTG CTT ACT GAT	225

Abbildung 3.7: cDNA- und AS-Sequenz des auf pSK-A codierten Proteins  
pink: StrepTagII  
grün: katalytische Domäne

### 3.1 Ergebnisse

61	R D G E T Y I Q L D D L L T D	75
226	TTT GAA GGG CCG TGT GTG ATG GAC TGT AAG ATG GGG ATC AGG ACA	270
76	F E G P C V M D C K M G I R T	90
271	TAC CTG GAA GAA GAG CTG ACT AAA GCC CGT GAG AAA CCA AAG CTG	315
91	Y L E E E L T K A R E K P K L	105
316	CGT AAA GAC ATG TAC AAG AAA ATG ATT GAA GTG GAT CCT CTT GCT	360
106	R K D M Y K K M I E V D P L A	120
361	CCT ACA GCT GAG GAG AAT GCC CAG CAT GCT GTC ACC AAG CCC CGA	405
121	P T A E E N A Q H A V T K P R	135
406	TAC ATG CAG TGG AGG GAA ACA ATC AGC TCT AGT GCC AAC CTG GGC	450
136	Y M Q W R E T I S S S A N L G	150
451	TTT AGG ATT GAA GGG ATT AAG AAA GCA GAT GGA ACA TGC AAC ACA	495
151	F R I E G I K K A D G T C N T	165
496	AAC TTC AAA ACT ACG AAG ACA CAG GAG CAA GTT CTC CAG GTT TTT	540
166	N F K T T K T Q E Q V L Q V F	180
541	GTG GAA TTC ATT GAG GGC AAC ACA ACT ATT CTG AAA AAA TAC CTC	585
181	V E F I E G N T T I L K K Y L	195
586	AAG CGT CTG CAG GAA ATT CAT ATC ATT CTT GAA TCC TCA GAC TTC	630
196	K R L Q E I H I I L E S S D F	210
631	TTC AAG CGA CAT GAG GTC GTT GGA AGT TCA CTA CTT TTT GTA CAT	675
211	F K R H E V V G S S L L F V H	225
676	GAT GGC AGT GGG AAT GCC AAT GTG TGG CTG ATT GAT TTT GGG AAG	720
226	D G S G N A N V W L I D F G K	240
721	ACC ACC CTT CTC CCT GAT GGG CAG ACG CTG GAT CAT AGG ATC CCC	765
241	T T L L P D G Q T L D H R I P	255
766	TGG CAA GAA GGC AAC AGG GAG GAT GGA TAC TTG TTG GGA CTG GAC	810
256	W Q E G N R E D G Y L L G L D	270
811	AAT TTG ATT CGC ATC TTG GAA AGC ATC ACT GAA AGA TGA	
271	N L I R I L E S I T E R *	

Entsprechende, zur prokaryotischen Expression der katalytischen Domänen der HsIP3K-B bzw. der RnIP3K-C verwendbare Expressionsplasmide wurden durch Amplifikation der entsprechenden cDNA unter Verwendung der Primer SB7 und HsIP3K-B/5'-Ehe bzw. RP24 und RnIP3K-C/5'-Ehe (siehe Abschnitt 2.1), Zwischenklonierung der erhaltenen Amplifikate in pZero2.1 bzw. pGEM-T Easy und anschließende Umklonierung über *Ehe* I / *Xho* I in den oben beschriebenen Vektor erhalten. Die auf diesen Vektoren (pSK-B bzw. pSK-C) codierten Fusionsproteine sind analog dem auf pSK-A codierten Protein aufgebaut und umfassen neben dem StrepTagII und einer kurzen Linkersequenz die Aminosäuren 674 – 946 (Isoform B) bzw. 410 – 678 (Isoform C) der jeweiligen Vollängenproteine.

### 3.1.2 Herstellung gezielt mutierter IP3K-Expressionsvektoren

Basierend auf den Vektoren pET-17b-GIK, pSK-A, sowie pET-17b-SiS6 wurde eine Anzahl gezielt mutagenisierter Plasmide hergestellt, welche die prokaryotische Expression rekombinanter Proteine ermöglichen, die sich lediglich in einem, in einigen Fällen auch zwei Aminosäureresten von dem auf dem Ausgangsplasmid codierten wt- Fragment unterscheiden. Der nachfolgende Abschnitt 3.1.2.1 bietet in Form von Tabellen eine kurze Zusammenfassung aller dieser mutagenisierten Plasmide; im Abschnitt 3.1.2.2 ist für die zwei in dieser Arbeit angewandten Mutagenesemethoden (PCR-Mutagenese nach ([Picard et al., 1994], QuikChange-PCR-Mutagenese) die Herstellung jeweils eines gezielt mutierten Plasmides exemplarisch im Detail dargelegt.

#### 3.1.2.1 Übersicht über die hergestellten mutierten IP3K-Expressionsvektoren

**Tabelle 3.1: Gezielt mutierte pET-17b-GIK-Vektoren;** angegeben ist jeweils der durch die Mutagenese bedingte Aminosäureaustausch (Nummerierung bezüglich der GgIP3K-A-Volllängenform) sowie die für die Mutagenese eingesetzte Methode (P = PCR-Megaprimer-Mutagenese gemäß [Picard et al., 1994], QC = QuikChange-PCR-Mutagenese (Stratagene)). Bei allen durch QuikChange-PCR-Mutagenese hergestellten Konstrukten diente der Vektor pET-17b-GIK als Template; bei den durch PCR-Mutagenese nach [Picard et al., 1994] wurden neben dem jeweils benutzten Template sowohl die für die Mutagenese-PCR benutzten flankierenden Primer als auch der für die Zwischenklonierung der PCR-Produkte benutzte Vektor, die für die Zwischenklonierung benutzten Restriktionsschnittstellen und die für die Umklonierung der mutagenisierten Fragmente in den Vektor pET-17b-GIK benutzten Endonucleasen angegeben. Der/die jeweils verwendeten, die gewünschte(n) Mutation(en) einführenden Mutageneseprimer können unter der Bezeichnung der jeweiligen Mutation im Abschnitt 2.1.8 (Material; Oligonukleotide) eingesehen werden; dort finden sich ebenfalls die Sequenzinformationen zu den angegebenen flankierenden Primern. Mit \* gekennzeichnete Mutanten wurden bisher nur auf DNA-Ebene hergestellt und prokaryotisch exprimiert; eine enzymkinetische Charakterisierung steht noch aus. Bei den mit \*\* gekennzeichneten Mutanten wurde die entsprechende Plasmid-DNA zu Beginn der Arbeit von Prof. Mayr und Dr. Bertsch zur Verfügung gestellt.

Mutation	Methode	Flanking Primer	Template	kloniert in/über	umkloniert mit
K176L	P	1: NP24 2: RP24	pGEM3z-IP3K- Xba/Sph	pGEM3z Xba I / Sph I	Xba I / Sph I
C209S**	P	1: RP24 2: NP24	pGEM3z-IP3K- Xba/Sph	pGEM3z Xba I / Hind III	Xba I / Sph I
C221S**	P	1: RP24 2: NP24	pGEM3z-IP3K- Xba/Sph	pGEM3z Xba I / Hind III	Xba I / Sph I
C224S**	P	1: RP24 2: NP24	pGEM3z-IP3K- Xba/Sph	pGEM3z Xba I / Sph I	Xba I / Sph I

### 3.1 Ergebnisse

D240A/D241A	P	1: RP24 2: NP24	pGEM3z-IP3K- Xba/Sph	pGEM3z Xba I / Hind III	Xba I / Sph I
D245A	P	1: RP24 2: NP24	pGEM3z-IP3K- Xba/Sph	pZero™-2.1 EcoR V	Xba I / Sph I
F246L	P	1: RP24 2: NP24	pGEM3z-IP3K- Xba/Sph	pZero™-2.1 EcoR V	Xba I / Sph I
E247L	P	1: RP24 2: NP24	pGEM3z-IP3K- Xba/Sph	pZero™-2.1 EcoR V	Xba I / Sph I
D245A/E247A	P	1: RP24 2: NP24	pGEM3z-IP3K- Xba/Sph	pGEM3z Xba I / Hind III	Xba I / Sph I
C250S**	P	1: RP24 2: NP24	pGEM3z-IP3K- Xba/Sph	pGEM3z Xba I / Hind III	Xba I / Sph I
C254S**	P	1: RP24 2: NP24	pGEM3z-IP3K- Xba/Sph	pGEM3z Xba I / Hind III	Xba I / Sph I
K255N	P	1: RP24 2: NP24	pGEM3z-IP3K- Xba/Sph	pGEM3z Xba I / Hind III	Xba I / Sph I
K255A	P	1: RP24 2: NP24	pGEM3z-IP3K- Xba/Sph	pGEM3z Xba I / Hind III	Xba I / Sph I
K255R	P	1: RP24 2: NP24	pGEM3z-IP3K- Xba/Sph	pGEM3z Xba I / Hind III	Xba I / Sph I
R259N	P	1: RP24 2: NP24	pGEM3z-IP3K- Xba/Sph	pGEM3z Xba I / Hind III	Xba I / Sph I
E263Q**	P	1: RP24 2: NP24	pGEM3z-IP3K- Xba/Sph	pGEM3z Xba I / Hind III	Xba I / Sph I
T267A**	P	1: RP24 2: NP24	pGEM3z-IP3K- Xba/Sph	pGEM3z Xba I / Hind III	Xba I / Sph I
K268E**	P	1: RP24 2: NP24	pGEM3z-IP3K- Xba/Sph	pGEM3z Xba I / Hind III	Xba I / Sph I
R270L	P	1: RP24 2: NP24	pGEM3z-IP3K- Xba/Sph	pGEM3z Xba I / Hind III	Xba I / Sph I
K272D	P	1: RP24 2: NP24	pGEM3z-IP3K- Xba/Sph	pGEM3z Xba I / Hind III	Xba I / Sph I
K272R	P	1: RP24 2: NP24	pGEM3z-IP3K- Xba/Sph	pGEM3z Xba I / Hind III	Xba I / Sph I
K274Q	P	1: RP24 2: NP24	pGEM3z-IP3K- Xba/Sph	pGEM3z Xba I / Hind III	Xba I / Sph I

### 3.1 Ergebnisse

R276L**	P	1: RP24 2: NP24	pGEM3z-IP3K- Xba/Sph	pGEM3z Xba I / Hind III	Xba I / Sph I
R276K	P	1: RP24 2: NP24	pGEM3z-IP3K- Xba/Sph	pGEM3z Xba I / Hind III	Xba I / Sph I
K277Q	P	1: RP24 2: NP24	pGEM3z-IP3K- Xba/Sph	pGEM3z Xba I / Sph I	Xba I / Sph I
D278H**	P	1: RP24 2: NP24	pGEM3z-IP3K- Xba/Sph	pGEM3z Xba I / Hind III	Xba I / Sph I
K282L	P	1: RP24 2: NP24	pGEM3z-IP3K- Xba/Sph	pGEM3z Xba I / Hind III	Xba I / Sph I
T302D	P	1: RP24 2: NP24	pBluescript- IP3K-UB24/40	pZero™-2.1 EcoR V	Sph I / Hind III
K303Q	P	1: RP24 2: NP24	pBluescript- IP3K-UB24/40	pZero™-2.1 EcoR V	Sph I / Xho I
R305L	P	1: RP24 2: NP24	pBluescript- IP3K-UB24/40	pZero™-2.1 EcoR V	Sph I / Xho I
R310L*	QC	----	pET-17b-GIK	----	----
L319A*	QC	----	pET-17b-GIK	----	----
F321A*	QC	----	pET-17b-GIK	----	----
F321D*	QC	----	pET-17b-GIK	----	----
R322L	P	1: RP24 2: NP24	pBluescript- IP3K-UB24/40	pBluescript Xba I / Sac I	Sph I / Xho I
R322K	P	1: RP24 2: NP24	pBluescript- IP3K-UB24/40	pZero™-2.1 EcoR V	Sph I / Xho I
I323A*	QC	----	pET-17b-GIK	----	----
I326A*	QC	----	pET-17b-GIK	----	----
K327Q	P	1: RP24 2: NP24	pBluescript- IP3K-UB24/40	pBluescript Xba I / Sac I	Sph I / Xho I
K328L	P	1: RP24 2: NP24	pBluescript- IP3K-UB24/40	pZero™-2.1 EcoR V	Sph I / Xho I
W404Q**	P	1: UB40 2: UB24	pET-17b-GIK	pBluescript Sac I / Xba I	Sph I / Xho I
D407S	P	1: UB40 2: UB24	pET-17b-GIK	pBluescript Sac I / Xba I	Sph I / Xho I

**Tabelle 3.2: gezielt mutierte pSK-A – Vektoren;** diese Plasmide wurden entweder durch Quik-Change-PCR-Mutagenese (Template: wt-pSK-A, verwendete mutationsspezifische Oligonukleotide: siehe Abschnitt 2.1.8) hergestellt oder durch Umklonierung geeigneter Fragmente aus bereits bestehenden, gezielt mutagenisierten pET-17b-GIK basierten Vektoren in den entsprechend restringierten Vektor pSK-A (wt) erhalten. Die vorliegende Tabelle zeigt für jede Mutante die zur Herstellung des entsprechenden Expressionsplasmides verwendete Methode sowie gegebenenfalls die zur Umklonierung in den Vektor pSK-A benutzten Endonucleasen. Mit \* gekennzeichnete Mutanten wurden bisher nur auf DNA-Ebene hergestellt und prokaryotisch exprimiert; eine enzymkinetische und NMR-spektroskopische Charakterisierung steht noch aus.

Mutante	Methode	Umkloniert mit
K255A*	Umklonieren aus pET-17b-GIK-K255A	<i>Nco</i> I / <i>Sph</i> I
R276L	Umklonieren aus pET-17b-GIK-R276L	<i>Nco</i> I / <i>Sph</i> I
R276Q*	QC	----
K303Q	Umklonieren aus pET-17b-GIK-K303Q	<i>Sph</i> I / <i>Xho</i> I
R310L*	Umklonieren aus pET-17b-GIK-R310L	<i>Sph</i> I / <i>Xho</i> I
L319A*	Umklonieren aus pET-17b-GIK-L319A	<i>Sph</i> I / <i>Xho</i> I
R322L	Umklonieren aus pET-17b-GIK-R322L	<i>Sph</i> I / <i>Xho</i> I
R322Q*	QC	----

**Tabelle 3.3: gezielt mutierte pET-17b-SiS6 – Vektoren;** die Vektoren wurden entweder über PCR-Mutagenese nach [Picard et al., 1994] („P“) oder gemäß dem QuikChange-Protokoll der Firma Stratagene erzeugt. Die Sequenzen der jeweiligen mutationsspezifischen Oligonukleotide (Mutageneseprimer) können im Abschnitt 2.1.8 (Material: Oligonukleotide) eingesehen werden; bei den nach [Picard et al., 1994] erzeugten mutierten Plasmiden wurden das für die PCR eingesetzte Template, die verwendeten flankierenden Primer (Sequenzinformation hierzu: siehe Abschnitt 2.1.8), der für die Zwischenklonierung der PCR-Fragmente verwendete Vektor sowie die für die Umklonierung der mutierten Fragmente in den wt-Expressionsvektor pET-17b-SiS6 benutzten Restriktionsendonucleasen angegeben. Bisher wurde nur die Mutante S764D enzymkinetisch charakterisiert.

Mutante	Methode	Flanking Primer	Template	kloniert in/über	Umkloniert mit
S764A	S	1: HsIP3K-B-NcoI-F 2: HsIP3K-B-StuI-R	pET-17b-SiS6	pZero™-2.1 blunt	<i>Nco</i> I / <i>Stu</i> I
S764D	S	1: HsIP3K-B-NcoI-F 2: HsIP3K-B-StuI-R	pET-17b-SiS6	pGEM-T Easy	<i>Nco</i> I / <i>Stu</i> I
S764E	S	1: HsIP3K-B-NcoI-F 2: HsIP3K-B-StuI-R	pET-17b-SiS6	pGEM-T Easy	<i>Nco</i> I / <i>Stu</i> I
S647D	QC	----	pET-17b-SiS6	----	----

S663D	QC	----	pET-17b-SiS6	----	----
S679D	QC	----	pET-17b-SiS6	----	----
S764D/S647D	QC	----	pET-17b-SiS6-S764D	----	----
S764D/S663D	QC	----	pET-17b-SiS6-S764D	----	----
S764D/S679D	QC	----	pET-17b-SiS6-S764D	----	----

### 3.1.2.2 Exemplarische Beschreibung der angewendeten Mutagenesetechniken

#### 3.1.2.2.1 PCR-Megaprimer-Mutagenese nach [Picard et al., 1994]

Die Ergebnisse werden hier exemplarisch für das Plasmid pET-17b-GIK-K255A dargestellt; für alle anderen mittels dieser Methode erzeugten mutierten Plasmide gilt Analoges mit den in den obigen Tabellen aufgeführten Templates, flankierenden Primern, Zwischenklonierungsstrategien und Umklonierungen.

#### Erzeugung gezielt mutierter cDNA-Fragmente mittels PCR

Zur gezielte Mutagenese des Plasmids pET-17b-GIK wurde zunächst eine Mutagenese-PCR-Reaktion nach [Picard et al., 1994] durchgeführt. Als Template diente das Plasmid pGEM3z-IP3K-Xba/Sph, welches ein Fragment der codierenden Region der GgIP3K-A beinhaltet (siehe Kapitel 2.1.6). In den ersten 10 Zyklen der insgesamt 30 Zyklen umfassenden PCR-Reaktion wurde zunächst durch den Einsatz des auf der Sequenz des Vektors pGEM-3z primenden Oligonukleotids RP24 und des (an den gewünschten Stellen mismatch aufweisenden) GgIP3KA-cDNA-spezifischen Primers GIK-K255A der 206 bp umfassende Megaprimer synthetisiert. Dieser fungierte in den nächsten 10 Zyklen der PCR-Reaktion als Gegenprimer zu dem ebenfalls einem Abschnitt der Sequenz des Vektors pGEM-3z entsprechenden Primers NP24. Das auf diese Weise amplifizierte 688 bp Fragment wurde sodann in den letzten 10 Zyklen der Reaktion durch nochmalige Zugabe des Primers RP24 weiter vermehrt. Die Abbildung 3.8 zeigt in Lane 1 die analytische Auftrennung eines Aliquots (1/5 des Gesamtansatzes) eines solchen Mutagenese-PCR-Ansatzes; bei der mit einem Pfeil gekennzeichneten Bande handelt es sich um das gewünschte 688 bp große Amplifikat, bei der Bande im Längenbereich < 310 bp um nicht in der Reaktion aufgebrauchten Megaprimer. Die Mengen des nicht verbrauchten Megaprimers variierten sehr stark zwischen den verschiedenen, mit dieser Methode erzeugten mutierten Fragmenten; da aber bei ausreichender Bil-

dung vollständigen Amplifikats die Menge des nicht verbrauchten Megaprimers für die nachfolgenden analytischen und präparativen Schritte irrelevant ist, wurde hier keine weitere Optimierung der PCR-Reaktionsbedingungen vorgenommen.

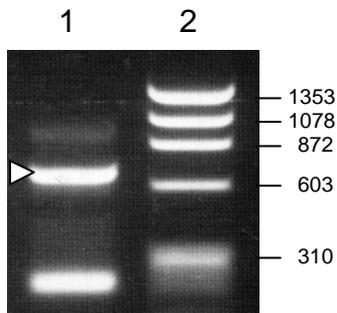


Abbildung 3.8

Analytische gelelektrophoretische Auftrennung des Mutagenese-PCR-Ansatzes auf einem 1 % TAE-Agarosegel;

Lane 1: PCR-Ansatz,  
Lane 2: DNA-Längenstandard.

Das weiterbearbeitete Amplikon ist in Lane 1 durch einen Pfeil markiert; bei der 206 bp großen Bande handelt es sich um nicht verbrauchte Megaprimere.

Der verbliebene PCR-Reaktionsansatz wurde nun mit Hilfe des PCR Purification Kits QIAquick von enthaltenen Salzen und Proteinen gereinigt.

### Analytischer Restriktionsverdau des erhaltenen Amplifikats

Wie im Methodenteil beschrieben, erhält man bei der hier beschriebenen Methode der PCR-Mutagenese stets auch einen bestimmten Bruchteil unmutierter (und somit der WT-Sequenz entsprechender) Fragmente. Eine semiquantitative Beurteilung der Effizienz der Mutagenese kann bereits auf der Stufe des synthetisierten PCR-Produktes erfolgen, da die Mutageneseprimer stets so designt wurden, dass neben den den gewünschten Aminosäureaustausch bedingenden Veränderungen auch durch sich nicht auf Aminosäureebene ausprägende „silent mutations“ neue Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen geschaffen wurden (bzw. vorhandene Restriktionsstellen eliminiert wurden). Im Falle der Mutante K255A wurde eine *Fsp I* – Restriktionsstelle neu eingeführt; Lane 1 in Abbildung 3.9 zeigt den analytischen *Fsp I* - Verdau eines Aliquots des gereinigten PCR-Produktes. Neben der ursprünglichen Produktbande bei 688 bp und Spuren des in der Reaktion nichtverbrauchten Megaprimers (206 bp) treten eine weitere Bande bei 491 bp sowie eine (aufgrund der fast mit der Länge des Megaprimers identischen Länge nur schwer zu detektierende) Bande bei 197 bp auf (gekennzeichnet durch Pfeile in Abb. 3.9). Da die *Fsp I* – Schnittstelle lediglich in erfolgreich mutierten Fragmenten vorkommt und die Bedingungen des Restriktionsverdaus so gewählt wurden, dass von einem quantitativen Ablauf der hydrolytischen Spaltung der im Ansatz vorhandenen DNA ausgegangen werden konnte, zeigt dieses Ergebnis, dass in der Tat ein Teil (ca. 60 %) der in der PCR-Reaktion synthetisierten Fragmente die gewünschte Mutation aufweist. Die für die verschiedenen eingeführten Mutationen beobachteten Mutageneseeffizienzen variierten sehr stark (zwischen ca. 20 % und 90 %); gute Effizienz wurde vor allem bei Fragmenten, die auf der Basis relativ kurzer Megaprimere (< 200 bp) synthetisiert wurden, erreicht.

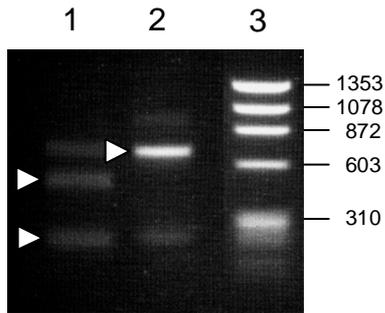


Abbildung 3.9  
Analytisches 1 % TAE-Agarosegel;  
Lane 1: analytischer *Fsp* I - Verdau des 688 bp-  
Amplifikates;  
Lane 2: unverdautes 688 bp- Amplifikat;  
Lane 3: DNA-Längenstandard;  
im Text diskutierte Banden sind durch Pfeile markiert.

### Zwischenklonierung der PCR-Amplifikate, Auswahl mutierter Klone

Um die erzeugten Fragmente sicherzustellen und eine komplette Sequenzierung der Amplifikate unter Verwendung von Standardprimern (NP24, RP24) zu ermöglichen, wurden die erhaltenen Amplifikate zunächst in geeignete Klonierungsvektoren (pBluescript<sup>R</sup> II SK+, pGEM3z, pZerO<sup>TM</sup>-2.1, pGEM-T Easy) einligiert. In dem hier exemplarisch gezeigten Fall der Mutation K255A wurden hierzu sowohl der Vektor pGEM-3z-IP3K-Xba/Sph als auch das gereinigte PCR-Produkt präparativ mit den Restriktionsendonukleasen *Xba* I und *Hind* III verdaut. Die Ansätze wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe Abb. 3.10 und 3.11) und die jeweils in die Ligation einzusetzenden Fragmente (2721 bp bei pGEM-3z-IP3K-Xba/Sph – Verdau, 551 bp bei Verdau des PCR-Amplifikates; in den Abbildungen 3.10 und 3.11 mit Pfeilen gekennzeichnet) aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des QuiaexII-Kits aus dem Gel gereinigt (siehe Abb. 3.12).

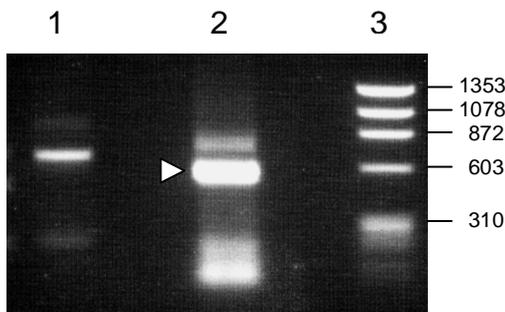


Abbildung 3.10  
Präparatives 1 % TAE-Agarosegel;  
Lane 1: 688 bp Amplifikat, unverdaut;  
Lane 2: 688 bp Fragment, *Xba* I / *Hind* III restringiert;  
Lane 3: DNA-Längenstandard;  
das für die Zwischenklonierung weiterzuverwendende  
Fragment ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

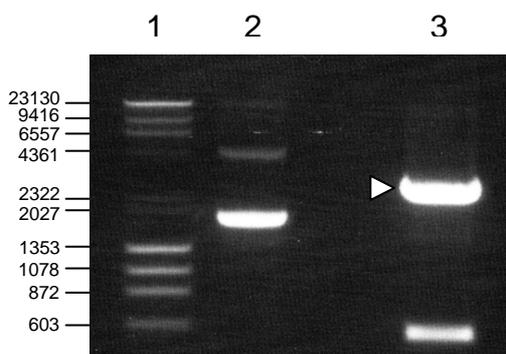


Abbildung 3.11  
Präparatives 1 % TAE-Agarosegel;  
Lane 1: DNA-Längenstandard;  
Lane 2: pGEM3z-IP3K-Xba/Sph, unverdaut;  
Lane 3: pGEM3z-IP3K-Xba/Sph, *Xba* I / *Hind* III –  
restringiert;  
das für die Zwischenklonierung der IP3K-  
Amplikons weiterzuverwendende Fragment ist  
durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Der Erfolg der Aufreinigung wurde sodann durch analytische gelelektrophoretische Auftrennung von Aliquots der Geleluate überprüft (siehe Abb. 3.12); die DNA-Konzentration der Geleluate konnte anhand dieser Gele mit für den Erfolg der Ligationsreaktion hinreichender Genauigkeit abgeschätzt werden.

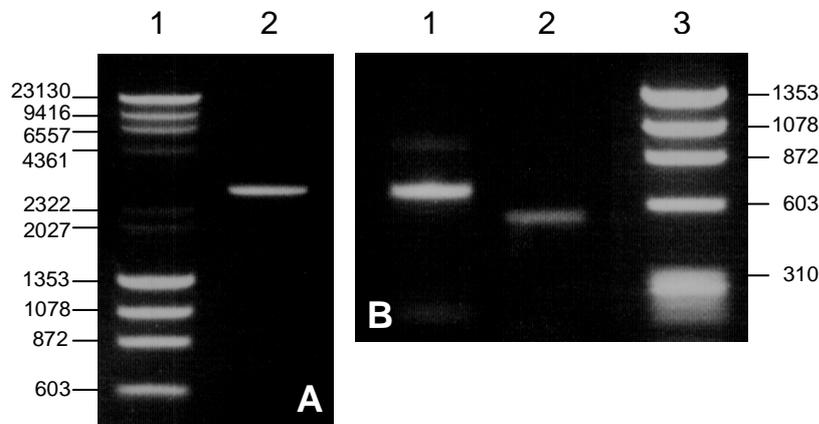


Abbildung 3.12: Analytische Gelelektrophoresen zur Überprüfung der Gelextraktionen;  
 Gel A: 1 % TAE-Agarosegel; Lane 1: DNA-Längenstandard,  
 Lane 2: pGEM3z-IP3K-Xba/Sph *Xba* I / *Hind* III restringiert;  
 Gel B: 1% TAE-Agarosegel; Lane 1: unverdautes Amplifikat;  
 Lane 2: Amplifikat *Xba* I / *Hind* III restringiert;  
 Lane 3: DNA-Längenstandard

Die extrahierten Fragmente wurden gemäß der im Kapitel 2.2.2.11 gegebenen Vorschrift in einer Ligationsreaktion mit T4-DNA-Ligase eingesetzt; nach erfolgter Inkubation wurden die in den Ligationsansätzen generierten rekombinanten Plasmide in transformationskompetente *E.coli* Bakterien (Stamm XL1 blue) eingebracht (Kapitel 2.2.1.4). Durch das Ausplattieren der Transformationsansätze auf ein geeignetes Antibiotikum (im hier exemplarisch beschriebenen Spezialfall: Ampicillin) enthaltenden LB-Agarplatten wurden einzelne Kolonien erhalten. Im Falle einer zu erwartenden schlechten Mutageneseeffizienz erfolgte die Analyse der so erhaltenen Bakterienklone zunächst durch ein PCR-Screening mit anschließendem, mutationsspezifischen Restriktionsverdau; bei einer anhand des analytischen Verdau des PCR-Fragmentes nachgewiesenen ausreichend hohen Effizienz der Mutagenese-Reaktion (wie in dem hier exemplarisch dokumentierten Fall der Mutante K255A) wurde auf diesen Zwischenschritt verzichtet und die Plasmid-DNA einiger ausgewählter Klone direkt durch Plasmid-Minipräparation isoliert. Die Analyse der so gewonnenen Vektoren erfolgte sodann zunächst durch verschiedene analytische Restriktionsverdau. Im Falle der Mutante K255A wurde zum einen durch einen analytischen Restriktionsverdau mit *Xba* I / *Hind* III die korrekte Größe des einligierten Inserts überprüft (539 bp), zum anderen wurden die isolierten Plasmide durch eine analytische Restriktion mit *Fsp* I auf das Vorhandensein der gewünschten Mutation hin untersucht. Dieser Schritt ist besonders wichtig, da aufgrund des durch die Methode selbst bedingten Vorhandenseins unmutierter Fragmente im Mutagenese-PCR-Ansatz ein

bestimmter, der Mutagenese-Effizienz entsprechender Prozentsatz der analysierten Klone stets auch die nichtmutierte Wildtyp-cDNA beinhaltet. Da der Vektor pGEM3z selbst zwei *Fsp I* – Restriktionsstellen aufweist, wären im Falle eines wt-Inserts zwei Fragmente zu beobachten (1023 bp und 2235 bp); bei einem wie gewünscht mutierten Insert ergibt sich hingegen aufgrund der durch den Mutageneseprimer neu eingeführten, zusätzliche *Fsp I* – Schnittstelle ein wie in Abbildung 3.13 (Lane 4) dargestellt durch drei Fragmente der Längen 1642 bp, 1023 bp und 593 bp charakterisiertes Verdauemuster.

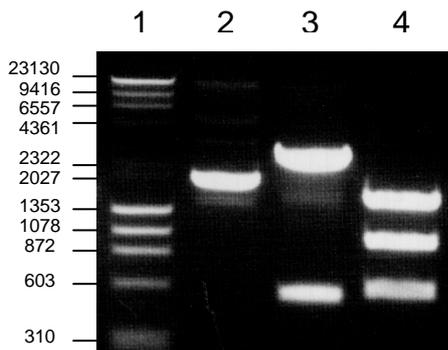


Abbildung 3.13

Analytisches 1 % TAE-Agarosegel;

Lane 1: DNA-Längenstandard;

Lane 2: pGEM3z IP3K(K255A)-*Xba*/*Sph* unverdaut

Lane 3: pGEM3z IP3K(K255A)-*Xba*/*Sph* mit *Xba* I / *Hind* III restringiert

Lane 4: pGEM3z IP3K(K255A)-*Xba*/*Sph* mit *Fsp* I restringiert

In diesem Sinne als positiv identifizierte Klone wurden unter Verwendung der universellen Primer NP24 und RP24 komplett durchsequenziert, um zum einen die korrekte Einführung der gewünschten Mutation im Detail zu bestätigen, zum anderen aber auch um unerwünschte „second site mutations“, die bei der späteren Expression der mutierten Proteine zu einer Verschiebung des Leserasters oder aber auch zu zusätzlichen, die Ergebnisse verfälschenden Aminosäureaustauschen führen könnten, auszuschließen. Da die multiple cloning sites aller für die Zwischenklonierung der verschiedenen mutierten Fragmente benutzten Vektoren von den zu den Primern NP24 und RP24 komplementären Sequenzen flankiert werden, konnten alle nach dem Verfahren von [Picard et al., 1994] erzeugten mutierten IP3K-cDNA-Fragmente auf diese Weise vollständig in ihrer korrekten Sequenz bestätigt werden.

### Umklonierung der gezielt mutierten IP3K cDNA-Fragmente in den prokaryotischen Expressionsvektor

Um die Auswirkungen der eingeführten Mutationen auf Proteinebene zu analysieren, mußten zunächst die mutierten cDNA-Fragmente gegen die jeweiligen, in den entsprechenden wt-Expressionsvektoren enthaltenen Fragmente ausgetauscht werden. Hierzu wurden zunächst sowohl der jeweilige wt-Expressionsvektor (im Beispiel: pET-17b-GIK) als auch ein im obigen Sinn als positiv identifiziertes Plasmid mit durch Sequenzierung gesicherter korrekter Insert-Sequenz im präparativen Maßstab mit geeigneten Restriktionsendonukleasen (hier: *Xba* I / *Sph* I) hydrolysiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die weiterzuverwen-

### 3.1 Ergebnisse

denden Banden (hier: die Mutation tragendes Insert des Vektors pGEM3z IP3K(K255A)-*Xba*/Sph (537 bp); konstant zu haltender Teil des wt-Expressionsvektors pET-17b-GIK (4512 bp); in Abbildung 3.14 durch Pfeile markiert) aus dem Gel ausgeschnitten, wie oben beschrieben extrahiert und ligiert. Die so erzeugten rekombinanten Vektoren wurden in *E.coli* XL1 blue transformiert.

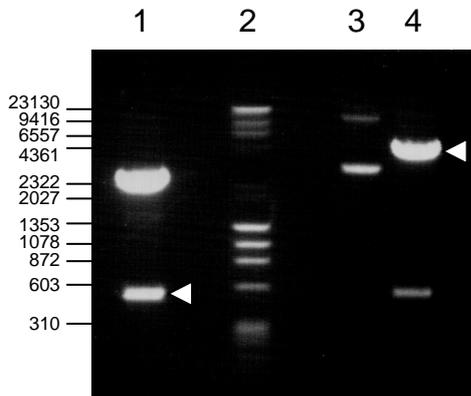


Abbildung 3.14  
 Präparatives 1 % TAE-Agarosegel;  
 Lane 1: pGEM3z IP3K(K255A)-*Xba*/Sph mit *Xba* I / *Sph* I restringiert;  
 Lane 2: DNA-Längenstandard;  
 Lane 3: pEGIK unverdaut;  
 Lane 4: pEGIK mit *Xba* I / *Sph* I restringiert;  
 Banden, welche aus dem Gel extrahiert und weiterbearbeitet wurden, sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Die Plasmid-DNA einzelner Bakterienkolonien wurde sodann mittels Plasmid-Minipräparation gewonnen und wie oben beschrieben durch Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen analysiert. Im hier betrachteten Spezialfall wurde zum einen ein Verdau mit *Xba* I / *Xho* I durchgeführt; Plasmide mit korrekt einligiertem Insert werden auf diese Weise in zwei Fragmente (1908 bp, 3141 bp; siehe Abb. 3.15, Lane 2) geschnitten. Zum anderen wurde auch hier mit *Fsp* I restringiert um tatsächlich die Mutation beinhaltende Vektoren (entstehende Fragmente: 2425 bp, 2134 bp und 490 bp, siehe Abbildung 3.15, Lane 3) von eventuell durch Religation unvollständig verdauter wt-pET-17b-GIK-Vektoren entstandenden wt-Expressionsplasmiden (entstehende Fragmente 2915 bp und 2134 bp) zu diskriminieren.

Vektoren mit derart überprüften, korrekten Inserts wurden daraufhin in den jeweils gewählten *E.coli* Expressionsstamm (im Fall des Plasmids pET-17b-GIK-K255A in BL21(DE3)) transformiert und für die rekombinante Expression der gezielt mutierten cDNA genutzt.

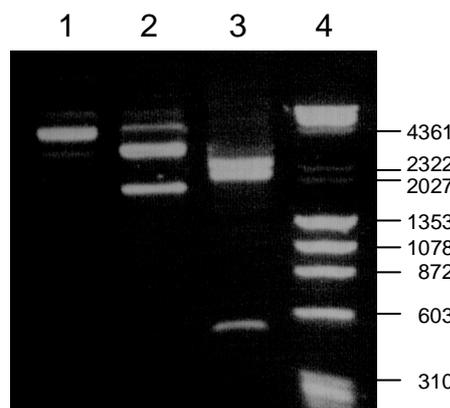


Abbildung 3.15  
 Analytisches 1 % TAE-Agarosegel;  
 Lane 1: pEGIK-K255A unverdaut;  
 Lane 2: pEGIK-K255A *Xba* I / *Xho* I restringiert  
 Lane 3: pEGIK-K255A *Fsp* I restringiert  
 Lane 4: DNA-Längenstandard

### 3.1.2.2.2 QuikChange-PCR-Mutagenese

Wie bereits im Kapitel 2.2.2.8.3.2 dargelegt, erlaubt die Methode der QuikChange-PCR-Mutagenese eine direkte Mutagenese des einzusetzenden Expressionsplasmides; zusätzliche Schritte wie das Umklonieren aus einem Vektor wie pGEM-3z sind nicht notwendig. Aus diesem Grund erhält man mit der QuikChange-PCR-Methode deutlich schneller als mit der oben beschriebenen Methode nach Picard et al. die gewünschten mutagenisierten Expressionsvektoren. Da das gesamte Plasmid in einer PCR-Reaktion amplifiziert wird, muß allerdings der gesamte für das rekombinante Protein codierende Bereich des Vektors sequenziert werden, um verlässliche Aussagen über die Integrität der für das Protein codierenden cDNA machen zu können. Im Folgenden ist exemplarisch die Herstellung eines gezielt mutierten Plasmides für die rekombinante Expression der HsIP3K-B-Mutanten S647D, ausgehend von dem oben beschriebenen wt-Expressionsplasmid pET-17b-SiS6, dokumentiert.

#### **QuikChange-Mutagenese-PCR, präparativer Restriktionsverdau mit dem methylierungssensitiven Enzym *Dpn* I**

Die PCR wurde gemäß der in Kapitel 2.2.2.8.3.2 dargelegten Vorschrift angesetzt; eingesetzt wurden 14 ng pET-17b-SiS6 als Template, sowie die QuikChange-Mutageneseprimer HsIP3K-B-S647D-F und HsIP3K-B-S647D-R (Finalkonzentration jeweils 0,3 µM). Da die Länge des zu amplifizierenden Plasmides 4257 bp betrug, wurde die Elongationszeit auf 12 Minuten festgelegt (empfohlene Elongationszeit laut Vorschrift: mindestens 8,5 Minuten). Nach hinreichender Abkühlung des Ansatzes nach Durchlaufen des PCR-Programmes wurde 1/5 des Ansatzes für die nachfolgende Analyse auf dem Gel abgenommen, die restlichen 4/5 wurden mit 10 U *Dpn* I versetzt und eine Stunde bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Wie bereits im Methodenteil dargelegt, hydrolysiert das methylierungssensitive Enzym *Dpn* I lediglich die methylierte (da aus dem nicht-methylasedefizienten *E.coli* Stamm XL1 blue isolierte) parentale Template-Plasmid-DNA, nicht aber die in der PCR-Reaktion neusynthetisierte und damit unmethylierte Plasmid-DNA. Bei einem quantitativen Verlauf der *Dpn* I-Restriktion sollte somit keine transformierbare wt-DNA im Reaktionsgefäß verbleiben, so dass bei einer nachfolgenden Transformation nur noch neusynthetisierte, infolge des Einbaus der Mutageneseprimer gezielt mutagenisierte Vektoren in die Bakterien eingebracht werden.

Abbildung 3.16 zeigt 10 µl-Aliquots des QuikChange-PCR-Ansatzes zur Erzeugung des Plasmids pET-17b-SiS6-S647D jeweils vor (Lane 1) als auch nach (Lane 2) erfolgtem Verdau mit *Dpn* I. Da die mit einem Pfeil gekennzeichnete Bande, welche die (an zwei Stellen genickte) neusynthetisierte Plasmid-DNA darstellt, auch nach der Restriktion noch vorhanden ist, kann davon ausgegangen werden, dass während der PCR-Reaktion ausreichende Mengen mutierter Plasmide synthetisiert wurden.

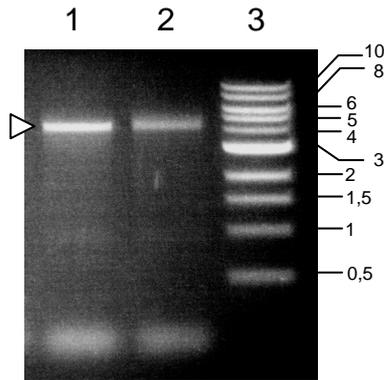


Abbildung 3.16

Analytisches 0,75 % TAE-Agarosegel;

Lane 1: QuikChange-PCR-Ansatz unverdaut;

Lane 2: QuikChange-PCR-Ansatz *Dpn* I restringiert;

Lane 3: DNA-Längenstandard;

das erwartete Amplifikat ist mit einem Pfeil gekennzeichnet; bei den Banden im Bereich < 500 bp handelt es sich um Primerdimere.

2  $\mu$ l des verbleibenden *Dpn* I – Verdau wurden daraufhin für eine Transformation in *E.coli* XL1 blue eingesetzt; Ausplattieren der Transformationsansätze auf Ampicillin-haltige LB-Agarplatten lieferte einzelne, weiterzuanalyisierende Kolonien.

#### Auswahl positiver Klone durch PCR-Screening der Bakterienkolonien und nachfolgenden mutationsspezifischen Restriktionsverdau

Auch die für die QuikChange – Mutagenesen eingesetzten Mutageneseprimer wurden stets so designt, dass infolge der Einführung neuer oder Elimination vorhandener Restriktionschnittstellen eine Unterscheidung zwischen mutierten und nichtmutierten Konstrukten durch einen einfachen Restriktionsverdau möglich war. Die für die Hs-IP3KB-Mutante S647D erhaltenen Klone wurden zunächst wie in Kapitel 2.2.2.8.2. beschrieben in einer Screening-PCR-Reaktion als Template eingesetzt; dabei wurde der durch die Sequenzen der Oligonukleotide T7-Promoter-Primer und HsIP3K-B-S764D flankierte Bereich amplifiziert. Abbildung 3.17 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung von Aliquots (10  $\mu$ l = 1/2 des gesamten Ansatzes) dieser PCR-Reaktion, analysiert wurden vier verschiedene Klone. In allen Ansätzen wurde das erwartete 495 bp große Amplifikat gebildet.

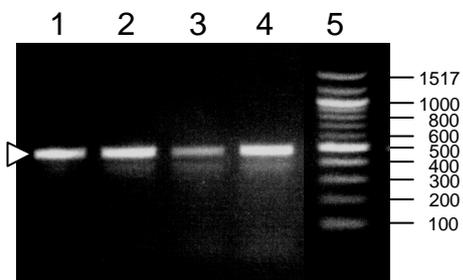


Abbildung 3.17

Analytisches 1,5 % TAE-Agarosegel;

Lanes 1 – 4: unverdaute Amplifikate des PCR-Screenings von 4 verschiedenen Klonen (Klon 1-4);

Lane 5: DNA-Längenstandard

Die andere Hälfte der oben beschriebenen PCR-Ansätze wurde mit der Restriktionsendonuklease *Avr* II verdaut. Da in die erfolgreich mutierten Plasmide durch die Sequenz der Mutageneseprimer HsIP3K-B-S647D-R und HsIP3K-B-S647D-F eine neue Schnittstelle für dieses Enzym eingebracht wurde, ergibt sich ein unterschiedliches Verdaupattern für mutierte Frag-

## 3.1 Ergebnisse

mente (379 bp, 116 bp) gegenüber der wt-cDNA (495 bp, wie unverdaute Banden, da keine *Avr II* – Schnittstelle im amplifizierten Fragment). Wie in Abbildung 3.18 dargestellt, beinhalten die Kolonien 2-4 in der Tat erfolgreich mutierte Plasmide (pET-17b-SiS6-S647D); die Kolonie 1 hingegen stellte sich als mit (vermutlich aus unvollständigem *Dpn I* – Verdau resultierendem) wt – Plasmid pET-17b-SiS6 transformiert heraus und wurde verworfen.

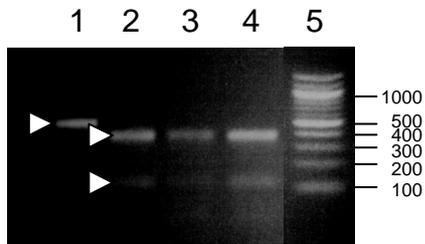


Abbildung 3.18  
Analytisches 2 % TAE-Agarosegel;  
Lanes 1 - 4: *Avr II* -restringierte Amplifikate von 4  
verschiedenen Klonen (Klon 1 – 4)  
Lane 5: DNA-Längenstandard

Die Plasmid-DNA der auf diese Weise als positiv identifizierten Klone wurde nun mittels Plasmidminipräparation isoliert. Nachdem das Ergebnis des an das PCR-Screening angeschlossenen *Avr II* – Restriktionsverdau noch einmal auf Ebene der Plasmid-DNA bestätigt wurde (siehe Abbildung 3.19: pET17b-SiS6: keine Restriktion, pET17b-SiS6-S647D: Linearisierung des Plasmids: 4257 bp), wurde die Sequenz der codierenden Region eines Klones durch mehrere überlappende Sequenzierungen komplett verifiziert. Als Sequenzierprimer dienten hierbei der T7-Promoter-Primer sowie der Primer SB7.

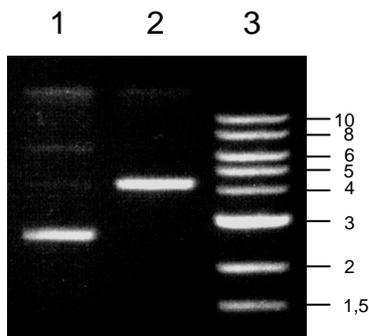


Abbildung 3.19:  
Analytisches 0,75 % TAE-Agarosegel;  
Lane 1: pET-17b-SiS6-S647D-Klon 2 unverdaut;  
Lane 2: pET-17b-SiS6-S647D-Klon 2 *Avr II* restringiert;  
Lane 3: DNA-Längenstandard

Solcherart erzeugte und überprüfte Konstrukte wurden sodann in den gewählten *E.coli* Expressionsstamm (im hier ausgeführten Beispiel BL21(DE3)RIL) transformiert und für die rekombinante Expression der betreffenden, gezielt mutierten  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinase verwendet.

## 3.2 Prokaryotische Expression rekombinanter IP3K

Für die rekombinante Herstellung der in dieser Arbeit analysierten Proteine wurde ein prokaryotisches Expressionssystem (siehe Kapitel 2.2.3.2 sowie 3.1) verwendet. Wie Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen sowie eigene Vorarbeiten (G.W. Mayr, U. Bertsch, W. Fannick, persönliche Mitteilung) zeigen, führt die prokaryotische Expression von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinasen im allgemeinen zu Proteinen, deren enzymatische Eigenschaften (Michaelis-Konstanten, spezifische Aktivitäten, Stimulierbarkeit durch Ca<sup>2+</sup>/CaM) mit den entsprechenden Parametern nichtrekombinanter, aus Gewebeproben aufgereinigter Kinasen übereinstimmen. Aufgrund dieser Tatsache konnte zum einen auf die Etablierung eines eukaryotischen Systems zur rekombinanten Expression von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinasen verzichtet werden, zum anderen konnten, nach gezielter Optimierung von Expressions- und Aufreinigungsprotokollen, die Vorteile eines funktionierenden prokaryotischen Expressionssystems (insbesondere die Möglichkeit zur Gewinnung rekombinanter Proteine im mg-Maßstab aus verhältnismäßig kleinen Kulturvolumina) genutzt werden.

Im Folgenden werden (exemplarisch an ausgewählten Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase Expressionskonstrukten) die diesbezüglichen Ergebnisse dargestellt.

### 3.2.1 Expression von GgIP3K-A-wt und - Mutanten (pET-17b-GIK-basiert)

Alle in diesem Abschnitt beschriebenen rekombinanten Proteine umfassen die CaM-Bindungsdomäne sowie die katalytische Domäne der GgIP3K-A (Aminosäuren 156 – 452) und werden im Folgenden als **GIK(156-452)** bezeichnet.

#### Induzierbarkeit des BL21(DE3)/pET-17b – basierten Expressionssystems

Die Anzucht der Bakterien sowie die Induktion der Expression der rekombinanten Proteine erfolgte wie in Kapitel 2.2.3.2 beschrieben. Abbildung 3.20 zeigt exemplarisch für zwei verschiedene IP3K-Mutanten (L319A, R310L) die gelelektrophoretische Auftrennung von *E.coli*-Gesamtprotein (sowohl lösliche als auch unlösliche Fraktion) zu verschiedenen Zeitpunkten des Experiments (Lanes „0“: vor Induktion der Expression durch Zugabe von IPTG; Lanes „1“: 1h nach Induktion der Expression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,5 mM); Lanes „2“: 2h nach Induktion der Expression durch Zugabe von IPTG (Finalkonzentration 0,5 mM)). Da die Volumina der untersuchten Flüssigkultur-Aliquots jeweils nach der in Kapitel 2.2.3.2.1 beschriebenen Methode in Abhängigkeit von der optischen Dichte der Kultur bei 600 nm festgelegt wurden, wurde in allen Lanes eine in etwa gleiche Anzahl lysierter Bakterien analysiert. In beiden mit dem jeweiligen Plasmid transformierten *E.coli* – Kulturen ist die deutliche Induktion der Expression eines das erwartete Molekulargewicht von 36 kD besitzenden Polypeptids bereits in der hier dargestellten Färbung mit Coomassie Brilliant Blue auch vor dem Hintergrund der endogenen *E.coli*-Proteine klar zu erkennen.

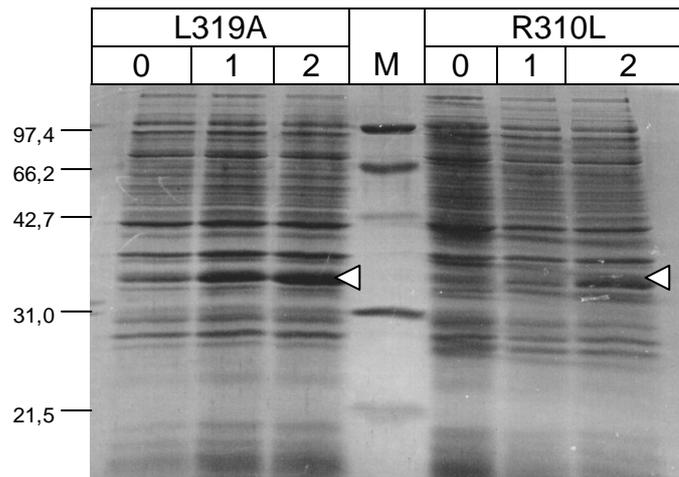


Abbildung 3.20: Induktion der Expression von GgIP3K-A-Mutanten in *E.coli* BL21(DE3) (transformiert mit pET-17b-GIK-L319A bzw. -R310L). Die Auftrennung der Proteine erfolgte auf einem 12,5 % SDS-PAA-Gel, die Anfärbung der Proteine mit Coomassie Brilliant blue; Auftragsreihenfolge siehe Text.

Western Blotting entsprechender Gele mit anschließender spezifischer Immunodetektion von Ins(1,4,5) $P_3$  3-Kinase bestätigte dieses Ergebnis, d.h. bei der in Abbildung 3.20 mit einem Pfeil markierten Bande handelt es sich in der Tat um durch IPTG-Zugabe induzierte rekombinante IP3K. Allerdings wurden bei den meisten in dieser Weise untersuchten Mutanten bereits vor der Induktion durch IPTG geringe Mengen des rekombinanten Proteins von den Bakterien synthetisiert, obwohl die Expression der für die Transkription der IP3K-cDNA erforderlichen, unter der Kontrolle eines lac-Promoters stehenden T7-RNA-Polymerase sowohl durch den endogenen wie auch den pET-17b-codierten Lac-Repressor und auch durch die dem Kulturmedium zugesetzte Glucose reprimiert wurde. Eine Verwendung eines das Plasmid pLysS bzw. pLysE enthaltenden BL21(DE3)-Stammes könnte hier Abhilfe schaffen; diese Vektoren codieren für das T7 Lysozym, welches einen natürlichen Inhibitor der T7-RNA-Polymerase darstellt und garantieren auf diese Weise eine maximale Reduzierung der basalen Expression von unter der Kontrolle eines T7-Promoters stehenden cDNAs. Da eine geringe basale Expression rekombinanter IP3K jedoch keine Auswirkungen auf das Wachstum der Bakterien zeigte, wurde auf eine derartige, stringenter Kontrolle der Basalexpression ohne Induktor, welche bei der Expression cytotoxisch wirkende Proteine essentiell ist, verzichtet.

### Löslichkeit der rekombinant exprimierten Proteine, Degradationseffekte

Nach der Lyse der Bakterien wurde die löslichen und unlöslichen Bestandteile des Lysats durch Zentrifugation voneinander separiert. Dabei zeigte sich, dass fast alle untersuchten IP3K-Mutanten auch in der löslichen Fraktion zu detektieren und somit einer weiteren Bearbeitung z.B. durch Säulenchromatographie ohne weitere Vorbereitungen, wie sie z.B. Renaturierungsschritte darstellen würden, zugänglich waren. Ein bestimmter, in Abhängigkeit von

## 3.2 Ergebnisse

der betreffenden Mutante stark variierender Prozentsatz des synthetisierten Proteins lag jedoch stets auch in der unlöslichen Fraktion des Lysats in Form von Einschlusskörpern („inclusion bodies“) vor.

Abbildung 3.21. zeigt exemplarisch für die Mutante K272D die Ergebnisse der Immunodetektion (verwendeter monoklonaler Antikörper: Kin4, Verdünnung 1:10000) in den löslichen bzw. unlöslichen Fraktionen der Lysate von aus verschiedenen behandelten Kulturen stammenden Bakterien; variiert wurde zum einen die Konzentration des Induktors IPTG (0,1 mM vs. 0,5 mM IPTG-Finalkonzentration) sowie die Temperatur, bei der die Bakterien nach der Induktion der Expression mit IPTG kultiviert wurden (37°C vs. RT von ca. 20°C). Bei allen getesteten Bedingungen wurde ein immunoreaktives Polypeptid des erwarteten Molekulargewichtes von 36 kD exprimiert, welches sowohl in der löslichen als auch in der unlöslichen Fraktion des Lysats auftrat. Da mit der löslichen Fraktion weitergearbeitet werden sollte, wurden die Expressionsbedingungen auf eine möglichst große Menge von rekombinantem Protein in dieser Fraktion optimiert; wie aus Abbildung 3.21 ersichtlich führte (bei der Mutante K272D) eine Inkubationstemperatur von 37°C zu dem diesbezüglich besten Ergebnis, wobei eine Erhöhung der Induktorkonzentration von 0,1 mM auf 0,5 mM IPTG lediglich einen marginalen Effekt auf die in der löslichen Fraktion zu detektierende Proteinmenge hatte.

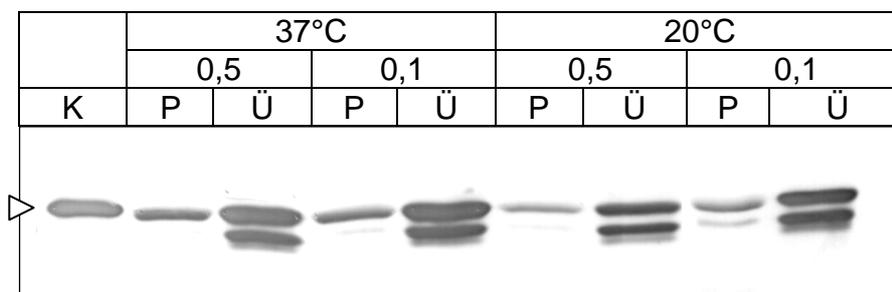


Abbildung 3.21: Immunodetektion rekombinanter GgIP3K-A (Mutante K272D)  
Die Expression erfolgte in *E.coli* BL21(DE3), transformiert mit pET-17b-GIK-K272D. Auf einem 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel wurden für verschiedene Expressionsbedingungen (Inkubationstemperatur 20°C bzw. 37°C; Induktion mit 0,5 mM bzw. 0,1 mM IPTG) jeweils Aliquots der nach der Lyse unlöslichen (P) bzw. löslichen Fraktionen (Ü) aufgetrennt. Nach Blotting auf Nitrocellulose erfolgte die spezifische Detektion von IP3K. K: affinitätsgereinigtes wt-GgIP3K-Fragment

Des weiteren ist in allen analysierten löslichen Lysatfraktionen neben dem erwarteten 36 kD – Produkt eine ebenfalls immunoreaktive Bande niedrigeren Molekulargewichts (ca. 33 kD) zu detektieren. Hierbei handelt es sich, wie vorangegangene Experimente aus der Arbeitsgruppe zeigen, um eine N-terminal degradierte GgIP3K-A. Dieses trunkierte rekombinante Protein besitzt mit der 36 kD – Form vergleichbare enzymatische Parameter; aufgrund des partiellen Verlustes der CaM-Bindungsdomäne ist die spezifische Aktivität des Proteins jedoch nicht mehr durch  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM stimulierbar.

Das Auftreten dieser infolge von Degradation des rekombinant produzierten Proteins entstehenden Bande konnte auch durch Erhöhung der Konzentrationen der verwendeten Proteaseinhibitoren nicht verhindert werden. Es zeigte sich jedoch, dass die Verwendung von DNase zum Abbau der bei der Bakterienlyse freigesetzten chromosomalen DNA (Lyseprotokoll A, Kapitel 2.2.3.2.2) häufig (in Abhängigkeit von der verwendeten Charge von DNase) mit massiver, während der Lyse auftretender Degradation des rekombinanten Polypeptids einherging. Dieser Effekt beruht vermutlich auf der Einschleppung von Proteasen aus der DNase-Stocklösung; da diese Präparate von den meisten kommerziellen Anbietern aus (in hohem Maße Proteasen enthaltendem) bovinem Pancreas hergestellt werden, ist auch bei als hochrein deklarierten Präparationen mit Protease-Kontaminationen zu rechnen. Aus diesem Grund wurde nach Entdeckung dieser Tatsache von der Verwendung von DNase zur Degradation der chromosomalen DNA verzichtet; stattdessen wurden die Lysate einer Ultraschallbehandlung unterzogen, wodurch, infolge der durch die dabei auftretenden Scherkräfte bedingten DNA-Fragmentierung, ebenfalls eine effiziente Verringerung der Viskosität des Lysats hervorgerufen, gleichzeitig aber das Auftreten der Degradationsbande reduziert wurde.

Bei Expression in BL21(DE3) konnten so zwischen 200 µg und 1000 µg rekombinantes Protein in löslicher Form aus einem Kulturvolumen von 250 ml gewonnen werden; neuere in der Arbeitsgruppe durchgeführte Experimente zeigen, dass eine deutliche Steigerung der zu gewinnenden Proteinmenge durch die Verwendung der pET-17b-GIK basierenden Plasmide in Kombination mit dem Bakterienstamm BL21(DE3)RIL erreicht werden kann. Diese Bakterien sind optimiert für die prokaryotische Expression eukaryotischer Gene, da sie auf einem Chloramphenicol-Resistenz vermittelten Plasmid die genetische Information zur Synthese von in Bakterien nur in geringem Maße vorkommenden tRNAs tragen, welche bei der Translation eukaryotischer mRNAs aufgrund der verschiedenen Codon Usage bei Pro- und Eukaryoten eventuell essentiell erforderlich sein können.

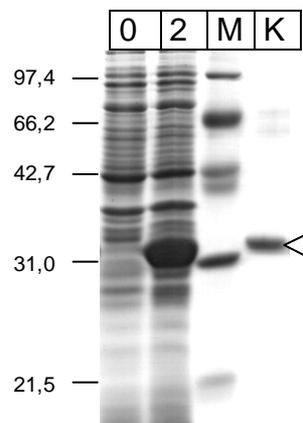
### 3.2.2 Expression von GgIP3K-A - wt und - Mutanten (pSK-A-basiert)

Für einige Experimente, insbesondere für die Saturation Transfer Difference NMR – Untersuchungen, wurde nicht mit den 36 kD großen, die CaM-Bindungsdomäne sowie die katalytische Domäne umfassenden GgIP3K-A-Fragmenten gearbeitet, welche auf den pET-17b-GIK basierenden Vektoren codiert sind. Stattdessen wurden die oben beschriebenen, auf dem Wildtyp-Vektor pSK-A basierenden Plasmide für die Expression von Fusionsproteinen aus dem für die affinitätschromatographische Aufreinigung gewählten StrepTagII und der katalytischen Domäne der GgIP3K-A in dem Bakterienstamm BL21(DE3) verwendet. Wie unten noch näher ausgeführt, hat dieses im Folgenden als **Strep-GIK(184-452)** bezeichnete Konstrukt verschiedene experimentell bedeutsame Vorteile, z.B. die sehr starke prokaryotische Expression, welche die Gewinnung großer Proteinmengen aus kleinen Kulturvolumina ermöglicht, und die gute Löslichkeit auch unter Nidrigsalz-Bedingungen bei gleichzeitiger Abwesenheit von Detergenzien wie Triton X-100.

#### Induzierbarkeit des BL21(DE3)/pSK-A – basierten Expressionssystems

Wie aus Abbildung 3.22 exemplarisch für das wt-Konstrukt dargestellt (siehe auch die Abbildungen 3.24 und 3.25 für die auf pSK-A basierenden Mutanten-Konstrukte) werden die StrepTagII-Fusionsproteine sehr effizient in *E.coli* BL21(DE3) exprimiert. Lane „0“ zeigt das gesamte, in uninduzierten, mit pSK-A transformierten BL2(DE3)-Bakterien enthaltene Protein, in Lane „2“ wurde ein entsprechendes Aliquot derselben Kultur zwei Stunden nach Induktion der Expression mit 0,1 mM IPTG (Inkubation der Kultur vor und nach Induktion bei 37°C) aufgetragen. Man beobachtet eine drastische Induktion der Expression eines Polypeptids des apparenten Molekulargewichtes von 32 kD; durch WesternBlotting und Detektion sowohl mit gegen GgIP3K-A gerichteten monoklonalen Antikörpern als auch mit Streptavidin konnte die Identität der Bande als StrepTagII-GgIP3K-A-Fusionsprotein bestätigt werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

Abbildung 3.22: Induktion der Expression des StrepTagII-GgIP3K-A-wt-Proteins in *E.coli* BL21(DE3); M: LMW-Molekulargewichtsstandard; K: gereinigtes, rekombinantes StrepTagII-GgIP3K-A-wt-Protein (1 µg); SDS-PAA-Gel: 12,5 %; Färbung mit Coomassie Brilliant blue



### Löslichkeit der rekombinant exprimierten Proteine

Für das wt-StrepTagII-GgIP3K-A-Fusionskonstrukt wurde, wie oben für die pET-17b-GIK basierten Konstrukte beschrieben, eine Optimierung der Expressionsbedingungen vorgenommen, mit dem Ziel, möglichst große Mengen rekombinanten Proteins in löslicher Form herstellen zu können. Variiert wurde die Finalkonzentration des Induktors IPTG (0,1 mM; 0,5 mM) in der Kultur sowie die Temperatur, bei der die Bakterien nach der Induktion der Expression kultiviert wurden (37°C; RT: ca. 20 °C). Abbildung 3.23 zeigt die Ergebnisse dieser Versuche.

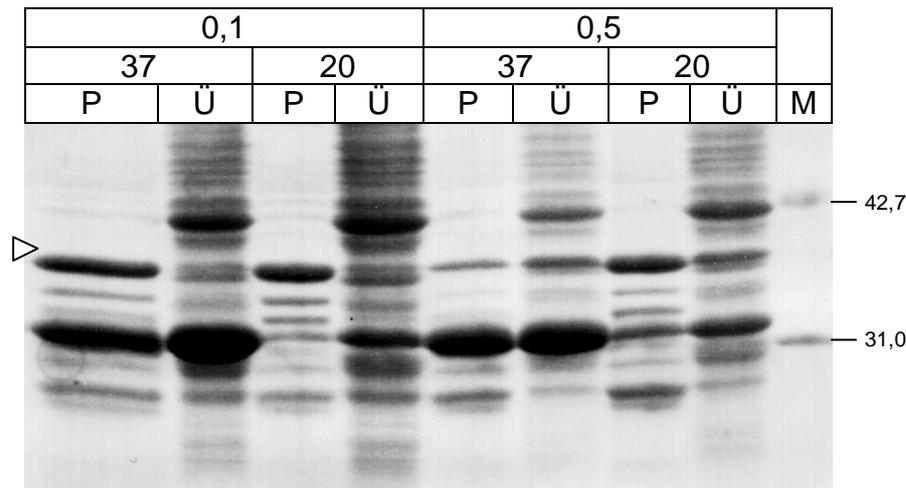


Abbildung 3.23: Optimierung der Expressionsbedingungen für das StrepTagII-GgIP3K-A-Fusionsprotein; Die Expression erfolgte in BL21(DE3), transformiert mit dem Plasmid pSK-A-wt bei einer Inkubationstemperatur von 37°C bzw. 20°C; induziert wurde mit 0,1 mM bzw. 0,5 mM IPTG. Jeweils ein Aliquot der nach der Lyse unlöslichen (P) bzw. löslichen (Ü) Fraktion wurde auf ein 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen; die Anfärbung der Proteine erfolgte mit Coomassie Brilliant blue. M: Molekulargewichtsstandard (LMW)

Bei allen getesteten Expressionsbedingungen wurden große Mengen an Fusionsprotein in der löslichen Fraktion des Überstandes beobachtet; bei Inkubation der Kulturen bei 37°C und Induktion mit 0,5 mM IPTG machte das rekombinante Protein sogar einen Anteil von mehr als 50 % der gesamten, nach der Lyse löslichen Proteine aus. Mildere Expressionsbedingungen, insbesondere die Wahl einer niedrigeren Inkubationstemperatur nach der Induktion, führten zu einer Verringerung der Menge des exprimierten Proteins, zudem wurde weniger rekombinantes Protein in Form von inclusion bodies und somit unlöslich abgelagert. Da lediglich die lösliche Fraktion für die weitere Bearbeitung verwendet werden sollte, wurden die weiteren Expressionen der StrepTagII-GgIP3K-A-Konstrukte zunächst bei einer Inkubationstemperatur von 37°C durchgeführt; induziert wurde mit einer IPTG-Finalkonzentration von 0,1 mM. In der Abbildung 3.24 sind exemplarisch die Ergebnisse der Expressionen der Mutanten K255A und R322L dargestellt.

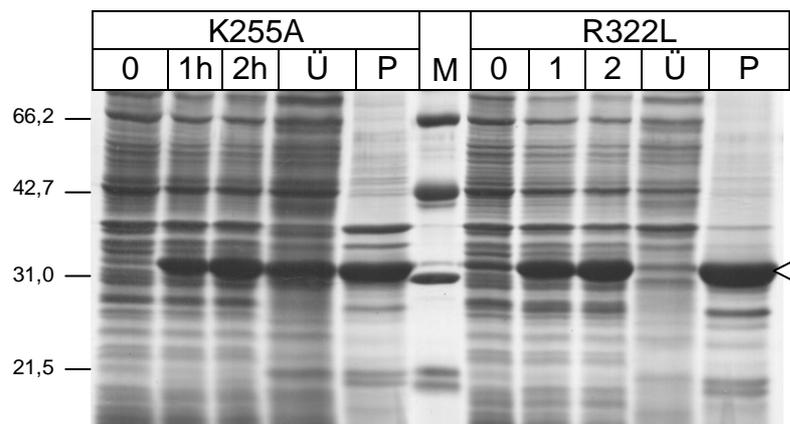


Abbildung 3.24: Expression der mutierten StrepTagII-GgIP3K-A-Fusionsproteine (Mutanten K255A, R322L)

0, 1, 2: in lysierten *E.coli* BL21(DE3) (transformiert mit pSK-A-K255A bzw. pSK-A-R322L) enthaltenes Protein (löslich und unlöslich) direkt vor Induktion (0) und eine (1h) bzw. zwei (2h) nach Induktion mit 0,1 mM IPTG; Ü(P): Aliquot der nach der Lyse löslichen (unlöslichen) Fraktion (Zeitpunkt 2); M: Molekulargewichtsstandard (LMW). Die Proteine wurden über ein 12,5 % SDS-PAA-Gel aufgetrennt; der Färbung erfolgte mit Coomassie Brilliant blue.

Während die rekombinanten Proteine StrepTagII-GgIP3K-A-K255A, - K303Q und - R276L ein dem wt-Konstrukt entsprechendes Verhalten zeigen (insbesondere hinreichend große Mengen an Fusionsprotein in der löslichen Fraktion des Lysates), scheinen die oben definierten Standard-Expressionsbedingungen für die Expression der Mutante R322L als lösliches Protein nicht geeignet zu sein, da das entsprechende Fusionsprotein nahezu quantitativ nur in der unlöslichen Fraktion zu erkennen ist. Aus diesem Grund wurden die Expressionsbedingungen für diese Mutante noch einmal separat neu erarbeitet. Wie aus Abbildung 3.25 zu ersehen, führte die Absenkung der Inkubationstemperatur nach der Induktion mit 0,1 mM IPTG von 37°C auf RT (ca. 20°C), wie auch bei der Expression des wt-Proteins beobachtet, zu einer geringeren Menge von insgesamt synthetisiertem Protein, das Verhältnis der Mengen an rekombinantem Protein in der löslichen bzw. der unlöslichen Fraktion des Lysates verschob sich jedoch zugunsten der löslichen Fraktion. Auf diese Weise konnten auch von diesem Fusionsprotein ausreichende Mengen für die geplanten Analysen in der am besten zu verarbeitenden Form (löslich) exprimiert werden.

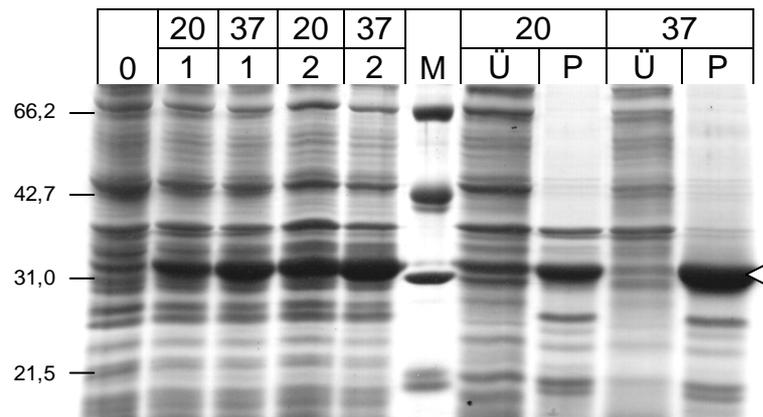


Abbildung 3.25: Optimierung der Expression des mutierten StrepTagII-GgIP3K-A-Fusionsproteins (Mutante R322L)

0, 1, 2: in lysierten *E.coli* BL21(DE3) (transformiert mit pSK-A-R322L) enthaltenes Protein (löslich und unlöslich) direkt vor Induktion (0) und eine (1) bzw. zwei (2) Stunden nach Induktion mit 0,1 mM IPTG; Ü(P): Aliquot der nach der Lyse löslichen (unlöslichen) Fraktion (Zeitpunkt 2); M: Molekulargewichtsstandard (LMW). Die Proteine wurden über ein 12,5 % SDS-PAA-Gel aufgetrennt; die Färbung erfolgte mit Coomassie Brilliant blue.

In Abhängigkeit von dem jeweiligen Konstrukt konnten somit aus einem Kulturvolumen von 500 ml zwischen ca. 3 mg und 50 mg rekombinantes, lösliches Protein gewonnen werden.

### 3.2.3 Expression von HsIP3K-B-wt und -Mutanten (pET-17b-SiS6-basiert)

Das unter Verwendung des Plasmids pET-17b-SiS6 exprimierbare N-terminal trunkierte Enzym beinhaltet die CaM-Bindungsdomäne und die katalytische Domäne der HsIP3K-B (AS 631 – 946) und wird im Folgenden als **HsIP3K-B (631-946)** bezeichnet.

#### Induzierbarkeit des BL21(DE3)RIL/pET-17b-SiS6 – basierten Expressionssystems

Die Anzucht der Bakterien sowie die Induktion der Expression erfolgten bei den hier beschriebenen ersten Versuchen unter den für die pET-17b-GIK-basierten Konstrukte etablierten Standardbedingungen (Inkubation bei 37°C vor und nach der Inkubation mit 0,5 mM IPTG). Hierbei zeigte sich bei der Verwendung von *E.coli* BL21(DE3) eine nur äußerst geringe Expressionsrate (Ergebnisse nicht dargestellt), so dass für die Expression von Fragmenten der HsIP3K-B stets zunächst der besser an die eukaryotische Codon Usage angepasste *E.coli*-Stamm BL21(DE3)RIL gewählt wurde. Abbildung 3.26 zeigt exemplarisch anhand einer Immunodetektion der HsIP3K-Mutante S764D die Ergebnisse einer solchen Expression.

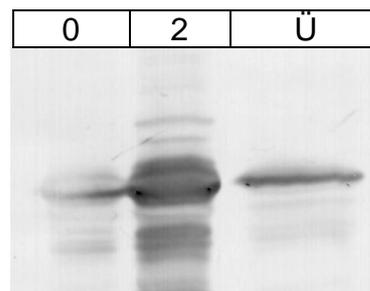


Abbildung 3.26: Immunodetektion rekombinanter HsIP3K-B (Mutante S764D)

Die Expression erfolgte in *E.coli* BL21(DE3) RIL, transformiert mit pET-17b-SiS6-S764D. Auf einem 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel wurden sowohl das in der Bakterien enthaltene Gesamtprotein (lösliche und unlösliche Bestandteile) zum Zeitpunkt direkt vor der Induktion durch 0,5 mM IPTG (0) bzw. 2 h nach Induktion (2) als auch ein Aliquot der nach Lyse löslichen Fraktion zum Zeitpunkt 2 (Ü). Nach Blotting auf Nitrocellulose erfolgte die spezifische Detektion von IP3K unter Verwendung des ursprünglich gegen GgIP3K-A generierten Antikörpers Kin16.

Es zeigte sich, dass nicht bei allen Mutanten eine eindeutige Induktion der Expression zu verzeichnen war. Auch bei den Mutanten mit deutlicher Induzierbarkeit der Expression (z.B. S764D s.o.) wurde bereits eine gegenüber dem Endresultat nicht zu vernachlässigende Menge an rekombinantem Protein bereits vor der Induktion in den Bakterien gebildet. Diese Tatsache fand ihren Niederschlag auch in einer gegenüber Kulturen von mit anderen Konstrukten (z.B. pSK-A) transformierten *E.coli* langsameren Wachstumsgeschwindigkeit bereits vor der Induktion der Expression, so dass hier eine weitere Optimierung der Expressionsbedingungen (z.B. durch die Expression in *E.coli* BL21(DE3)pLysS/RIL) erforderlich ist, wenn größere Mengen der rekombinanten HsIP3K-wt und der entsprechenden mutierten Proteine für Experimente bereitgestellt werden sollen.

### **Löslichkeit der rekombinant exprimierten Proteine**

Obwohl für alle Mutanten für die geplanten Experimente prinzipiell ausreichende Mengen an löslichem Protein gewonnen werden konnten, ist eine weitere Optimierung der Expressionsbedingungen notwendig; erste von P. Hartjen durchgeführte Untersuchungen lassen auf eine deutliche Erhöhung des Anteils an löslichem Protein bei einer auf 20 °C abgesenkten Expressionstemperatur schließen.

### **3.3 Chromatographische Aufreinigung rekombinanter IP3K**

Nahezu alle Untersuchungen wurden mit hochgereinigten (< 5% Verunreinigung) Proteinpräparationen durchgeführt. Hierzu wurde meist eine Vorreinigung der löslichen Fraktion des Bakterienlysates mit einer nachfolgenden affinitätschromatographischen Reinigung kombiniert, an die sich zum Teil weitere chromatographische Schritte anschlossen. Anhand einiger ausgewählter Mutanten werden nun die entsprechenden Aufreinigungen für die verschiedenen Konstrukte (pET-17b-GIK basiert, pSK-A basiert, pET-17b-SiS6 basiert) dargelegt.

#### **3.3.1 Aufreinigung von GIK(156 - 452) - wt und - Mutanten**

##### **Schritt 1: Vorreinigung der löslichen Fraktion des Bakterien-Rohlysates mittels Kationenaustauschchromatographie (P11-Phosphocellulose)**

Die löslichen Fraktionen der Lysate induzierter, mit pET-17b-GIK basierten Vektoren transformierter Bakterien wurden zunächst mittels einer Chromatographie an der Kationenaustauschermatrix Phosphocellulose P11 vorgereinigt. Bei dem für die Chromatographie gewählten pH-Wert von 7,5 ist zum einen die Nettoladung der rekombinanten IP3K positiv (theoretisch berechneter  $pI = 8,42$  für das wt-Enzym), zum anderen tragen beide Substrate der Kinase (sowohl ATP als auch  $Ins(1,4,5)P_3$ ) mehrere Phosphatgruppen, was ebenfalls die Bindung an die funktionelle Gruppe der P11-Matrix bei neutralem pH wahrscheinlich macht.

Im allgemeinen wurde pro ml Lysat ca. 0,8 ml Matrix zur Aufreinigung eingesetzt; d.h. bei einem anfänglichen Kulturvolumen von 250 ml wurde eine Säule mit ca. 12 ml Matrixvolumen gewählt; die Chromatographie wurde gemäß den Erläuterungen im Kapitel 2.2.3.2.3.1.1 durchgeführt. Abbildung 3.27 zeigt exemplarisch für die Mutante R276L das Ergebnis einer solchen, von 250 ml Kulturvolumen ausgehenden Aufreinigung; die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mittels einer Salzstufe von 500 mM NaCl, aufgetragen wurden jeweils 24  $\mu$ l der angegebenen Fraktion.

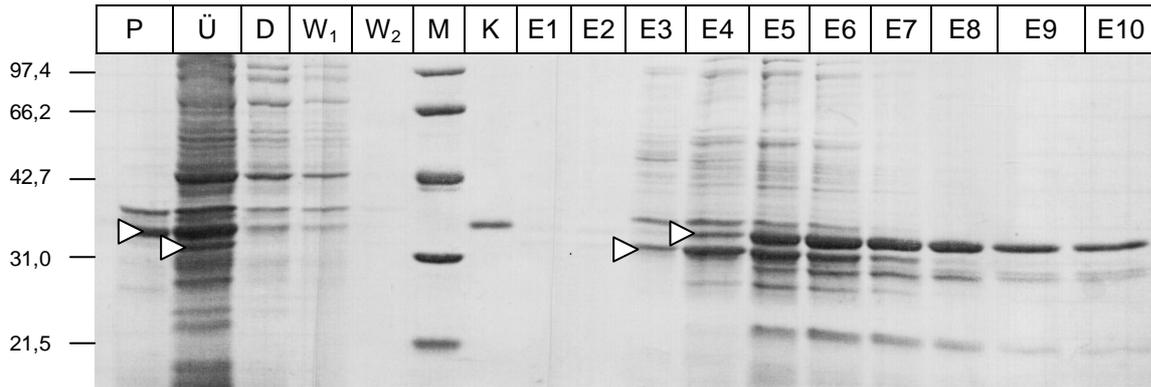


Abbildung 3.27: P11-Phosphocellulosechromatographie mit GIK(156-452)-R276L, 36 kDa)  
 Auf ein 12,5% PAA-Gel wurden aufgetragen: Aliquots der nach Lyse der Bakterien (BL21(DE3), transformiert mit pET-17b-GIK-R276L) unlöslichen (P) bzw. löslichen (Ü) Fraktion (P) sowie Aliquots der Durchlaufraction (D), der Waschfraktionen 1 ( $W_1$ ) und 2 ( $W_2$ ) sowie der Eluate 1 – 10 (E1 – E10) der P11-Phosphocellulosechromatographie. Die Anfärbung der Proteine im Gel wurde mit Coomassie Brilliant blue durchgeführt.

Ein analog hergestelltes Gel wurde auf Nitrocellulose geblottet und die in den Fraktionen enthaltene rekombinante IP3K unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers Kin4 detektiert. Das Ergebnis dieser Immunodetektion zeigt Abbildung 3.28.

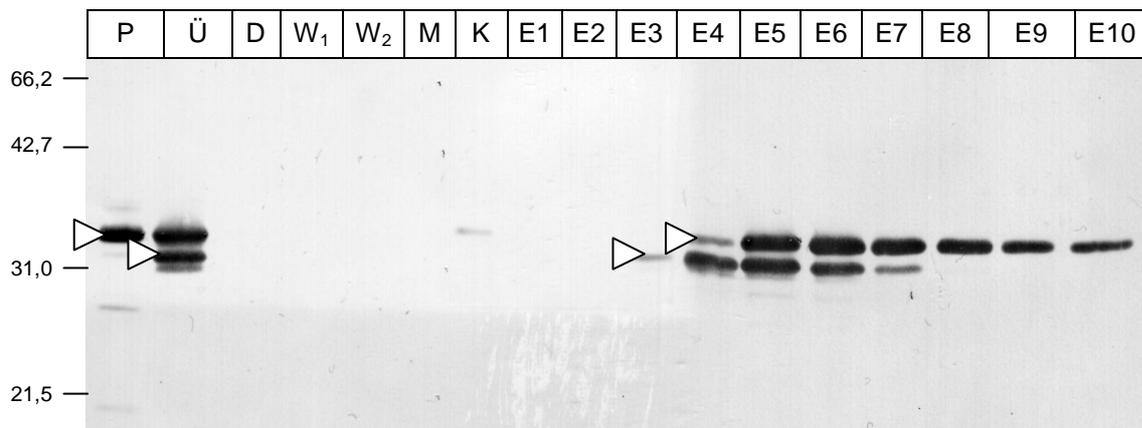


Abbildung 3.28: P11-Phosphocellulosechromatographie (GIK(156-452)-R276L, 36 kDa); Immunodetektion rekombinanter IP3K mit Kin4; der Probenauftrag ist identisch mit dem des Coomassie-gefärbten Gels in Abbildung 3.27.

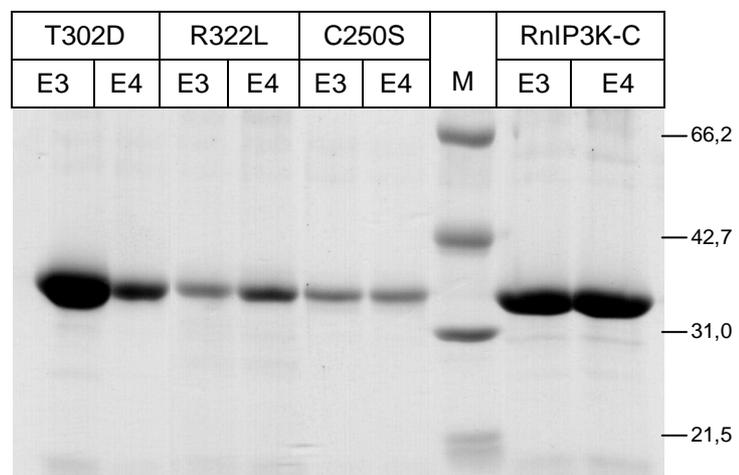
Die Abbildungen verdeutlichen, dass das rekombinante Enzym quantitativ von der Ionentauschermatrix gebunden wurde (keine detektierbare Menge von IP3K im Durchlauf); die Erhöhung der NaCl-Konzentration führt zur Elution immunoreaktiver Proteine, wobei in den Fraktionen 3 – 7 die (bereits nach der Lyse in der löslichen Fraktion vorhandene, siehe Kapitel 3.2.1 sowie Lane Ü auf dem Gel / Blot), der N-terminal degradierten Form entsprechende Bande zu erkennen ist, während das die intakte CaM-Bindungsdomäne beinhaltende 36 kDa – Fragment in den Fraktionen 4 – 10 eluiert (die den beiden Polypeptiden zugehörigen Banden sind in den Abbildung 3.27 und 3.28 durch Pfeile markiert).

**Schritt 2: Affinitätschromatographie der P11-Eluate an Calmodulin-Sepharose**

Wie aus Abbildung 3.27 ersichtlich, sind die P11-Phosphocellulosefraktionen, welche die größten Mengen an rekombinanter GgIP3K der gewünschten Größe von 36 kD enthalten (gewöhnlich die Fraktionen 5 und 6) zum einen noch mit Proteinen bakterieller Herkunft verunreinigt, zum anderen enthalten sie neben dem gewünschten 36 kD-Fragment auch beträchtliche Mengen der N-terminal degradierten Form der rekombinanten IP3K. Ein Großteil dieser kontaminierenden Proteine kann effizient mit Hilfe eines affinitätschromatographischen Schrittes an Calmodulin-Sepharose aus der Präparation entfernt werden, da *E.coli* kein endogenes Calmodulin (und somit auch keine spezifisch Calmodulin bindenden Proteine) besitzt und das durch Degradation der 36 kD-Form entstehende 32 kD-Fragment des rekombinant exprimierten Enzyms infolge einer deletierten CaM-Bindungsdomäne auch in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen nicht mehr in der Lage ist, an Calmodulin zu binden.

Zur Präparation rekombinanter IP3K im Maßstab von einigen hundert  $\mu\text{g}$  (gewonnen aus 250 – 500 ml Kulturvolumen) wurden Matrixvolumina von ca. 6 - 7 ml eingesetzt; nach erfolgter Elution wurden die proteinhaltigen Eluate mittels Centricon-10-Konzentratoren aufkonzentriert (Konzentrationsfaktor ca. 30), mit glycerinhaltigem Einfrierpuffer versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Abbildung 3.29 zeigt für einige GgIP3K-Mutanten sowie das dem GIK(156-452) entsprechende Fragment der RnIP3K-C die Eluat-Hauptfraktionen der CaM-Affinitätschromatographie.

Abbildung 3.29:  
Affinitätsgereinigte Mutanten der GgIP3K-A bzw. wt-RnIP3K-C; auf ein 12,5 % SDS-PAA-Gel wurden jeweils Aliquots der Eluatfraktionen 3 und 4 der Calmodulin-Sepharoseaffinitätschromatographie aufgetragen; die Färbung der Proteinbanden erfolgte mit Coomassie Brilliant blue.



Wie in Abbildung 3.29 exemplarisch dargestellt, eluiert das rekombinante Protein im allgemeinen peakförmig von der Calmodulin-Sepharose-Affinitätssäule, sobald von den  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Auftrags- und Waschpuffern auf den EGTA-haltigen Elutionspuffer gewechselt wird; die größten Mengen an rekombinanter IP3K werden stets in den Fraktionen 3 und/oder 4 erhalten. Selbst bei massiver Überladung der Lanes (z.B. Lane T302D, E3) sind neben dem zu isolierenden 36 kD-Fragment nur sehr wenig kontaminierende Proteine im Eluat auszumachen. Eine geringfügige Verbesserung der Reinheit der Eluate ist noch durch Zugabe von

0,1 % Triton X-100 zu Wasch- und Elutionspuffer zu verzeichnen; da jedoch die Anwesenheit von Triton X-100 einige nachfolgende Analysen stört bzw. verkompliziert (z.B. Proteinbestimmung nach Bradford) und eine Entfernung des schwer dialysierbaren Detergenz Triton X-100 nicht problemlos möglich ist, wurde in den meisten Fällen auf eine Zugabe dieser Substanz zu den für die CaM-Sepharose-Affinitätschromatographie genutzten Puffern verzichtet.

### 3.3.2 Aufreinigung von Strep-GIK(184 - 452) - wt und - Mutanten

Da eine spätere Verwendung des Strep-GIK(184-452)-Proteins für kristallographische Untersuchungen geplant ist, wurde hierfür ein Protokoll entwickelt, welches die Herstellung höchstreinen (< 1% kontaminierende Fremdproteine) Materials unter für das Protein maximal schonenden Bedingungen ermöglicht. Im folgenden werden die durch Anwendung dieses Protokolls erzielten Ergebnisse dargestellt; zur Herstellung hochreinen rekombinanten Proteins (< 5% kontaminierende Fremdproteine) zur Verwendung z.B. für enzymatische Assays und STD-NMR-Untersuchungen wurde zum Teil ein verkürztes Protokoll (siehe unten) benutzt.

Wie sich sowohl während der Etablierung der Aufreinigungsmethoden als auch in ersten Versuchen zur Kristallisation der GgIP3K-A (Bertsch, Fanick, Mayr, persönliche Mitteilung) herausstellte, zeigte das von den pET-17b-GIK-basierten Vektoren codierte, die katalytische Domäne und die CaM-Bindungsdomäne umfassende 36 kD-GgIP3K-A-Fragment GIK(156-452) unter bestimmten Pufferbedingungen (niedrige Ionenstärke und/oder Abwesenheit von Detergentien wie Triton X-100) eine unerwünscht starke Tendenz zur Präzipitation. Da die Ursache für dieses Verhalten vermutlich in der hydrophoben Natur der CaM-Bindungsdomäne zu suchen ist, sollte ein entsprechend verkürztes Konstrukt zum Einsatz gebracht werden. Da aber durch die Entfernung der CaM-Bindungsdomäne aus dem rekombinant exprimierten cDNA-Fragment zugleich die elegante Möglichkeit zur Reinigung durch eine Calmodulin-Sepharose-Affinitätschromatographie wegfiel, wurde stattdessen die cDNA für ein artifizielles, ebenfalls für eine Affinitätsreinigung zu benutzendes Tag inkloniert. Die Wahl fiel dabei auf das StrepTagII; dieses nur acht Aminosäuren umfassende Tag ermöglicht eine effiziente Reinigung rekombinanter Proteine unter physiologischen Bedingungen durch seine nur niedrig affine Interaktion mit dem außerordentlich stabilen Protein StrepTactin, einer gezielt veränderten Weiterentwicklung des bekannten Streptavidins.

Die Aufreinigung der Fusionsproteine erfolgte sukzessive durch Ionenaustauschchromatographie an Phosphocellulose P11, Affinitätsreinigung an StrepTactin-Sepharose und Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose. Der letzte Schritt ermöglicht neben einer weiteren Herausreinigung von eventuell auch nach der Affinitätschromatographie noch vorhandenen kontaminierenden Proteinen eine erste, sehr schonende Aufkonzentrierung des Fusionsproteins.

### Schritt 1: Vorreinigung der löslichen Fraktion des Bakterien-Rohlysates mittels Kationenaustauschchromatographie (P11-Phosphocellulose)

Die Durchführung der P11-Phosphocellulosechromatographie erfolgte gemäß der in Kapitel 2.2.3.2.3.1.1 aufgeführten Vorschrift; das Matrixvolumen betrug, wie im Fall der pET-17b-GIK-basierten Konstrukte 0,8 ml pro ml Lysat. Die folgende Abbildung 3.30 zeigt exemplarisch für die Mutante Strep-GIK(184-452)-R276L die gesammelten Fraktionen (Kulturvolumen 250 ml, Elution mit Salzstufe von 650 mM, aufgetragen wurden jeweils 24 µl einer jeden Fraktion).

Wie aus den Lanes D und W ersichtlich befindet sich sowohl im Durchlauf als auch in der Waschfraktion etwas rekombinantes Protein (vgl. Lane D und W in Abbildung 3.28); die Bindungskapazität der Säule war somit aufgrund der hohen Menge von rekombinantem Protein in der löslichen Fraktion des Bakterienlysates leicht überschritten. Nach Wechsel zum Elutionspuffer (hier gewählte NaCl-Konzentration: 650 mM) werden insbesondere in den Fraktionen 3-6 große Mengen des Fusionsproteins eluiert.

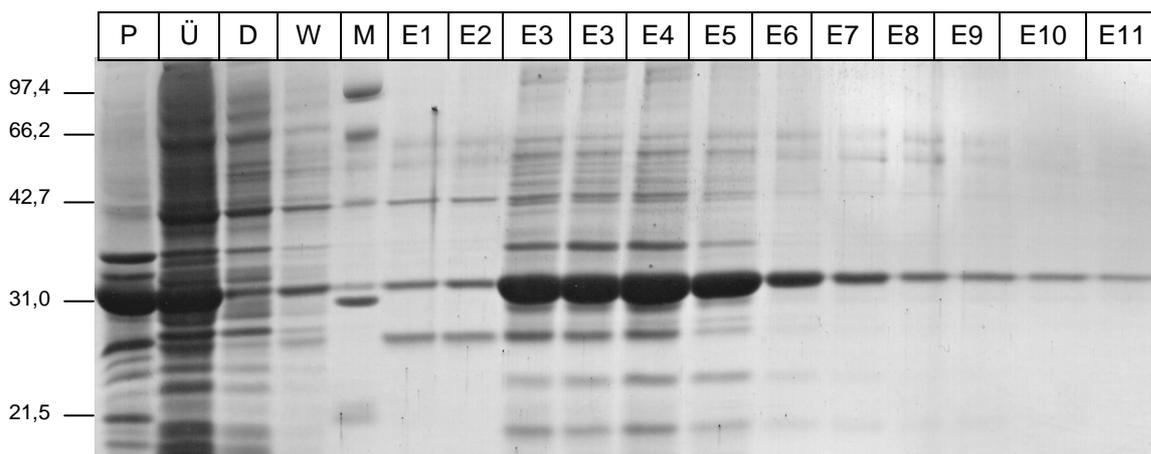


Abbildung 3.30: P11-Phosphocellulosechromatographie (Strep-GIK(184-452)-R276L, 32 kDa)  
Auf ein 12,5% PAA-Gel wurden aufgetragen: Aliquots der nach Lyse der Bakterien (BL21(DE3), transformiert mit pSK-A-R276L) unlöslichen (P) bzw. löslichen (Ü) Fraktion sowie Aliquots der Durchlauf- (D), der Wasch- (W) sowie der Eluate 1 – 12 (E1 – E12) der P11-Phosphocellulosechromatographie. Die Anfärbung der Proteine im Gel wurde mit Coomassie Brilliant blue durchgeführt.

### Schritt 2: Affinitätschromatographie der P11-Eluate an StrepTactin-Sepharose

Die weitere Reinigung der Fusionsproteine aus den P11-Phosphocellulose-Eluaten erfolgte gemäß der im Kapitel 2.2.3.2.3.2.2 gegebenen Vorschrift. Je nach aufzureinigender Menge (500 µg – 10 mg) wurden Säulenvolumina von 1 ml bis 10 ml eingesetzt; für das wt-Protein war die Gewinnung von mehr als 10 mg aus einem Kulturvolumen von 250 ml möglich; die mutierten Proteine wurden z.T. nur in kleinerem Ausmaß löslich exprimiert, aber auch für diese Konstrukte gelang die Gewinnung von mg-Mengen aus Kulturvolumina von 250 ml –

500 ml. Abbildung 3.31 zeigt die Eluate einer StrepTactin-Sepharose-Chromatographie exemplarisch am Beispiel der Mutante Strep-GIK(184-452)-R276L (Matrixvolumen 1 ml, aufgetragen wurden jeweils 8 µl der einzelnen, jeweils 500 µl umfassenden Eluatfraktionen). Man erkennt das deutlich peakförmige Elutionsverhalten; die größten Mengen an rekombinantem Protein waren stets in den Fraktionen 3 und 4 zu detektieren.

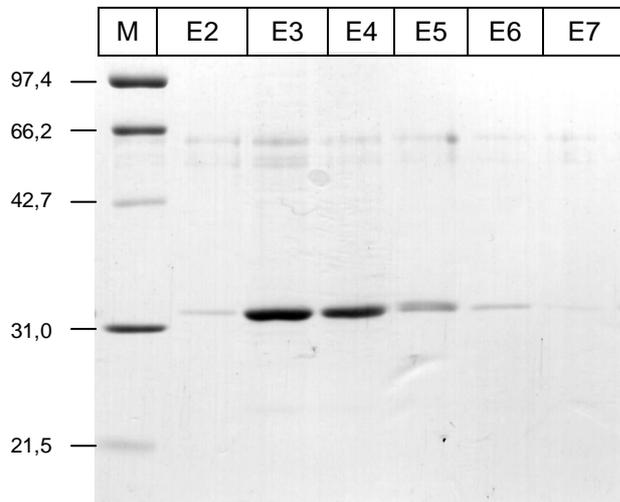


Abbildung 3.31: Elutionsprofil der StrepTactin-Sepharose-Affinitätschromatographie; (Strep-GIK(184-452)-R276L; 32 kDa)  
M: LMW-Molekulargewichtsstandard  
E2 – E7: Eluatfraktion 3 – 7  
SDS-PAA-Gel: 12,5 %; Färbung: Coomassie Brilliant blue.

Desweiteren ist zu erkennen, dass die Eluate der StrepTactin-Sepharose-Affinitätschromatographie nahezu frei von kontaminierenden Fremdproteinen sind (bei der Doppelbande in Bereich zwischen 42,7 Da und 66,2 Da handelt es sich um eine durch den Protein-Probenpuffer nachträglich in die Proben eingebrachte Kontamination, vgl. auch Lane B (Auftrag von Probenpuffer alleine) in Abbildung 3.32). Für einen Teil der enzymkinetischen Messungen an Strep-GIK(184-452)-Proteinen sowie für die STD-NMR-Analytik der Mutanten Strep-GIK(184-452)-R276L und -R322L wurden aus diesem Grund direkt die StrepTactin-Sepharose-Eluate verwendet; es erfolgte lediglich eine Aufkonzentrierung und (für die NMR-Analysen) gleichzeitige Umpufferung in deuterierten Puffer unter Verwendung von Centricon-10 Konzentratoreinheiten.

#### **Schritt 3: Weitere Reinigung und schonende Aufkonzentrierung der StrepTactin-Sepharose-Eluate durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel**

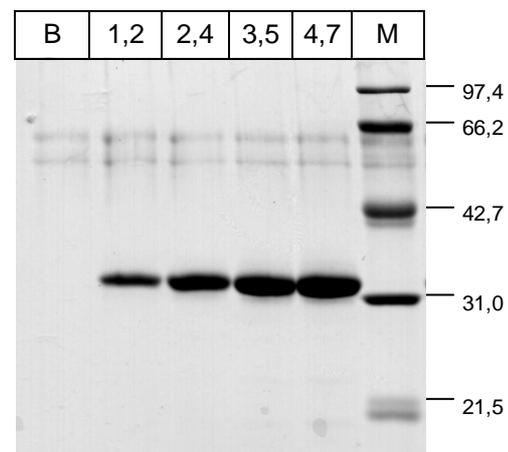
Zur Gewinnung hochreinen, stark ankonzentrierten Proteins (Faktor 5 – 10 gegenüber den Konzentration der StrepTactin-Sepharose-Eluate) wurden die StrepTactin-Sepharose-Eluate gepoolt und an eine DEAE-Sephacel-Säule gebunden. Wie in Kapitel 2.2.3.2.3.1.2 beschrieben wurde ein Säulenvolumen von ca. 0,5 ml Matrix pro mg Protein gewählt. Die Elution der rekombinanten Proteine erfolgte durch eine Salzstufe (NaCl-Konzentration 300 mM, 12 x 0,5 Säulenvolumen), die Hauptmenge des Proteins eluierte unter diesen Bedingungen in den Fraktionen 5 – 7. Die Proteinkonzentrationen der Hauptfraktionen betragen zwischen 1 µg/µl und 5 µg/µl.

#### Schritt 4: Dialyse der DEAE-Sephacel-Fractionen

Die rekombinanten Strep-GIK(184-452)-Proteine zeigen, im Gegensatz zu den GIK(156-452)-Proteinen gute Löslichkeit und Erhaltung ihrer enzymatischen Aktivität auch unter Niedrigsalz-Pufferbedingungen. Aus diesem Grund ist, wenn nachfolgende Experimente dies erfordern sollten, eine Umpufferung aus dem (300 mM NaCl enthaltenden) DEAE-Sephacel-Elutionspuffer in einen „Minimalpuffer“, z.B. 25 mM HEPES pH 7,5; 1 mM DTT, problemlos möglich. Dies kann, wie in Kapitel 2.2.3.2.4 beschrieben, einfach und für das Protein schonend unter Verwendung von für kleine Volumina geeigneten Dialysekammern durchgeführt werden.

Abbildung 3.32 zeigt das Endresultat einer solchen, auf möglichst reines, schonend isoliertes Protein optimierten Aufreinigung. Aufgetragen sind aufsteigende Mengen des rekombinanten Proteins; bei der hier gezeigten Coomassie-Färbung sind auch bei großen aufgetragenen Proteinmengen keine kontaminierenden Proteine zu detektieren (zu den Banden im Größenbereich zwischen 42,7 kDa und 66,2 kDa: siehe Bemerkung oben). Die Analyse der Präparation durch Silberfärbung entsprechender SDS-Polyacrylamidgele bestätigt dieses Ergebnis (Resultate nicht dargestellt).

Abbildung 3.32: gereinigtes StrepTagII-GgIP3K-A-wt-Fusionsprotein; auf ein 12,5 % SDS-PAA-Gel wurden verschiedene Mengen (1,2 µg, 2,4 µg, 3,5 µg, 4,7 µg) des gereinigten rekombinanten Proteins aufgetragen;  
B: 1 x Probenpuffer  
M: LMW-Molekulargewichtsstandard



Eine analoge Strategie kann auch zur Aufreinigung eines entsprechenden Fragmentes der IP3K Isoform C der Ratte (Expressionsplasmid pSK-C) sowie der humanen Isoform B (Expressionsplasmid pSK-B) angewandt werden (Resultate nicht gezeigt).

### 3.3.3 Aufreinigung von HsIP3K-B (631 - 946) - wt und - Mutanten

Da das auf dem Plasmid pET-17b-SiS6 codierte rekombinante Protein HsIP3K-B(631-946) trotz des berechneten pI-Wertes von 9,0 bei pH 7,5 nicht effizient an Phosphocellulose P11 bindet (Süße, Lindner, persönliche Mitteilung), wurde für die hier geschilderte Etablierung der in-vitro-Phosphorylierungsassays auf eine Vorreinigungsstufe verzichtet und die Aufreinigung der rekombinanten Proteine in Form einer one-step Affinitätsreinigung an Calmodulin-Sepharose durchgeführt. Hierzu wurde die lösliche Fraktion des bakteriellen Lysates auf die Konzentrationen des CaM-S-Puffers A (siehe Kapitel 2.2.3.2.3.2.1) eingestellt und direkt auf die Calmodulin-Sepharose-Matrix (7 ml Matrix bei einem Kulturvolumen von 250 ml – 500 ml) aufgebracht. Die weiteren Chromatographieschritte wurden gemäß dem Standardprotokoll durchgeführt.

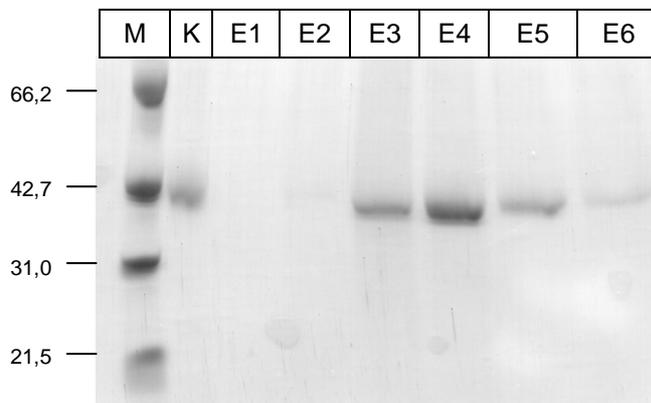


Abbildung 3.33: Fraktionen der CaM-Sepharose-Affinitätschromatographie (HsIP3K-B(631-946)-S764D, 37 kDa); aufgetragen wurden die Eluate 1 – 6 sowie der LMW-Molekulargewichtsstandard (M) und ein Aliquot des ebenfalls affinitätsgereinigten wt-Proteins; SDS-PAA-Gel: 12,5 %; Färbung: Coomassie Brilliant blue.

Wie in Abbildung 3.33 für die HsIP3K-B-Mutante S764D dargestellt, führt auch die direkte Reinigung rekombinanter, über eine intakte Calmodulinbindungsdomäne verfügbarer IP<sub>3</sub>-Kinasen aus bakteriellen Lysaten über eine Calmodulin-Sepharose-Säule zu sehr guten Resultaten (aufgetragen wurden jeweils 24 µl der jeweiligen Eluatfraktionen). Allerdings zeigte sich, dass die häufige Benutzung einer bestimmten Charge von Calmodulin-Sepharose für derartige one-step-Reinigungen, vermutlich aufgrund der zwangsläufig mit auf die Säule aufgetragenen bakteriellen Proteasen, schnell zu einer Abnahme der Bindungskapazität der entsprechenden Säule führte. Aus diesem Grund ist für weitere, die humane Isoform B betreffende Experimente die Etablierung einer effizienten Vorreinigung zwingend erforderlich. Vermutlich könnte bereits durch eine leichte Variation des pH-Wertes der für die P11-Phosphocellulose-Chromatographie verwendeten Puffer im Rahmen der durch die rekombinante Kinase tolerierten Grenzen eine hinreichend affine Bindung an diese Matrix erreicht werden.

### 3.4 Limitierte tryptische Proteolyse von rekombinanter GgIP3K-A

Erste Einblicke in die Domänenstruktur nativer oder rekombinant hergestellter Proteine können durch eine limitierte tryptische Proteolyse der betreffenden Polypeptide gewonnen werden. Die Serinprotease Trypsin hydrolysiert Peptidbindungen hochspezifisch nach Arginin- und Lysinresten unabhängig von der Natur der nachfolgenden Aminosäure; lediglich Peptidbindungen zwischen Arginin und Prolin bzw. Lysin und Prolin werden nicht gespalten. Unter für das untersuchte Protein nicht denaturierenden Bedingungen sind jedoch nicht alle potentiellen Spaltstellen in gleichem Maße suszeptibel für den Angriff der Protease; bei hinreichend niedriger Konzentration der zugesetzten Protease werden zunächst nur die am stärksten dem Lösungsmittel ausgesetzten und somit exponiertesten Schnittstellen von der Protease erkannt und hydrolysiert. Peptidfragmente, welche trotz prinzipiell vorhandener Schnittstellen nicht oder nur langsam abgedaut werden, weisen häufig eine kompakte, globuläre Faltung auf; bei schnell hydrolysierten Bereichen handelt es sich häufig um wenig geordnete Strukturen, Sekundärstrukturelemente verbindende Loops oder Interdomänen-Linker.

Durch Prof. Mayr und W. Fanick wurde gezeigt, dass die Anwesenheit von Inositol 1,4,5-trisphosphat das durch limitierte tryptische Proteolyse des rekombinanten Proteins GIK(156-452) entstehende Verdauemuster signifikant beeinflusst. Zwar wurde sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit des Substrats eine rasche, durch mindestens fünf mögliche, kurzlebige Zwischenprodukte charakterisierte Degradation des ursprünglich ein Molekulargewicht von 36 kDa besitzenden Polypeptids auf ein offensichtlich protease-resistentere Fragment von 31 kDa beobachtet, die Bildung proteaseresistenter Fragmente im niedrigeren Molekulargewichtsbereich wurde jedoch in starkem Maße durch die Anwesenheit von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  beeinflusst [Bertsch et al., 2000]. In der Tat zeigte die N-terminale Ansequenzierung der prominentesten im SDS-Gel detektierten Banden, dass in Anwesenheit von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  ein 35 Aminosäuren umfassender, im Zentrum der katalytischen Domäne liegender Sequenzbereich (Aminosäuren E271 – R305) vor tryptischer Degradation geschützt ist [Bertsch et al., 2000]; die 31 kDa-Bande stellte sich in der zitierten Arbeit als Gemisch zweier N-terminal truncierter GIK(156-452)-Fragmente heraus (N-terminale Aminosäuren Y178 bzw. A192).

#### ***Ein prokaryotisch exprimiertes, der 31 kDa-Bande entsprechendes GgIP3K-A-Fragment zeigt gute Löslichkeit und ist enzymatisch aktiv***

Da sich, wie oben dargelegt, die die 31 kDa – Bande bildenden Fragmente als deutlich weniger proteaseempfindlich als das Ausgangsprodukt (36 kDa – Fragment, codiert auf Expressionsplasmid pET-17b-GIK) erwiesen [Bertsch et al., 2000], konnte angenommen werden, dass diese Fragmente gegenüber dem die Calmodulin-Bindungsdomäne mit beinhaltenden

## 3.4 Ergebnisse

Konstrukt eine kompaktere, globuläre Struktur ausbilden. Um diese Hypothese zu testen, wurde aufbauend auf diesen Erkenntnissen ein neuer Expressionsvektor (pSK-A, siehe Kapitel 3.1.1.3) konstruiert. Dieser ermöglicht die Expression eines die katalytische Domäne (AS 184 – 452) der Kinase umfassenden Polypeptids (AGHT ... LESITER), welches über ein am N-Terminus des Enzyms fusioniertes StrepTagII über eine StrepTactin-Sepharose-Affinitätschromatographie gereinigt werden kann. Wie in den Kapiteln 3.2.2, 3.3.2 und 3.5.2 dargestellt, zeigte dieses rekombinante Protein extrem effiziente Expression in *E.coli* BL21(DE3), eine gute Löslichkeit auch unter Niedrigsalz-Bedingungen und war enzymatisch aktiv. Die Durchführung einer limitierten tryptischen Proteolyse in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  (+/- 250  $\mu\text{M}$   $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ) gemäß der von Prof. Mayr und W. Fanick entwickelten Methode führte, wie Abbildung 3.34 zeigt, zu einem den in [Bertsch et al., 2000] beschriebenen Experimenten ähnlichen Ergebnis. Die in etwa den bei der limitierten tryptischen Proteolyse des 36 kDa-Fragmentes auftretenden, die 31 kDa Bande bildenden Fragmenten entsprechende „Vollängenform“ dieses rekombinanten Enzyms wurde durch die Protease zwar nach wie vor spezifisch hydrolysiert; insbesondere zeigte sich in Gegenwart von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  die auch von [Bertsch et al., 2000] beobachtete deutliche Stabilisierung einer 21 kDa großen Bande und die daraus resultierende Unterdrückung der Bildung der in Abwesenheit des Inositolphosphates prominentesten Bande bei 16 kDa. Ein sukzessiver Abbau des „Vollängenproteins“ zu geringfügig kleineren Polypeptiden, wie er für das 36 kDa-Konstrukt beobachtet wurde, trat hier jedoch nicht auf, was die oben aufgestellte Hypothese der kompakteren Faltung des 31 kDa-Fragmentes gegenüber dem 36 kDa-Fragment zu bestätigen scheint.

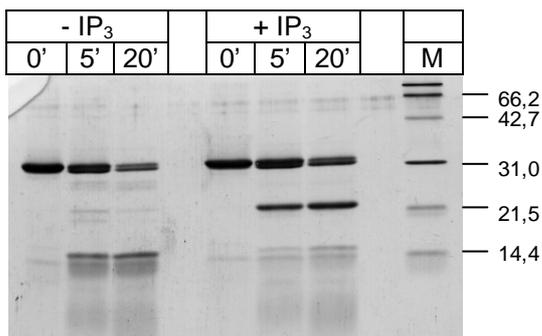


Abbildung 3.34: Limitierte tryptische Proteolyse affinitätsgereinigter Strep-GIK(184-452). 15 %-SDS-PAGE, Coomassie-Färbung. Dargestellt wurde jeweils ein Zeitverlauf (0', 5', 20') in Abwesenheit bzw. in Anwesenheit von 250  $\mu\text{M}$   $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ . Die Hydrolysen wurden in einem Phosphatpuffersystem bei 30°C durchgeführt.

## 3.5 Enzymkinetische Charakterisierung rekombinanter IP3K

### 3.5.1 Enzymkinetische Charakterisierung von GIK(156-452)-wt und Mutanten

#### 3.5.1.1 Identifikation der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> - Bindungsdomäne

Zur Identifikation einzelner, für Substratbindung und/oder Katalyse essentieller Aminosäurereste wurden wie in Kapitel 3.1.2 dargelegt gezielt mutierte GgIP3K-A-cDNAs hergestellt und die darauf codierten Proteine in *E.coli* BL21(DE3) zur Expression gebracht. Die i.a. affinitätsgereinigten, im Falle des Proteins GIK(156-452) die katalytische sowie die Calmodulin-Bindungsdomäne umfassenden rekombinanten Enzyme wurden sodann gemäß der in Kapitel 2.2.4.1 beschriebenen Methodik enzymkinetisch charakterisiert und die erhaltenen Werte (apparente Michaelis-Menten-Konstante für Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, apparente Michaelis-Menten-Konstante für ATP und spezifische Aktivität) mit den den Wildtyp charakterisierenden Parametern verglichen.

Die Auswahl der ausgetauschten Reste erfolgte i.a. anhand von Alignments der Aminosäuresequenzen aller bisher bekannten Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3 – Kinase – Isoformen und Sequenzvergleichen mit anderen inositolphosphatbindenden Proteinen (Phosphatidylinositol 3 – Kinasen, Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> – Rezeptoren, InsP<sub>6</sub> – Kinasen). Fast alle mutagenisierten Reste sind in allen bisher bekannten Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase-Isoformen aller untersuchten Spezies vorhanden. Da insbesondere die in die Inositolphosphatbindung involvierten Reste identifiziert werden sollten, konzentrierten sich die Mutagenese-Studien im wesentlichen auf die Analytik von Mutanten, bei denen hochkonservierte basische (und somit bei physiologischem pH positiv geladene) Reste (K,R) ausgetauscht wurden. Im Falle des Auftretens hochsignifikanter Effekte wurden im allgemeinen mehrere alternative Austausche derselben Aminosäure durchgeführt und die entsprechend mutierten Proteine enzymatisch charakterisiert. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass die beobachteten Veränderungen der enzymatischen Parameter im wesentlichen durch die Abwesenheit des in der Wildtyp-Sequenz vorkommenden Restes und nicht etwa allein durch die Natur der stattdessen eingefügten Aminosäure bedingt waren.

Hinausgehend über die Identifikation direkt in die Inositolphosphatbindung involvierter Aminosäurereste wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere Beobachtungen gemacht, welche Hinweise auf regulative Aspekte der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase-Aktivität geben können, des weiteren konnte, aufbauend auf der Untersuchung ausgewählter GgIP3K-A-Mutanten, im Rahmen der Dissertation von K.Hillemeier der molekulare Mechanismus potenter Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinasehemmstoffe charakterisiert werden [Hillemeier, 2001].

Die folgenden Kapitel beschreiben detailliert die erhaltenen Ergebnisse; eine kurze Zusammenfassung bieten die Tabelle 3.4 sowie die Abbildung 3.51 im Kapitel 3.5.1.3.

**Bestimmung der apparenten  $K_m$  – Werte für  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ : Aminosäurereste im Sequenzumfeld des durch  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  vor tryptischer Proteolyse geschützten Bereiches erfüllen Funktionen bei der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Bindung**

Die apparenten  $K_m$  – Werte für  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  der wt-GgIP3K-A sowie der mutierten Enzyme wurden gemäß dem in Kapitel 2.2.4.1.2.3 dargelegten single-transient-Verfahren bestimmt (Initialkonzentrationen  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ : 5  $\mu\text{M}$ ; ATP: 0,5 mM); eine graphische Darstellung der erhaltenen Ergebnisse bietet Abbildung 3.35, die exakten numerischen Mittelwerte einschließlich der berechneten Standardabweichungen und der zugrundegelegten Anzahl unabhängiger Experimente sind aus Tabelle 3.4 im Abschnitt 3.5.1.3 zu entnehmen.

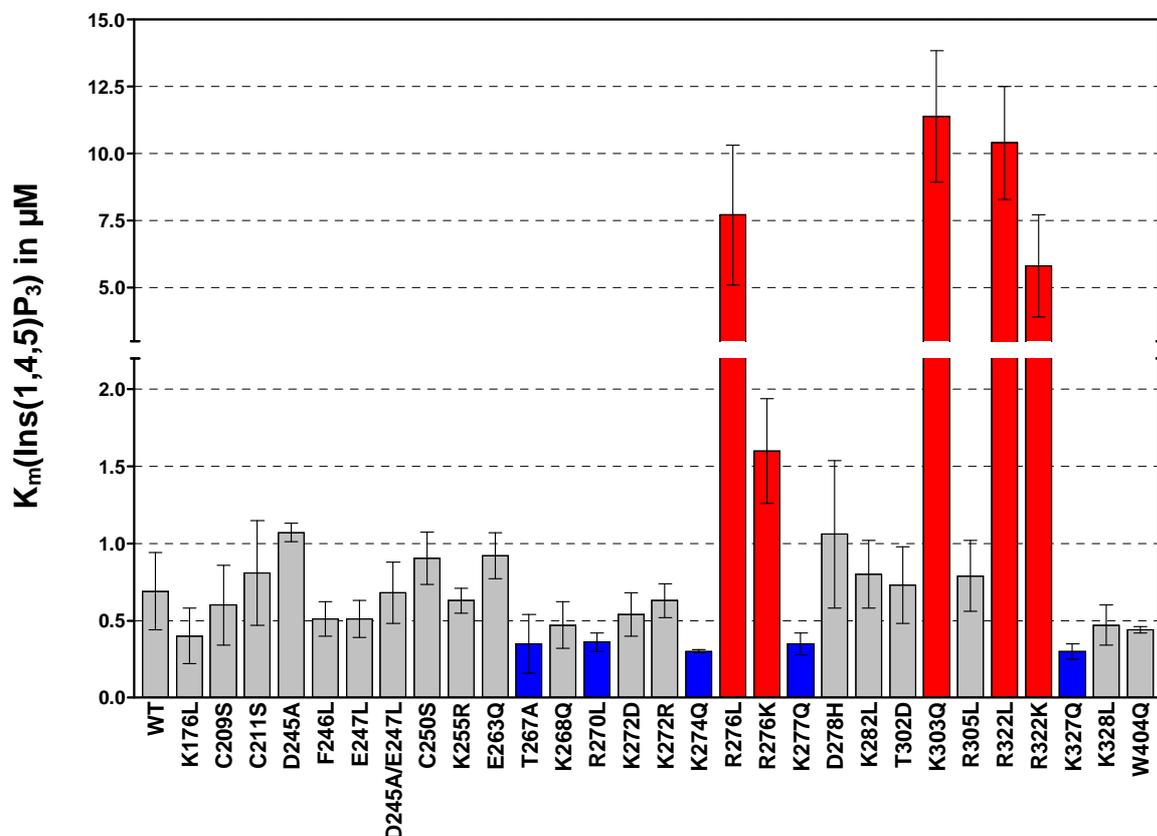


Abbildung 3.35: Mittels single-transient-Auswertungen bestimmte apparente  $K_m$ -Werte für  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  verschiedener GgIP3K-A-Mutanten (vgl. Tabelle 3.4). Blaue Balken markieren Mutanten mit signifikant gegenüber der apparenten Michaelis-Menten-Konstante für  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  des wt-Enzyms verringertem apparentem  $K_m(\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3)$  (T267A, R270L, K274Q, K277Q, K327Q); die rot dargestellten Werte sind im Vergleich zu den Daten des wt-Enzyms signifikant erhöht (R276L, R276K, K303Q, R322L, R322K). Die Fehlerbalken markieren die bei mindestens zwei unabhängigen Experimenten beobachtete Standardabweichung der erhaltenen  $K_m$ -Werte.

Für die Mutanten R276L, K303Q sowie R322L wurden gegenüber dem für das wt-Enzym messbaren apparenten  $K_m$  – Wert für  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  deutlich erhöhte Werte ermittelt: während der für das wt-Enzym bestimmbare Wert von  $(0,69 \pm 0,25)$   $\mu\text{M}$  für eine hochaffine Bindung

des Substrates  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  an das Enzym spricht, wurden für die Mutanten R276L, K303Q und R322L Werte von  $(7,71 \pm 2,6) \mu\text{M}$ ,  $(11,39 \pm 2,45) \mu\text{M}$  und  $(10,4 \pm 2,1) \mu\text{M}$  gemessen; ein Hinweis auf eine deutlich schlechtere Affinität der untersuchten Proteine für  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ .

Um sicherzustellen, dass die bei den Mutanten R276L und R322L beobachteten erhöhten Werte im wesentlichen durch das Fehlen des jeweiligen Argininrestes und nicht etwa durch die Anwesenheit des hydrophoben Leucinrestes an einer im wt-Enzym von einer bei physiologischem pH positiv geladenen und somit hydrophilen Aminosäure besetzten Position hervorgerufen werden, wurden darüberhinaus Enzyme untersucht, bei denen an den entsprechenden Positionen der hochkonservative Austausch von Arginin gegen das ebenfalls bei physiologischem pH positiv geladen vorliegende Lysin vorgenommen worden war (Mutanten R276K und R322K). Auch diese Mutanten zeigten signifikant gegenüber dem wt-Enzym erhöhte apparente  $K_m$  – Werte für  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  (R276K:  $(1,60 \pm 0,34) \mu\text{M}$ ; R322K:  $(5,82 \pm 1,9) \mu\text{M}$ ); der Erhalt einer positiven Ladung an den entsprechenden Positionen resultierte jedoch wie zu erwarten in einer Abschwächung des Effektes.

Ein analoger hochkonservierter Austausch wurde für das K255 vorgenommen (Mutante K255R). Von [Togashi et al., 1997] wurde beschrieben, dass durch den Austausch des Lysin 262 der RnIP3K-A durch Alanin oder Asparagin die Eigenschaft des Proteins als hochaffiner  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Rezeptor verloren geht. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Mutation des entsprechender Position innerhalb der Primärstruktur gelegenen Lysin 255 der GgIP3K-A zu Alanin und Asparagin resultierte ebenfalls in der Expression eines nicht mehr als  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinase funktionierenden Proteins. Die Mutante K255R zeigt jedoch sowohl bezüglich des apparenten  $K_m$  – Wertes für  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  als auch bezüglich der weiteren enzymkinetisch bestimmten Parameter (siehe folgende Abschnitte) keine signifikanten Veränderungen gegenüber dem wt-Enzym, so dass an der Position 255 offenbar die Präsenz einer positiven Ladung, nicht aber einer ganz bestimmten Aminosäure (Lysin oder Arginin) von Bedeutung für die Funktion der Kinase zu sein scheint.

Für fünf der untersuchten Mutanten (T267A, R270L, K274Q, K277Q, K327Q) wurde ein gegenüber dem wt-Enzym signifikant (gemäß Student's t-Test:  $p < 0,005$ ) verringerter apparenter  $K_m$  – Wert für  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  gemessen (T267A:  $(0,35 \pm 0,19) \mu\text{M}$ , R270L:  $(0,36 \pm 0,06) \mu\text{M}$ , K274Q:  $(0,30 \pm 0,01) \mu\text{M}$ , K277Q:  $(0,35 \pm 0,07) \mu\text{M}$ , K327Q:  $(0,30 \pm 0,05) \mu\text{M}$  gegenüber wt:  $(0,69 \pm 0,25) \mu\text{M}$ ). Dies kann als Hinweis auf einen erleichterten Zugang von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  zur active site (erhöhte on-rate  $k_{on}$ ) und/oder auf eine mit einer geringeren, die Abdissoziation von gebundenem Inositolphosphat beschreibenden off-rate  $k_{off}$  bei diesen Mutanten gewertet werden. In der Tat belegen von Prof. Mayr und W. Fanick unter Verwendung von Tritium-markiertem  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  durchgeführte Bindungsassays, dass die wie oben beschrieben bestimmten apparenten  $K_m$ -Werte für  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  tatsächlich als Meßgröße für die Affinität des Enzyms zu diesem Substrat interpretierbar sind. So wurde in den zitierten Untersuchungen

für die Mutanten K176L, F246L und K255R eine mit dem wt-Enzym vergleichbare Bindung des tritiummarkierten  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  detektiert, während bei gleicher Konzentration der Mutanten R276L bzw. R322L nur eine sehr geringe Menge des Inositolphosphates gebunden wurde. Ein Austausch der genannten Argininreste durch Lysinreste (Mutanten R276K, R322K) resultierte ebenfalls in einer deutlich verringerten Fähigkeit zur  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Bindung, wobei die Verringerung der Bindungsaffinität bei diesen sehr konservativen Austauschen jedoch weniger stark ausgeprägt war als die beim Austausch der hydrophilen Argininreste durch die hydrophoben Leucinreste. Die von Prof. Mayr und W. Fanick bei der direkten Messung der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Bindung an rekombinante GgIP3K-A gewonnenen Ergebnisse korrelieren somit für alle auf diese Weise analysierten Mutanten sehr gut mit den aus der Betrachtung der durch single-transient-Messungen gewonnenen apparenten  $K_m$  – Werten für  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ; eine Interpretation dieser Daten als Meßgröße für die  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  - Affinität der untersuchten Mutanten erscheint somit zulässig.

Abbildung 3.36 fasst die in diesem Abschnitt beschriebenen Ergebnisse noch einmal qualitativ zusammen; gleichzeitig wird die Lage der die Inositolphosphatbindung beeinflussenden Aminosäurereste auf der Primärstruktur des von dem Vektor pET-17b-GIK codierten IP3K-Fragmentes GIK(156-452) veranschaulicht.

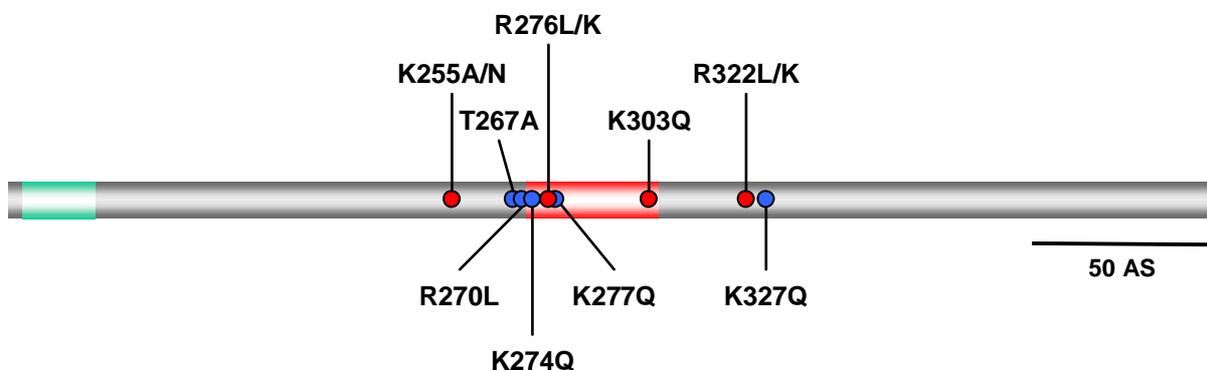


Abbildung 3.36: Schematische, auf Ebene der Primärstruktur gehaltene Darstellung der in die Inositolphosphatbindung involvierten Aminosäurereste. Dargestellt wurde das in den Untersuchungen eingesetzte, die Calmodulin-Bindungsdomäne (hellblau) sowie die katalytische Domäne umfassende, insgesamt 318 Aminosäurereste umfassende Konstrukt GIK(156-452). Der in Anwesenheit von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  vor proteolytischer Degradation durch Trypsin geschützte Bereich (E271 – R305; [Bertsch et al., 2000]) ist rot dargestellt; rot/blau markieren die Reste, deren angegebene Mutation(en) zu signifikanten Erhöhungen/Erniedrigungen des apparenten  $K_m$  – Wertes für  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  der jeweiligen Mutante führen; Austausch des ebenfalls durch einen roten Punkt markierten K255 durch A oder N führt zu einem zu keiner Inositolphosphatbindung mehr befähigten Enzym [Togashi et al., 1997]. Die Nummerierung der Aminosäurereste bezieht sich auf ihre Lage bezüglich des Translationsstarts des Volllängenenzym, nicht auf das Startmethionin des pET-17b-GIK-codierten trunkierten Fragmentes.

Reste, deren Austausch gegen die oben genannten Aminosäuren zu einer Verringerung der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Bindungsaffinität führte, liegen sowohl im Bereich des in Anwesenheit von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  vor tryptischer Proteolyse geschützten Sequenzabschnittes (R276, K303) als auch in einem Abstand von ca. 20 Aminosäureresten N- bzw. C-terminal flankierend zu diesem (K255 bzw. R322). Mutationen in dem die N-terminale Begrenzung des durch  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  geschützten Bereiches bildenden basischen Clusters führen (zumindest bei den untersuchten Aminosäureaustauschen) zu rekombinanten Enzymen mit leicht, aber dennoch signifikant, verringerten apparenten  $K_m$  – Werten für  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ , was im Kontext des im vorigen Absatz gesagten als eine geringfügig höheraffine Bindung des Inositolphosphates an diese Proteine gedeutet werden könnte. Die Durchführung weiterer radioaktiver Bindungsassays unter Verwendung dieser Mutanten ist zur endgültigen Klärung dieser Frage unerlässlich.

**Bestimmung der spezifischen Aktivitäten für den Umsatz von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  : Aminosäurereste im Sequenzumfeld des durch  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  vor tryptischer Proteolyse geschützten Bereiches beeinflussen die maximale Umsatzgeschwindigkeit der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinase**

Die spezifischen Aktivitäten der gezielt mutierten GgIP3K-A-Fragmente wurden für die meisten der untersuchten Mutanten durch direkte Messung der maximalen Umsatzgeschwindigkeiten unter Substratsättigungsbedingungen (25  $\mu\text{M}$   $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ , 0,5 mM ATP) und Normierung der erhaltenen Werte auf die eingesetzte Proteinmenge (gemessen mittels Bradford-Assay) bestimmt. Lediglich für die Mutanten mit gegenüber dem wt-Enzym stark erhöhtem apparenten  $K_m$  – Wert für  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  (R276L, R276K, K303Q, R322L, R322K) wurde die maximale Umsatzgeschwindigkeit, welche bei einer Initialkonzentration von 25  $\mu\text{M}$   $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  in diesen Fällen zum Teil noch nicht erreicht wurde, aus der Lineweaver-Burke-Auftragung mehrerer bei initialen  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  - Konzentrationen unterhalb des Substratsättigungsbereiches erhaltener Konzentrations/Geschwindigkeits-Wertepaare ermittelt und zur Berechnung der spezifischen Aktivität der entsprechenden Mutante ebenfalls auf die eingesetzte Proteinmenge normiert. Die numerischen Werte der so errechneten spezifischen Aktivitäten können in der Tabelle 3.4. eingesehen werden; eine graphische Darstellung der Resultate bietet die nachstehende Abbildung 3.37.

Die Mutanten R276L, R276K, K303Q, R322L und R322K, deren apparente  $K_m$  – Werte für das Substrat  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  eine drastische Erhöhung gegenüber dem für das wt-Enzym gemessenen Wert aufweisen (wt :  $(0,69 \pm 0,25)$   $\mu\text{M}$ ; R276L:  $(7,71 \pm 2,6)$   $\mu\text{M}$ , R276K:  $(1,60 \pm 0,34)$   $\mu\text{M}$ , K303Q:  $(11,39 \pm 2,45)$   $\mu\text{M}$ , R322L:  $(10,4 \pm 2,1)$   $\mu\text{M}$ , R322K:  $(5,82 \pm 1,9)$   $\mu\text{M}$ ) zeigen in Bezug auf ihre spezifischen Aktivitäten ein sehr unterschiedliches Verhalten. Während die Mutante R276L bzw. R276K eine gegenüber dem wt-Enzym signifikant erhöhte bzw. unveränderte spezifische Aktivität besitzt (wt-GgIP3K-A:  $(18,01 \pm 2,8)$  U/mg; R276L:  $(34,03 \pm 3,0)$  U/mg; R276K:  $(14,76 \pm 1,6)$  U/mg), resultierte der Austausch von Lysin 303 gegen Glutamin (Mutante K303Q) nicht nur in einer signifikanten Erhöhung des apparenten  $K_m$  – Wertes für  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ , sondern auch in einem Absinken der spezifischen Aktivität auf einen Wert von  $(4,73 \pm 0,3)$  U/mg. Die Mutanten R322L und R322K (apparente  $K_m$  – Werte für  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  für R322L:  $(10,4 \pm 2,1)\mu\text{M}$ , für R322K:  $(5,82 \pm 1,9)$   $\mu\text{M}$ ) zeigen eine noch drastischer verringerte spezifische Aktivität von nur noch  $(0,54 \pm 0,1)$  U/mg (R322L) bzw.  $(0,63 \pm 0,1)$  U/mg.

Für die Mutante C250S, welche bezüglich des apparenten  $K_m$  – Wertes für  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ , keine signifikanten Unterschiede zum wt-Enzym aufwies (gemessen wurde für C250S  $(0,90 \pm 0,17)$   $\mu\text{M}$ ), ergab sich ebenfalls eine gegenüber dem wt-Enzym signifikant niedrigere spezifische Aktivität von  $(4,81 \pm 0,6)$  U/mg; ein Effekt, der nicht ganz so deutlich auch bei der Mutante R305L in Form eines Absinkens der spezifischen Aktivität auf einen Wert von  $(12,57 \pm$

0,8) U/mg zutage trat. Des weiteren wurde auch für eine der Mutanten mit signifikant geringerem apparenten  $K_m$  –Wert für Ins(1,4,5) $P_3$  (K327Q) eine leicht abgesenkte spezifische Aktivität von  $(12,06 \pm 2,7)$  U/mg gemessen.

Neben der oben bereits angesprochenen Mutante R276L konnte noch für drei weitere Mutanten (T267A, R270L, K277Q) eine nicht besonders drastische, aber doch statistisch signifikante ( $p < 0,005$ ) Erhöhung der spezifischen Ins(1,4,5) $P_3$  – 3-Kinaseaktivität festgestellt werden (T267A:  $(23,8 \pm 2,6)$  U/mg; R270L:  $(30,36 \pm 5,0)$  U/mg ; K277Q:  $(25,38 \pm 2,6)$  U/mg gegenüber wt:  $(18,01 \pm 2,8)$  U/mg). Alle drei genannten Mutationen bedingen neben dieser Erhöhung der maximalen Umsatzgeschwindigkeit ebenfalls eine Verringerung des apparenten  $K_m$  – Wertes für Ins(1,4,5) $P_3$ .

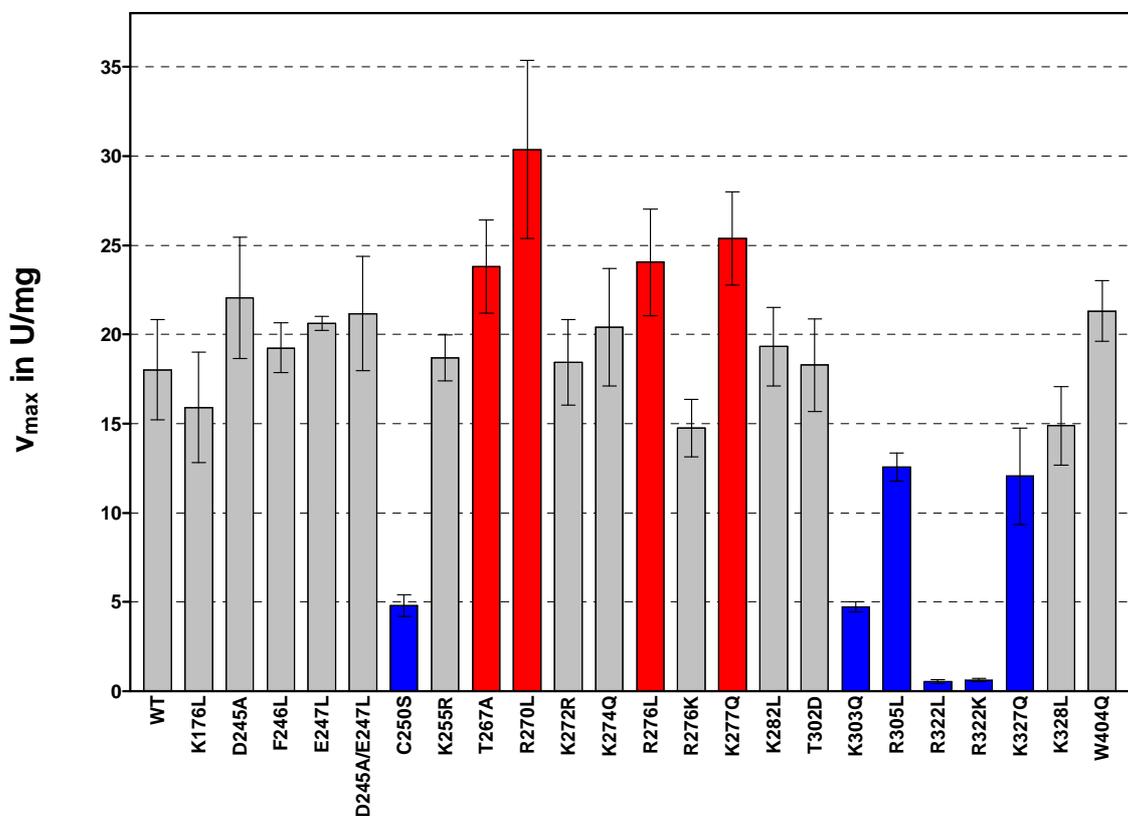


Abbildung 3.37: Spezifische Aktivitäten verschiedener GgIP3K-A-Mutanten (vgl. Tabelle 3.4). Blaue Balken kennzeichnen Mutanten mit signifikant gegenüber dem WT verringerter spezifischer Aktivität (C250S, K303Q, R305L, R322L/K, K327Q); zur Darstellung signifikant erhöhter spezifischer Aktivitäten wurden rote Balken gewählt (T267A, R270L, R276L, K277Q). Die Fehlerbalken geben die gemäß dem Fehlerfortpflanzungsgesetz aus den Standardabweichungen der zur Berechnung der spezifischen Aktivitäten verwendeten Meßgrößen (maximale Umsatzgeschwindigkeit pro  $\mu$ l Enzymlösung in U/ml und Proteinkonzentration der Enzymlösung in mg/ml) berechneten Fehler wieder.

Von [Communi et al., 1993] war gezeigt worden, dass der Austausch des Aspartats an Position 262 der RnIP3K-A gegen Alanin in einem zwar noch zur Substratbindung befähigten, aber katalytisch inaktiven Protein resultierte. Dieses Ergebnis ist direkt auf die GgIP3K-A übertragbar: auch der im Rahmen dieser Arbeit vorgenommene Austausch des an homolo-

ger Position auftretenden Aspartats 407 durch Serin (Mutante D407S) führte zu einem im Rahmen der Sensitivität des zur Messung verwendeten gekoppelten enzymatisch-optischen Tests als inaktiv zu bezeichnenden Protein; sensitivere Assay-Methoden wie die Analytik der Reaktionsansätze mit Hilfe von MDD-HPLC könnten Aufschluß über eventuell vorhandene minimale Restaktivitäten geben. Interessant ist dieses Ergebnis vor allem deshalb, weil dadurch die im Bereich dieses Aspartats auf Sequenzebene bestehende Homologie der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinasen zur Familie der Proteinkinasen auch auf funktioneller Ebene bestätigt werden konnte (Näheres hierzu siehe Diskussion Kapitel 4.3).

In der Abbildung 3.38 sind die oben geschilderten Sachverhalte noch einmal schematisch in Verbindung mit der Lage der ausgetauschten Aminosäuren auf der Ebene der Primärstruktur der GgIP3K-A zusammengefasst; auffällig ist insbesondere die Clusterung von Resten, deren Austausch gegen die oben genannten Aminosäuren zu einer Erhöhung der spezifischen Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase-Aktivität der erhaltenen mutierten Proteine führt im Bereich der N-terminalen Begrenzung des gemäß [Bertsch et al., 2000] durch Anwesenheit von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> vor limitierter tryptischer Proteolyse geschützten Bereichs.

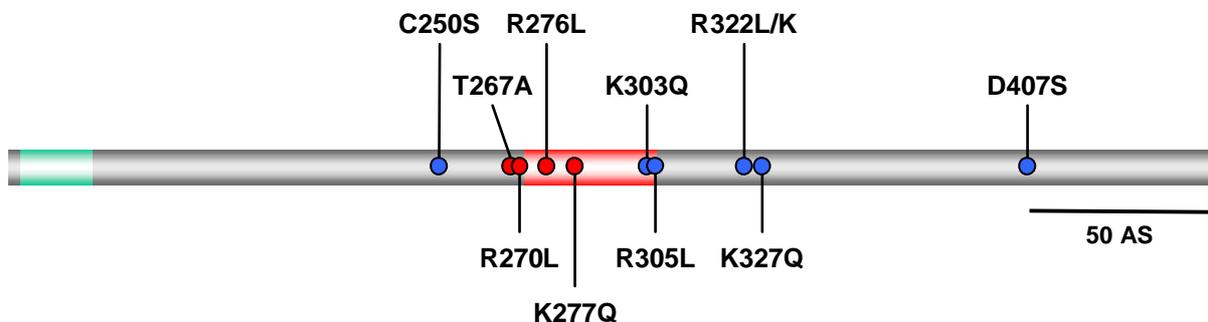


Abbildung 3.38: Position der die maximale Umsatzgeschwindigkeit beeinflussenden Mutationen auf der Primärstruktur des GIK(156-452)

Rote/blau markieren die Reste, deren oben angegebene Mutation(en) zu einer Erhöhung/Erniedrigung der spezifische Aktivität des Enzyms führen. Die Mutanten K255A und K255N zeigen aufgrund ihrer fehlenden Fähigkeit zur Inositolphosphatbindung (siehe vorhergegangenes Kapitel) auch keine katalytische Aktivität; die Mutante D407S ist, wie auch die entsprechende von [Communi et al., 1993] für die RnIP3K-A beschriebene Mutante D414N, katalytisch inaktiv.

**Berechnung der katalytischen Effizienz  $k_{\text{kat}} / K_m$ : Aminosäurereste im Sequenzumfeld des durch  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  vor tryptischer Proteolyse geschützten Bereiches beeinflussen die katalytische Effizienz der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinase**

Sind sowohl der  $K_m$ -Wert eines Enzyms als auch die maximale Umsatzgeschwindigkeit  $v_{\text{max}}$  bekannt, kann der Quotient  $v_{\text{max}}/K_m$  bzw.  $k_{\text{kat}}/K_m$  berechnet werden. Diese Größe ist ein Maß für die katalytische Effizienz des Enzyms; ein Enzym wird bei einer gegebenen, unterhalb seines  $K_m$  – Wertes liegenden Substratkonzentration umso mehr Substratmoleküle umsetzen desto höher seine Wechselzahl  $k_{\text{kat}}$  und desto niedriger sein  $K_m$  – Wert ist. Abbildung 3.39 zeigt die Resultate dieser Berechnung für die auch in Abb. 3.37 dargestellten GIK(156-452)-Mutanten.

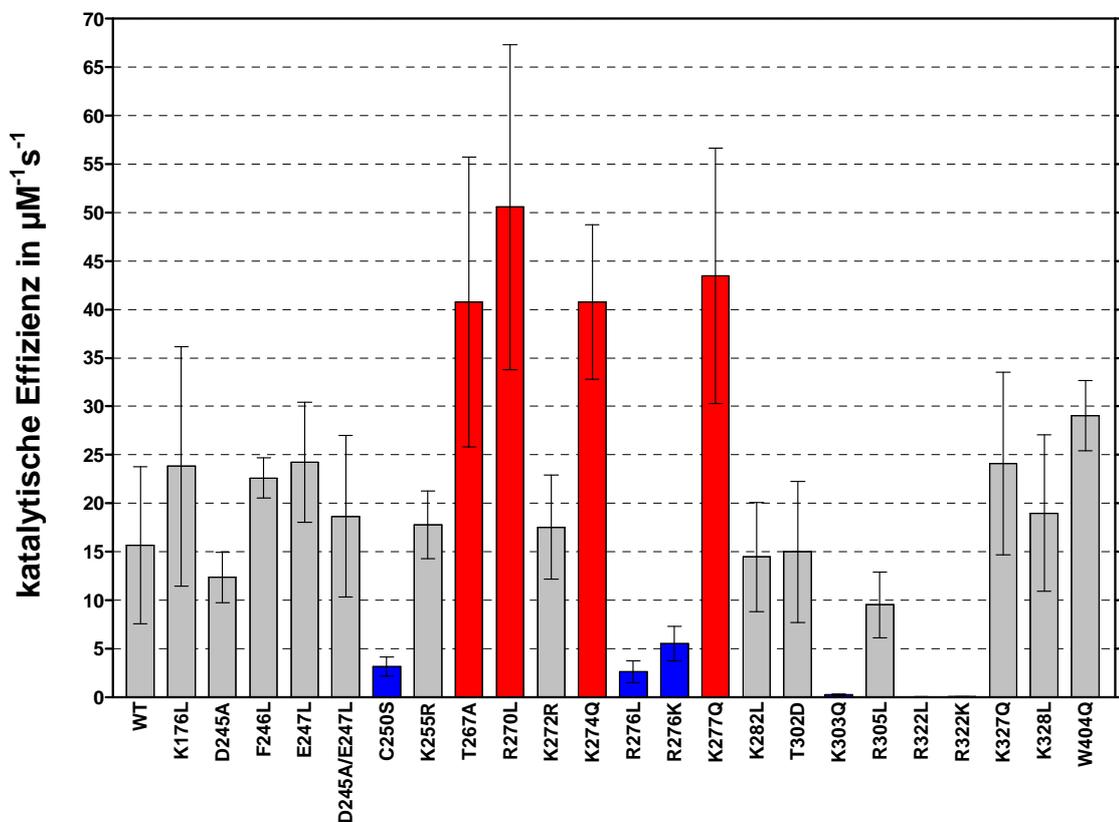


Abbildung 3.39 Katalytische Effizienz verschiedener GgIP3K-A-Mutanten. Blaue Balken kennzeichnen Mutanten mit signifikant gegenüber dem WT verringerter katalytischer Effizienz (C250S, K303Q, R305L, R322L/K, R327Q); zur Darstellung signifikant erhöhter katalytischer Effizienzen wurden rote Balken gewählt (T267A, R270L, R276L, K277Q).

Für die Darstellung in Abbildung 3.39 wurden zunächst die Wechselzahlen  $k_{\text{kat}}$  aus den in U/mg angegebenen maximalen Umsatzgeschwindigkeiten berechnet. Bei einem Molekulargewicht von 36 kDa entspricht ein Umsatz von 1 U/mg einer Wechselzahl von  $0,6 \text{ s}^{-1}$ . Danach wurde der Quotient  $k_{\text{kat}}/K_m$  berechnet, welcher somit die Einheit  $\mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  besitzt. Die Größe der Fehlerbalken wurden gemäß des Fehlerfortpflanzungsgesetzes aus den in Tabelle 3.4 angegebenen Standardabweichungen bzw. Fehlern der  $K_m$  – und  $v_{\text{max}}$  – Werte bestimmt.

## 3.5 Ergebnisse

Wie aus Abb. 3.39 ersichtlich, ist die katalytische Effizienz der Mutanten C250S, R276L, R276K, K303Q, R322L und R322K stark herabgesetzt, während die Mutationen T267A, R270L, K274Q und K277Q zu einer deutlichen Zunahme der katalytischen Effizienz führen. Die Lage der betreffenden Mutationen auf der Primärstruktur des Proteins GIK(156-452) ist in Abbildung 3.40 schematisch wiedergegeben.

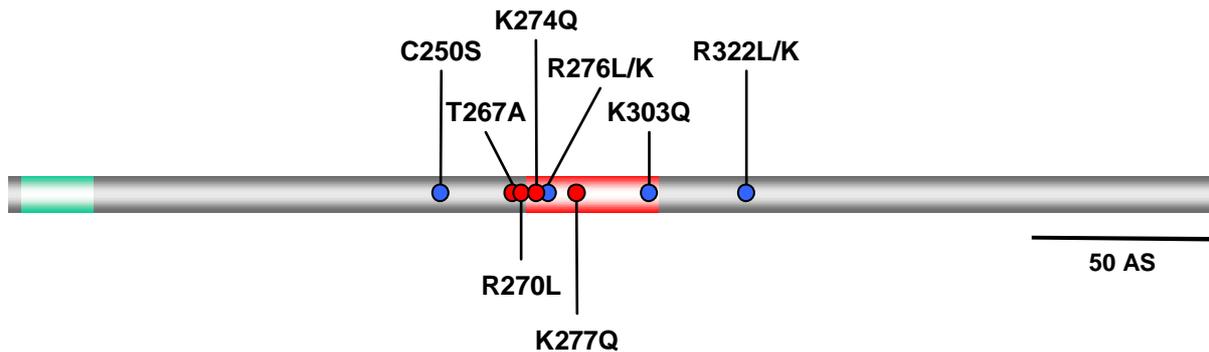


Abbildung 3.40: Position der die katalytische Effizienz  $k_{\text{kat}}/K_m$  beeinflussenden Mutationen auf der Primärstruktur des GIK(156-452)

Rote/blau Punkte markieren die Reste, deren oben angegebene Mutation(en) zu einer Erhöhung/Erniedrigung der katalytischen Effizienz des Enzyms führen.

**Bestimmung der apparenten  $K_m$  – Werte für ATP : Aminosäurereste in den den durch  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  vor tryptischer Proteolyse geschützten Sequenzbereich flankierenden Regionen sind in die Bindung des Substrates ATP involviert**

Für einen Teil der gereinigten gezielt mutierten Kinasen wurde der apparente  $K_m$  – Wert für ATP bestimmt. Hierzu wurden bei einer initialen  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  die bei verschiedenen initialen ATP-Konzentrationen erreichten initialen Umsatzgeschwindigkeiten gemessen; aus der doppelt reziproken Auftragung der erhaltenen (c,v)-Wertepaare gemäß Lineweaver/Burke konnte dann, durch Bestimmung des Schnittpunktes zwischen der Ausgleichsgerade durch die Messpunkte und der  $1/c$  – Achse, der apparente  $K_m$  – Wert für ATP unter den gegebenen Bedingungen berechnet werden. Die so gewonnenen Ergebnisse für die verschiedenen Mutanten sind in Abbildung 3.41 graphisch dargestellt; Tabelle 3.4 beinhaltet die genauen numerischen Angaben hierzu.

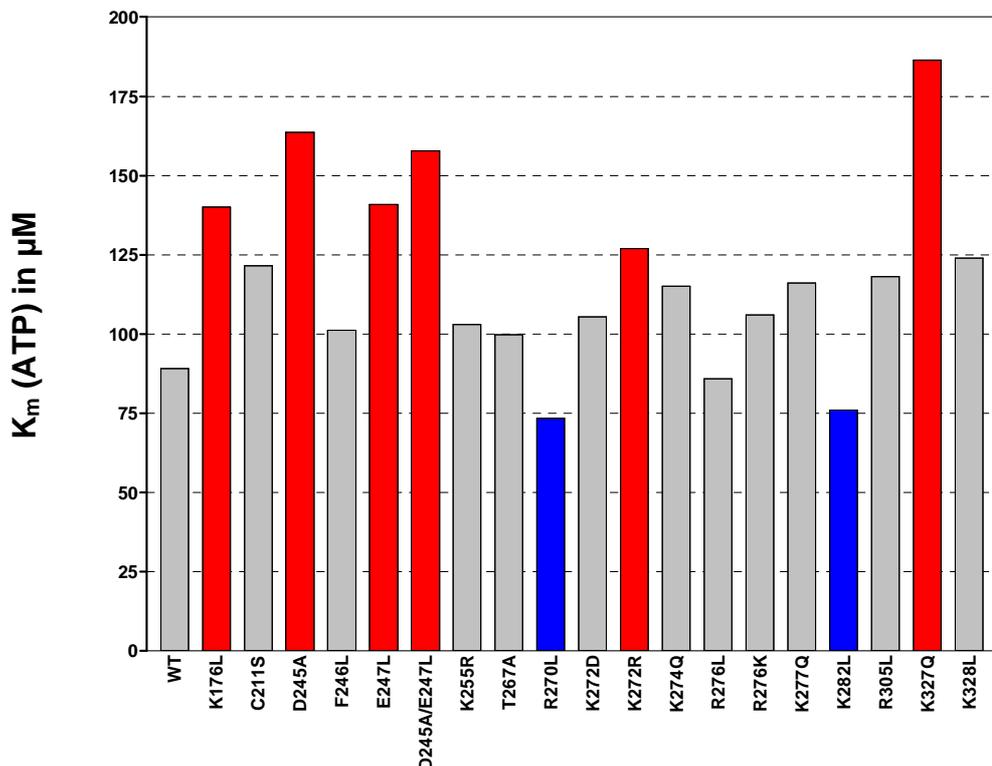


Abbildung 3.41: Mittels Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeiten ermittelte  $K_m$  – Werte für ATP verschiedener GgIP3K-A-Mutanten. Sechs der untersuchten Mutanten (rote Balken: K176L, D245A, E247L, D245A/E247L, K272R, K327Q) zeigen einen gegenüber dem für das wt-Enzym gemessenen Wert deutlich höheren  $K_m$  – Wert für ATP, für zwei der Mutanten (blaue Balken: R270L, K282L) wurden deutlich geringere Werte gemessen.

Fünf Mutanten (K176L, D245A, E247L, K272R, K327Q) sowie die Doppelmutante D245A/E247L zeigten einen über den für das wt-Enzym gemessenen Wert erhöhten apparenten  $K_m$  – Wert für ATP (K176L: 140  $\mu\text{M}$ , D245A: 164  $\mu\text{M}$ , E247L: 141  $\mu\text{M}$ , D245A/E247L: 158  $\mu\text{M}$ , K272R: 127  $\mu\text{M}$ , K327Q: 186  $\mu\text{M}$  gegenüber wt: 89  $\mu\text{M}$ ); für zwei Mutanten (R270L,

K282L) wurde eine Verringerung dieser Größe festgestellt (R270L: 73  $\mu\text{M}$ , K282L: 76  $\mu\text{M}$ ). Die Aminosäurereste, deren oben genannte Austausch zu einer Erhöhung des apparenten  $K_m$  – Wertes für ATP führen, liegen alle außerhalb bzw. dicht an der N-terminalen Begrenzung des gemäß [Bertsch et al., 2000] in Anwesenheit von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  vor proteolytischer Degradation geschützten Bereiches; die apparenten  $K_m$  – Werte für ATP fast aller innerhalb dieses Sequenzabschnittes untersuchten Mutanten (K274Q, R276L, R276K, K277Q, R305L) zeigten gegenüber dem wt-Enzym keine signifikante Veränderung (Ausnahme ist die oben bereits erwähnten Mutante K282L). Abbildung 3.42 verdeutlicht diese Resultate noch einmal in schematischer Form.

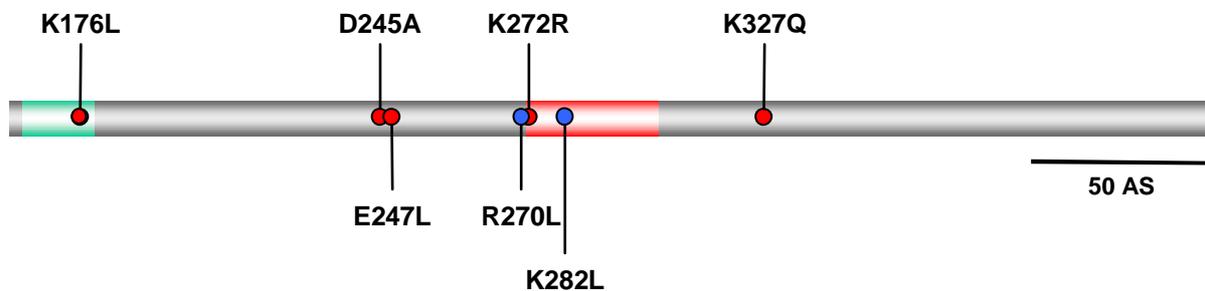


Abbildung 3.42: Schematische, auf Ebene der Primärstruktur gehaltene Darstellung der Lage von Aminosäureresten, deren Austausch gegen die oben angegebenen Reste zu einer Veränderung des apparenten  $K_m$  – Wertes für ATP führt. Rote/blau Punkte markieren die Reste, deren oben angegebene Mutation(en) zu signifikanten Erhöhungen/Erniedrigungen des apparenten  $K_m$  – Wertes für ATP der jeweiligen Mutante führen.

### 3.5.1.2 Weitere Eigenschaften ausgewählter Mutanten

#### **Die Mutante T302D zeigt bezüglich der Aktivierbarkeit durch $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ähnliche Charakteristika wie das an diesem Rest durch CaMK II phosphorylierte Enzym**

Durch [Communi et al., 1997] konnte die Phosphorylierung der RnIP3K-A an T311 durch die Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) als physiologisch bedeutsamer Regulationsmechanismus definiert werden. Untersuchungen an *in vitro* phosphoryliertem rekombinatem Enzym zeigten, dass die Auswirkung der Phosphorylierung an dieser Position zum einen in einer Erhöhung der basalen spezifischen Aktivität des Enzyms um den Faktor 8 – 10 gegenüber dem unphosphorylierten Enzym liegt, daneben nimmt aber auch, bei gleicher maximaler Erhöhung der spezifischen Aktivität um den Faktor 2 – 2,5, die Sensitivität auf eine Stimulierung durch den Calcium/Calmodulin-Komplex zu. In Experimenten, die bei einer konstanten Calcium-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  durchgeführt worden waren, wurde halbmaximale Aktivierung bei unphosphoryliertem Enzym bei einer Calmodulin-Konzentration von 52 nM beobachtet, bei *in vitro* phosphoryliertem Enzym bereits bei einer Konzentration von 2 nM; die Sensitivität des Enzyms auf den Calcium/Calmodulin-Komplex wird somit durch eine Phosphorylierung an T311 um den Faktor 26 gesteigert.

Da der zum Threonin 311 der RnIP3K-A homologe Threoninrest der GgIP3K-A (T302) im Bereich der C-terminalen Begrenzung des in Anwesenheit von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  vor tryptischer Proteolyse geschützten Sequenzabschnittes liegt (siehe Abbildung 3.43), wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, die Phosphorylierung durch den Austausch des Threonins durch einen (bei physiologischem pH negative Ladung tragenden) Aspartatrest zu simulieren.

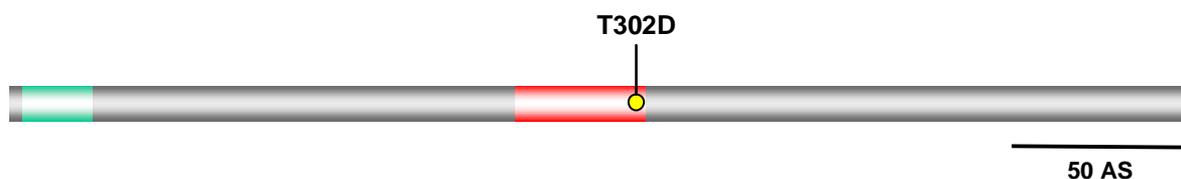


Abbildung 3.43: Schematische Darstellung der Position des Aminosäurerestes T302D (symbolisiert durch den gelben Punkt) unmittelbar vor dem C-terminalen Ende des in Anwesenheit von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  vor der tryptischen Proteolyse geschützten Bereiches ([Bertsch et al., 2000], hier rot markiert)

Vergleichende Untersuchungen zur Calcium/Calmodulin-Stimulierbarkeit des rekombinanten GgIP3K-A wt-Enzyms und der Mutante T302D, deren Resultate in Abbildung 3.44 graphisch dargestellt werden, zeigten in der Tat ein mit den oben geschilderten Ergebnissen übereinstimmendes Bild: wt-Enzym sowie Mutante wurden bei einer konstanten Calciumkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  gleichstark aktiviert: die spezifischen Aktivitäten beider Enzyme konnten

durch Interaktion mit dem Calcium/Calmodulin-Komplex maximal um den Faktor 2 gesteigert werden, wobei halbmaximale Aktivierung der Mutante T302D bereits bei einer Calmodulinkonzentration von 2,2 nM, bei der wt-Kinase hingegen erst bei 11,6 nM Calmodulin erreicht wurde; dies entspricht einer durch den Austausch von T302 durch Aspartat bedingten Steigerung der Sensitivität der Kinase auf den Calcium/Calmodulin-Komplex um den Faktor 5,3. Die Bestimmung der zum Erreichen der halbmaximalen Aktivierung notwendigen Calmodulinkonzentration erfolgte hierbei durch Fitting der in Abbildung 3.44 dargestellten Messdaten durch ein sigmoidales dose-response-Modell.

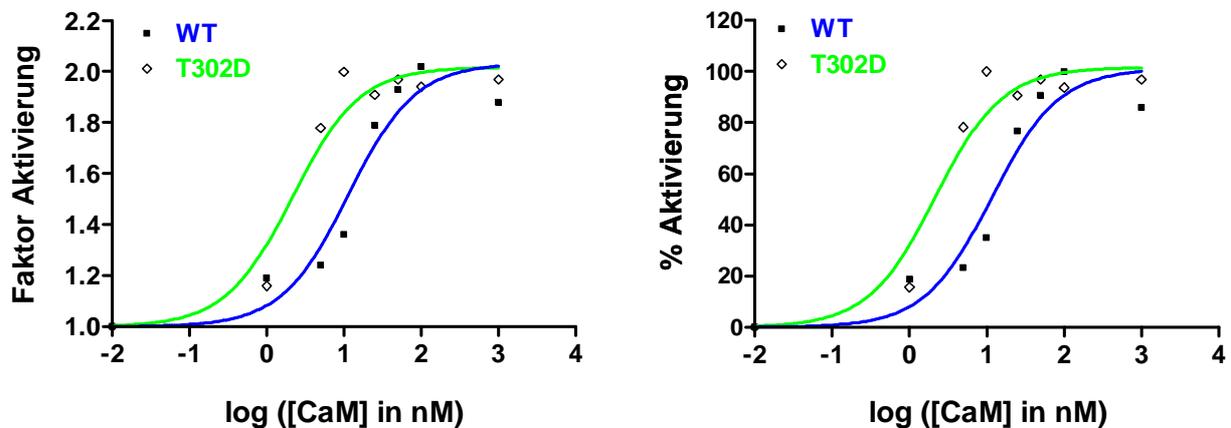


Abbildung 3.44: Aktivierbarkeit durch  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  von GIK(156-452)-wt und GIK(156-452)-T302D. Im linken Diagramm wurde der bei den verschiedenen Calmodulinkonzentrationen gemessene Aktivierungsfaktor (= spezifische Aktivität des Enzyms bei der gegebenen Calmodulinkonzentration / spezifische Aktivität des Enzyms in Abwesenheit von Calmodulin) dargestellt; der rechte Graph gibt dieselben Daten, aber prozentual auf die maximal für das entsprechende Protein erreichbare Aktivierung normiert, wieder. Für jeden Meßpunkt wurde die Anfangsgeschwindigkeit des enzymatischen Umsatzes bei der entsprechenden Calmodulinkonzentration unter Substratsättigungsbedingungen ( $25 \mu\text{M}$  Ins(1,4,5) $\text{P}_3$ ,  $0,5 \text{ mM}$  ATP) bestimmt; die Konzentration der freien Calciumionen wurde unter Benutzung des Programmes Maxchelator auf  $10 \mu\text{M}$  eingestellt.

Die Mutante T302D zeigte darüberhinaus einen gegenüber dem wt-Enzym unveränderten apparenten  $K_m$  – Wert für Ins(1,4,5) $\text{P}_3$  von  $(0,73 \pm 0,25) \mu\text{M}$  (gegenüber wt:  $(0,69 \pm 0,25) \mu\text{M}$ ) und eine ebenfalls gegenüber dem Wert für das wt-Enzym  $((18,01 \pm 2,8) \text{ U/mg})$  nicht signifikant veränderte spezifische Aktivität von  $(18,27 \pm 2,6) \text{ U/mg}$ . Während also der Austausch des Threonin 302 der GgIP3K-A durch Aspartat in der Tat zu einer auf Interaktion mit dem Calcium/Calmodulin-Komplex analog zu dem an dieser Stelle phosphorylierten Enzym reagierenden Kinase führt, zeigt nur das tatsächlich phosphorylierte Protein, nicht aber die Mutante T302D eine Steigerung seiner basalen (d.h. nicht Calcium/Calmodulin-abhängigen) Aktivität.

### Die Mutante K176L wird zu einem geringeren Maße als das WT-Enzym durch $Ca^{2+}$ /CaM aktiviert

Erneux et al. demonstrierten an rekombinanter RnIP3K-A die große Bedeutung des Tryptophanrestes 165 (homologe Position in der hier untersuchten GgIP3K-A: W159) für die Calcium/Calmodulin-abhängige Stimulation der Ins(1,4,5) $P_3$  3-Kinase-Aktivität: Die enzymatische Charakterisierung der Mutanten W165G sowie W165R ergab, dass die nach wie vor vorhandene katalytische Aktivität dieser rekombinanten Proteine nicht mehr, im Gegensatz zu den beim wt-Enzym vorliegenden Gegebenheiten, durch den Calcium/Calmodulin-Komplex über den Basalwert hinaus stimulierbar war [Erneux et al., 1993].

Wie die Abbildung 3.45 zeigt, gibt es neben dem im vorigen Abschnitt erwähnten Tryptophanrest einige weitere Aminosäuren, welche in den Calmodulinbindungsdomänen aller Ins(1,4,5) $P_3$  3-Kinasen an homologer Position auftreten; unter anderem ist auch das Lysin 176 (Zählung der Reste gemäß der Position in der in dieser Arbeit untersuchten GgIP3K-A) ein solcher hochkonservierter Rest.

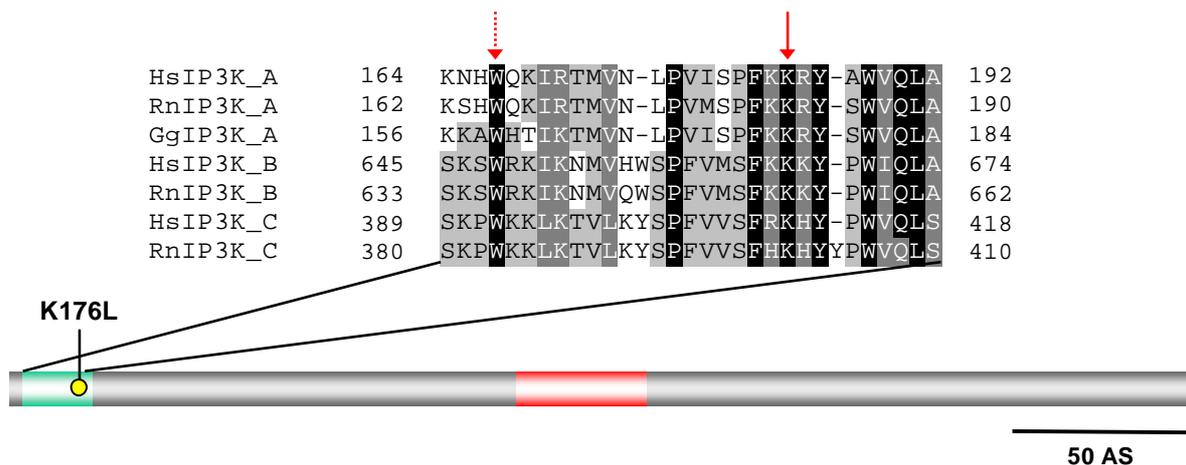


Abbildung 3.45: Schematische Darstellung der Position des Aminosäurerestes K176 im Bereich der Calmodulin-Bindungsdomäne des Proteins GIK(156-452). Dargestellt wurde des weiteren ein Alignment der CaM-Bindungsdomäne aller bekannten  $Ca^{2+}$  / CaM – regulierten Ins(1,4,5) $P_3$  3-Kinasen; der im Text erwähnte Tryptophanrest sowie das K176 (Nummerierung gemäß GgIP3K-A-Volllänge) wurden durch rote Pfeile markiert. Beide Aminosäurereste sind über alle hier dargestellten Ins(1,4,5) $P_3$  3-Kinase - Isoformen konserviert.

Die enzymkinetische Charakterisierung der Mutante K176L ergab einen dem wt-Enzym entsprechenden apparenten  $K_m$  – Wert für Ins(1,4,5) $P_3$  von  $(0,40 \pm 0,18) \mu M$  (wt:  $(0,69 \pm 0,25) \mu M$ ) und eine ebenfalls unveränderte spezifische Aktivität von  $(15,9 \pm 2,8) U/mg$  (wt:  $(18,01 \pm 2,8) U/mg$ ) sowie einen moderat gegenüber dem Wert für das wt-Enzym ( $89 \mu M$ ) erhöhten apparenten  $K_m$  – Wert für ATP. Deutliche Unterschiede ergaben sich hingegen bei der Messung der Aktivierbarkeit der Mutante durch Calcium/Calmodulin: während, wie im vorhergehenden Abschnitt bereits dargestellt, unter den gewählten Assaybedingungen eine maximale

Steigerung der spezifischen Aktivität des wt-Enzyms um den Faktor 2 zu beobachten war, konnte für die Mutante K176L nur eine deutlich geringere Erhöhung des Umsatzes detektiert werden; auch bei den höchsten gewählten Calmodulin-Konzentrationen wurde lediglich eine um den Faktor 1,4 gegenüber dem Basalwert gesteigerte Aktivität nachgewiesen. Auffällig ist jedoch, dass die Konzentration von Calmodulin, welche bei gegebener Calciumkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  für eine halbmaximale Aktivierung der Kinase notwendig ist, für die Mutante K176L deutlich niedriger als für das wt-Enzym ist (wt: 11,6 nM, K176L: 0,6 nM; siehe nachstehende Abbildung 3.46). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass nicht die Bindung des Calcium/Calmodulin-Komplexes per se, sondern vielmehr die tatsächliche Stimulation der Kinaseaktivität durch den Austausch des bei physiologischem pH positiv geladenen Lysins 176 gegen das hydrophobe Leucin negativ beeinflusst wird. Für diese Hypothese spricht ferner die Tatsache, dass eine effiziente Reinigung der Mutante K176L mit Hilfe der Calmodulin-Sepharose-Affinitätschromatographie problemlos möglich war.

Eine direkte Bestimmung der  $K_d$  – Werte für die Bindung des Calcium/Calmodulin-Komplexes an die Calmodulinbindungsdomänen des wt-Enzyms und der Mutante K176L, beispielsweise unter Anwendung eines Biacore-Systems könnte hier weitere Informationen liefern.

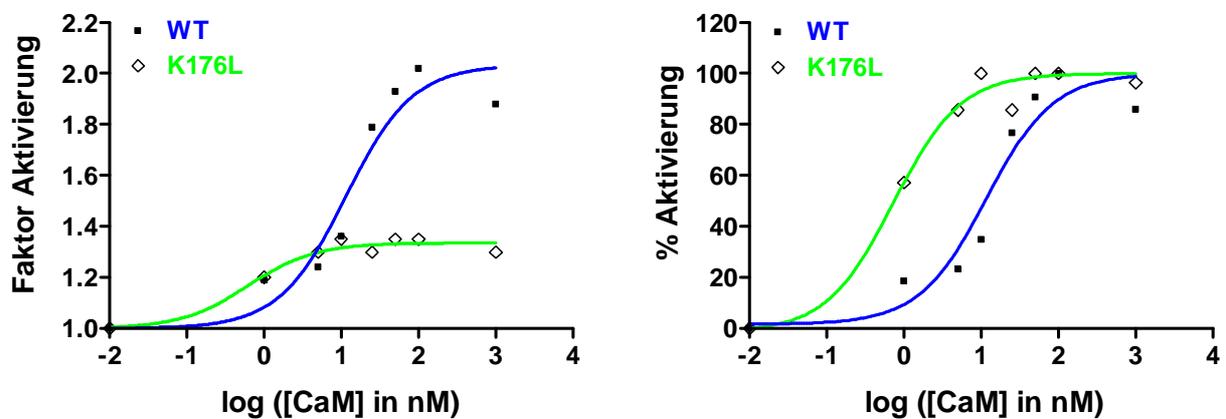


Abbildung 3.46: Aktivierbarkeit von GIK(156-452) und GIK(156-452)-K176L durch  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM; Anmerkungen zur Durchführung der Messungen siehe Abbildung 3.44

### **Die Mutante C250S wird in gleichem Maße wie das WT-Enzym durch NEM inhibiert**

Wie im Kapitel 3.5.1.1 beschrieben zeigt die Mutante C250S eine signifikant gegenüber dem wt-Enzym verringerte spezifische Aktivität von  $(4,81 \pm 0,6)$  U/mg (wt:  $(18,01 \pm 2,8)$  U/mg); der apparente  $K_m$  – Wert dieser Mutante für  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  hingegen entspricht im Rahmen des statistischen Fehlers dem für das wt-Enzym bestimmten Wert (C250S:  $(0,91 \pm 0,17)$   $\mu\text{M}$ ; wt:  $(0,69 \pm 0,25)$   $\mu\text{M}$ ).

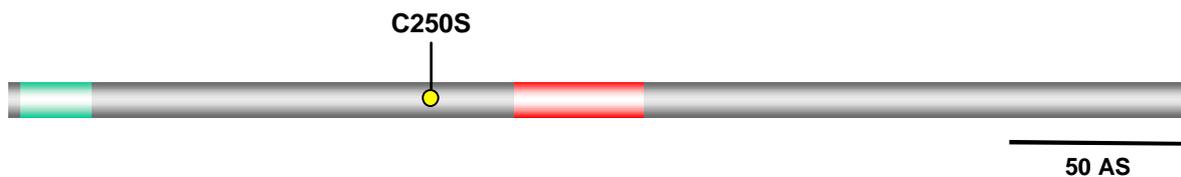


Abbildung 3.47: Schematische Darstellung der Position des Aminosäurerestes C250 (symbolisiert durch den gelben Punkt) im Bereich zwischen der Calmodulin-Bindungsdomäne und dem nach [Bertsch et al., 2000] in Anwesenheit von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  vor tryptischer Proteolyse geschützten Bereich des auf dem Plasmid pET-17b-GIK codierten, N-terminal trunkierten GgIP3K-A-Fragmentes GIK(156-452).

In vorangegangenen Untersuchungen [Haefs, 1994] konnte eine effiziente irreversible Inhibition der aus Hühnererythrozyten isolierten GgIP3K-A durch das Sulfhydrylgruppen alkylierende Reagenz N-Ethylmaleimid (Strukturformel siehe Abb. 3.48) festgestellt werden; hierbei wurde ebenfalls eine drastisch verringerte spezifische Aktivität des mit NEM vorinkubierten Enzyms bei unverändertem apparenten  $K_m$  – Wert für  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  beobachtet.

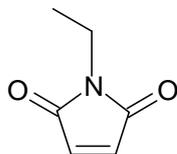


Abbildung 3.48: Strukturformel der zur kovalenten Modifikation von Cysteinresten einsetzbaren, Sulfhydrylgruppen alkylierenden Verbindung N-Ethylmaleimid (NEM).

Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit ähnliche Experimente unter Verwendung des rekombinanten, auf dem Plasmid pET-17b-GIK codierten trunkierten Proteins GIK(156-452) durchgeführt. Neben dem wt-Enzym wurde hierbei die Mutante C250S eingesetzt, um zu prüfen, ob die kovalente Modifikation des C250 durch NEM eine Rolle bei der oben beschriebenen Form der GgIP3K-A-Inhibition spielt; die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 3.49 dargestellt.

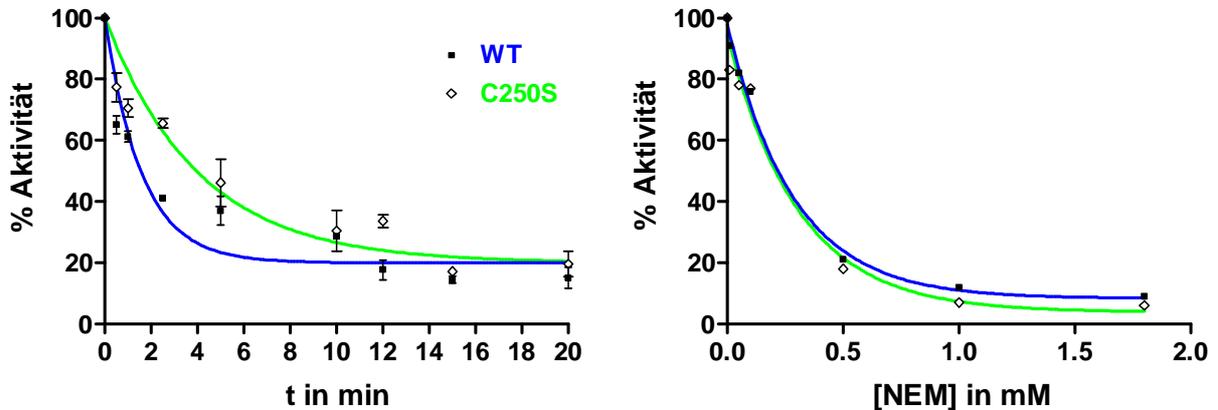


Abbildung 3.49: Inhibition des WT-Enzyms sowie der Mutante C250S durch N-Ethylmaleimid (NEM). Die linke Abbildung zeigt die Abhängigkeit der Stärke der Inhibition von der Inkubationszeit  $t$  bis zum Abstoppen der Reaktion mit DTT bei einer konstanten NEM-Konzentration von  $500 \mu\text{M}$ ; die rechte Abbildung zeigt die Ergebnisse der Messung der Inhibition in Abhängigkeit von der NEM-Konzentration bei einer festen, aus den in der linken Abbildung gezeigten Vorexperimenten abgeleiteten Inkubationszeit von 15 Minuten.

Wie aus Abbildung 3.49 ersichtlich, wird durch Vorinkubation mit  $500 \mu\text{M}$  NEM sowohl für das wt-Enzym als auch für die Mutante C250S eine maximale Verringerung der spezifischen Aktivität um 80 % der uninhibierten Aktivität erreicht; der unterschiedliche zeitliche Verlauf der Kurven ist lediglich durch die unterschiedlichen in den jeweiligen Assays eingesetzten Enzymmengen bedingt. In beiden Fällen ist jedoch bei Inkubationszeiten  $> 15$  Minuten keine Veränderung der gemessenen Inhibition zu verzeichnen, d.h. unter den gewählten Bedingungen ist nach dieser Zeit das Reaktionsgleichgewicht erreicht. Unter Berücksichtigung dieser Voruntersuchung wurden dann die im rechten Teil der Abbildung dargestellten dose-response-Kurven erstellt. Für beide untersuchten Enzyme konnte durch millimolare Konzentrationen von NEM eine Verringerung der spezifischen Aktivität auf  $< 10$  % des Ausgangswertes erreicht werden; halbmaximale Inhibition wird in beiden Fällen bei einer NEM-Konzentration von  $200 \mu\text{M}$  erreicht. Die Fähigkeit zur Umsetzung von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  wird somit in beiden Fällen in gleicher Weise durch die kovalente Modifikation der Proteine durch NEM verringert; der NEM – Effekt wird somit nicht durch die Modifikation des Cysteins 250 vermittelt.

**Die Mutanten D240A/D241A, C254S und R259N zeigen ein gegenüber dem WT-Enzym verändertes Faltungsverhalten bei der rekombinanten Expression in *E.coli* BL21(DE3)**

Drei der untersuchten Mutanten (D240A/D241A, C254S und R259N), deren Lokalisation im Rahmen der GgIP3K-A-Primärstruktur in Abbildung 3.50 dargestellt ist, konnten unter den für das wt-Enzym optimierten Expressions-Standardbedingungen (Inkubation bei 37 °C, Induktion der Expression mit 0,5 mM IPTG) ausschließlich in der unlöslichen Fraktion des *E.coli* – Lysates detektiert werden. Von allen anderen Mutanten konnten hingegen auf diese Weise hinreichend große Mengen des jeweiligen Proteins in der löslichen Fraktion erhalten werden. Diese Beobachtung kann als Hinweis auf eine fehlerhafte bzw. erschwerte Faltung der Mutanten D240A/D241A, C254S und R259N gewertet werden; auffällig ist hierbei insbesondere die Clusterung dieser vermutlich für die korrekte Faltung des Enzyms essentiellen Reste in dem in der untenstehenden Abbildung gezeigten Bereich der GgIP3K-A-Primärstruktur.

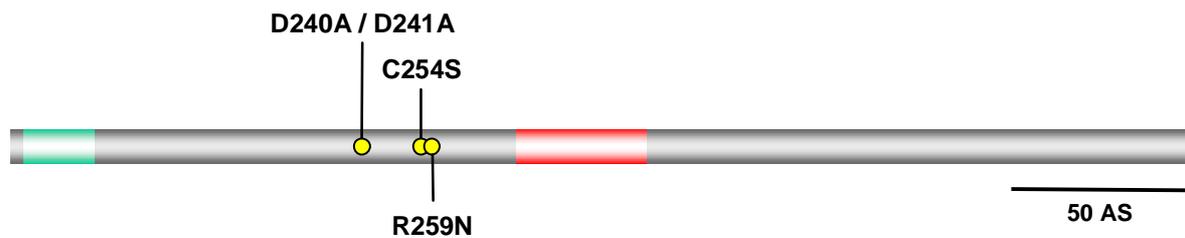


Abbildung 3.50: Schematische Darstellung der Positionen der Aminosäurereste D240/241, C254 und R259 (symbolisiert durch gelbe Punkte) im Bereich zwischen der Calmodulin-Bindungsdomäne und dem gemäß [Bertsch et al., 2000] in Anwesenheit von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  vor tryptischer Proteolyse geschützten Bereich des auf dem Plasmid pET-17b-GIK codierten, N-terminal truncierten GgIP3K-A-Fragmentes.

### 3.5.1.3 Übersicht: Enzymkinetische Charakterisierung von GIK(156-452)-wt und -Mutanten

Dieses Kapitel bietet eine Zusammenfassung aller in den Abschnitten 3.5.1.1 und 3.5.1.2 detailliert beschriebenen Ergebnisse anhand einer Übersichtstabelle der für die untersuchten Mutanten ermittelten Messwerte sowie einer Darstellung der räumlichen Anordnung der mutagenisierten Reste im Rahmen der Primärstruktur des den Untersuchungen zugrundeliegenden GgIP3K-A-Fragmentes GIK(156-452).

Mutante	gereinigt	$K_m(\text{IP}_3)$ in $\mu\text{M}$	$\sigma$	n	$K_m$ (ATP) in $\mu\text{M}$	Spez. Akt. in U/mg	f	$n_v / n_c$	Bemerkung
WT	CaM-S.	0,69	0,25	13	89	18,01	2,8	3/4	
K176L	CaM-S.	0,40	0,10	3	140	15,9	3,1	4/3	verringerte Stimulierbarkeit durch $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ; erhöhter $K_m(\text{ATP})$
C209S	P11	0,60	0,26	6	n.d.	n.d.	-	-/-	
C221S	P11	0,81	0,34	3	121,5	n.d.	-	-/-	
D240A/ D241A	-	-	-	-	-	-	-	-	unlöslich
D245A	CaM-S.	1,07	0,06	3	163,6	22,06	3,4	4/3	erhöhter $K_m(\text{ATP})$
F246L	CaM-S.	0,51	0,01	2	101,2	19,24	1,4	4/3	
E247L	CaM-S.	0,51	0,12	4	140,9	20,61	0,4	4/3	erhöhter $K_m(\text{ATP})$
D245A/ E247L	CaM-S.	0,68	0,20	4	157,8	21,17	3,2	4/3	erhöhter $K_m(\text{ATP})$
C250S	CaM-S.	0,905	0,17	5	n.d.	4,81	0,6	5/4	verringerte spez. Aktivität
C254S	-	-	-	-	-	-	-	-	unlöslich
K255A	P11	-	-	-	-	0,00	-	-	inaktiv
K255N	P11	-	-	-	-	0,00	-	-	inaktiv
K255R	CaM-S.	0,63	0,08	4	103,0	18,69	1,3	5/3	
R259N	-	-	-	-	-	-	-	-	unlöslich
E263Q	P11	0,92	0,15	8	n.d.	n.d.	-	-/-	
T267A	CaM-S.	0,35	0,09	7	99,8	23,8	2,6	2/2	verringertes $K_m(\text{IP}_3)$
K268E	P11	0,47	0,15	5	n.d.	n.d.	-	-/-	
R270L	CaM-S.	0,36	0,06	3	73,3	30,36	5,0	4/2	verringertes $K_m(\text{IP}_3)$
K272D	P11	0,54	0,14	5	105,4	n.d.	-	-/-	
K272R	CaM-S.	0,63	0,11	3	126,9	18,43	2,4	3/3	erhöhter $K_m(\text{ATP})$
K274Q	CaM-S.	0,30	0,01	3	115,0	20,4	3,3	4/3	verringertes $K_m(\text{IP}_3)$
R276L	CaM-S.	7,71	2,6	4	85,8	34,03	3,0		erhöhter $K_m(\text{IP}_3)$

### 3.5 Ergebnisse

R276K	CaM-S.	1,60	0,34	7	106,0	14,76	1,6	4/3	erhöhter $K_m(IP_3)$
D278H	P11	1,06	0,48	5	n.d.	n.d.	-	-/-	
K277Q	CaM-S.	0,35	0,07	3	116,1	25,38	2,6	4/3	verringertes $K_m(IP_3)$
K282L	CaM-S.	0,80	0,22	5	76,0	19,31	2,2	4/3	
T302D	CaM-S.	0,73	0,25	3	n.d.	18,27	2,6	3/4	Erhöhte $Ca^{2+}/CaM$ -Sensitivität
K303Q	CaM-S.	11,39	2,45	3	n.d.	4,73	0,3	3/3	erhöhter $K_m(IP_3)$ verringerte spez. Aktivität
R305L	CaM-S.	0,79	0,23	4	118,1	12,57	0,8	4/3	
R322L	CaM-S.	10,4	2,1	3	n.d.	0,54	0,1	2/3	erhöhter $K_m(IP_3)$ verringerte spez. Aktivität
R322K	CaM-S.	5,82	1,9	2	n.d.	0,63	0,1	3/3	erhöhter $K_m(IP_3)$ verringerte spez. Aktivität
K327Q	CaM-S.	0,30	0,05	3	186,4	12,06	2,7	4/2	erhöhter $K_m(ATP)$ verringertes $K_m(IP_3)$
K328L	CaM-S.	0,47	0,13	4	124,0	14,88	2,2	4/3	
W404Q	CaM-S.	0,44	0,02	3	n.d.	21,3	1,7	3/3	
D407S	P11	-	-	-	-	0,00	-	-	inaktiv

Tabelle 3.4: Übersicht über alle untersuchten GIK(156-452)-Mutanten. Angegeben wird jeweils der jeweilige Aminosäureaustausch, der Grad der Aufreinigung (P11: Reinigung erfolgte über P11-Phosphocellulose, CaM-S.: Reinigung erfolgte über P11-Phosphocellulose mit nachfolgender Affinitätsreinigung über Calmodulin–Sepharose), der aus  $n$  unabhängigen Messungen berechnete apparente  $K_m$  – Wert für  $Ins(1,4,5)P_3$  (Standardabweichung  $\sigma$ ), der apparente  $K_m$  – Wert für ATP sowie die spezifische Aktivität der jeweiligen Mutante ( $f$ : Fehler dieses berechneten Wertes gemäß Fehlerfortpflanzungsgesetz; als Fehler des maximalen Umsatzes bzw. der Proteinkonzentration der eingesetzten Enzymlösung wurden jeweils die aus  $n_v$  (Umsatzgeschwindigkeit) bzw.  $n_c$  (Proteinkonzentration) unabhängigen Messungen bestimmten Standardabweichungen der jeweiligen Meßgrößen eingesetzt).

MASGSPGLQE FRNRRENHGG *KKKAWHTIKT* *MVNLPVISPF* *KKRYSWVQLA* GHTGSFKAAD 194

SGKILKRFSE NEKECFERLM KDPLRSCVPC FHGVVERDGE TYIQLDDLLT *DFEGPCVMDC* 254

*KMGIRTYLEE* *ELTKAREKPK* *LRKDMYKKMI* *EVDPLAPTAE* *ENAQHAVTKP* *RYMQWRETIS* 314

SSANLGFRIE GIKKADGTCN TNFKTTKTQE QVLQVFVEFI EGNTTILKKY LKRLQEIHII 374

LESSDFFKRH EVVGSSLLFV HDGSGNANVW *LIDFGKTTL*L PDGQTLDHRI PWQEGNREDG 434

YLLGLDNLIR ILESITER

Abbildung 3.51: Primärstruktur des N-terminal trunkierten GgIP3K-A-Fragmentes GIK(156-452); kursiv: CaM-Bindungsdomäne; unterstrichen: in Anwesenheit von  $Ins(1,4,5)P_3$  vor tryptischem Verdau geschützter Bereich [Bertsch et al., 2000]; rot, fettgedruckt: im Rahmen der vorliegenden Arbeit mutierte Aminosäurereste; Nummerierung der Reste gemäß ihrer Position in der GgIP3K-A-Volllänge.

### 3.5.2 Enzymkinetische Charakterisierung von Strep-GIK(184-452)-wt und - Mutanten zur weiteren Untersuchung des Effektes ausgewählter Mutationen auf die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> - Bindung

Für die im Abschnitt 3.7 beschriebenen Saturation Transfer Difference NMR – Untersuchungen und erste Experimente zur Kristallisation der GgIP3K-A wurde statt des die Calmodulin-Bindungsdomäne und die katalytische Domäne umfassenden Fragmentes GIK(156-452) das rekombinante Protein Strep-GIK(184 – 452) verwendet. Dieses Protein besitzt keine Calmodulin-Bindungsdomäne (eine affinitätschromatographische Aufreinigung ist über das an den N-Terminus der katalytischen Domäne fusionierte StrepTagII möglich) und weist gegenüber dem Fragment GIK(156-452) eine deutlich stärkere Expression in *E.coli* und verbesserte Löslichkeitseigenschaften auf.

Um einen direkten Vergleich von enzymatischen Daten mit den Ergebnissen der STD-NMR-Untersuchungen zu ermöglichen, wurden die maximale Umsatzgeschwindigkeit sowie der apparente  $K_m$  – Wert für Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> für das wt-Strep-GIK(184-452) und die Mutanten Strep-GIK(184-452)-R276L, - K303Q und - R322L mithilfe des enzymatisch-optischen Testes bestimmt. Des weiteren wurde die kompetitive Inhibition der von diesen Enzymen katalysierten Reaktion durch nicht von der IP3K umsetzbare Inositolphosphate untersucht.

#### **Bestimmung des apparenten $K_m$ -Wertes für Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> und der maximalen Umsatzgeschwindigkeit**

Die apparenten  $K_m$ -Werte für Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> und die maximalen Umsatzgeschwindigkeiten für das Fragment Strep-GIK(184-452) sowie für die Mutanten R276L, K303Q und R322L wurden durch Messung der Umsatzgeschwindigkeit bei verschiedenen Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> – Konzentrationen (1,25  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 18,75  $\mu$ M, 25  $\mu$ M) bei konstanter ATP-Konzentration (0,5 mM) und anschließende Auftragung der Konzentrations/Geschwindigkeits-Wertepaare nach Lineweaver-Burke bestimmt. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 3.5 zusammengefaßt.

Fusionsprotein	WT	R276L	K303Q	R322L
$K_m$ in $\mu$ M	3,9	30,4	106	22,6
$v_{max}$ in U/mg	14,9	12,5	5,7	0,26
$k_{kat}$ in s <sup>-1</sup>	7,9	6,7	3,0	0,14
$k_{kat}/K_m$ in mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	2038	219	29	6,1

Tabelle 3.5: Enzymkinetische Parameter von Strep-GIK(184-452)-wt, - R276L, - K303Q und - R322L

Die Ergebnisse entsprechen qualitativ den bei der Untersuchung des Konstruktes GIK(156-452) erhaltenen Daten. Auch hier zeigen die drei Mutanten R276L, K303Q und R322L einen signifikant gegenüber dem Wert für das wt-Enzym erhöhten apparenten  $K_m$  – Wert für  $IP_3$ ; für die Mutanten K303Q und R322L wird zusätzlich eine stark verringerte maximale Umsatzgeschwindigkeit festgestellt. Die erhaltenen apparenten  $K_m$ -Werte für  $IP_3$  sind jedoch sowohl für das wt-Enzym als auch für die Mutanten deutlich höher als die entsprechenden, für das jeweilige GIK(156-452)-Fragment erhaltenen Werte; Analoges wurde auch für das um die Calmodulin-Bindungsdomäne verkürzte, auf dem Vektor pSK-B codierte HsIP3K-B-Fragment beobachtet (P. Hartjen, persönliche Mitteilung).

Für alle in Tabelle 3.5 aufgeführten Fusionsproteine wurde eine MDD-HPLC-basierte Produktanalytik [Mayr, 1990] für den Umsatz von  $Ins(1,4,5)P_3$  durchgeführt. Das einzige entstehende Produkt war für alle vier Enzyme das  $Ins(1,3,4,5)P_4$  (Ergebnisse nicht dargestellt).

**Bestimmung der Inhibitionskonstante  $K_i$  für die kompetitive Hemmung der von Strep-GIK(184-452) - wt und - Mutanten katalysierten  $Ins(1,4,5)P_3$  3-Kinasereaktion durch D-myo- $Ins(1,3,4,5)P_4$ , scyllo- $Ins(1,2,3,5)P_4$  und D-myo- $Ins(1,4,6)P_3$**

Die Untersuchung der Inhibition der  $Ins(1,4,5)P_3$  3-Kinasereaktion durch die genannten Inositolphosphate, welche bereits von [Hillemeier, 2001] als potente kompetitive Inhibitoren der  $Ins(1,4,5)P_3$  3-Kinasereaktion charakterisiert wurden, wurde wie in Abschnitt 2.2.4.1.3 beschrieben durchgeführt. Abbildung 3.52 zeigt exemplarisch die Lineweaver-Burke-Auftragung von in Gegenwart von vier verschiedenen D-myo- $Ins(1,3,4,5)P_4$  - Konzentrationen durchgeführten single-transient-Messungen. Die Darstellung demonstriert deutlich den kompetitiven Typ der durch  $Ins(1,3,4,5)P_4$  vermittelten Inhibition, da eine Vergrößerung der Inhibitorkonzentration zu einer Erhöhung des apparenten  $K_m$  – Wertes für  $Ins(1,4,5)P_3$  führt; die maximale Umsatzgeschwindigkeit bleibt jedoch konstant.

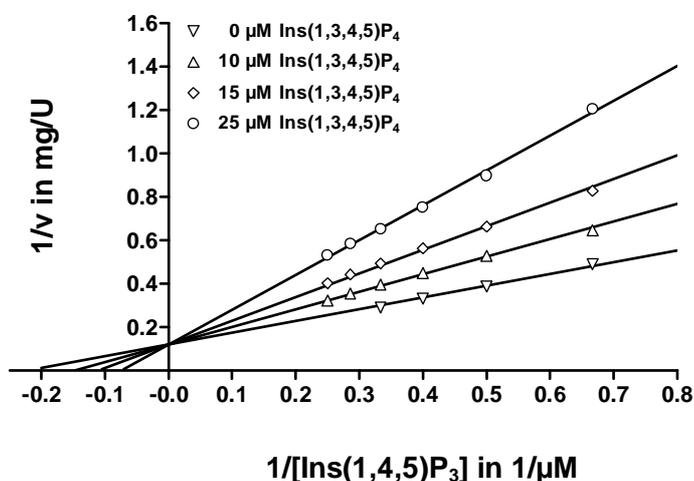


Abbildung 3.52: Kompetitive Inhibition von Strep-GIK(184-452) durch D-myo- $Ins(1,3,4,5)P_4$ : Lineweaver-Burke-Plot

Die Bestimmung der Inhibitionskonstante  $K_i$  für das als Inhibitor eingesetzte Inositolphosphat wurde sodann durch Auftragung des aus den Lineweaver-Burke-Diagrammen bestimmbaren apparenten  $K_m$  – Werts für Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> oder alternativ der Steigung der Regressionsgeraden in diesem Diagramm gegen die jeweilige Inhibitorkonzentration und anschließende lineare Regression vorgenommen. Die Abbildung 3.53 gibt diese Auswertung exemplarisch für die Inhibition des wt-Strep-GIK(184-452) durch D-myo-Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> wieder.

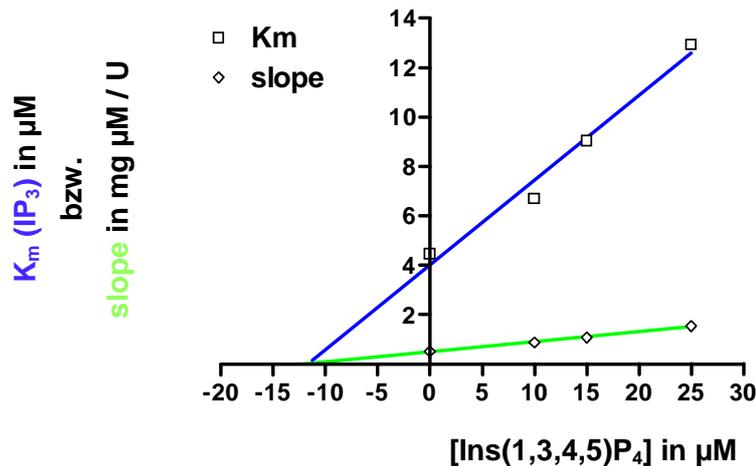


Abbildung 3.53: Kompetitive Inhibition von Strep-GIK(184-452) durch D-myo-Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>: Bestimmung der Inhibitionskonstante  $K_i$ . Der hier ablesbare  $K_i$ -Wert beträgt 11,7 µM.

In Tabelle 3.6 sind die für Proteine Strep-GIK(184-452) - wt, - R276L und - R322L erhaltenen Resultate zusammengefasst; diese Enzyme wurden auch mittels STD-NMR näher untersucht. Die Strukturen der Inositolphosphate D-myo-Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>, scyllo-Ins(1,2,3,5)P<sub>4</sub> und D-myo-Ins(1,4,6)P<sub>3</sub> können im Abschnitt 4 (Abbildung 4.24) eingesehen werden.

	WT	R276L	R322L
D-myo-Ins(1,3,4,5)P <sub>4</sub>	11,7	86,7	11,5
scyllo-Ins(1,2,3,5)P <sub>4</sub>	15,5	18,8	45,0
D-myo-Ins(1,4,6)P <sub>3</sub>	16,2	57,3	n.d.

Tabelle 3.6:  $K_i$  – Werte in µM für die Inhibition von Strep-GIK(184-452) - wt, - R276L, - K303Q und - R322L durch D-myo-Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>, scyllo-Ins(1,2,3,5)P<sub>4</sub> und D-myo-Ins(1,4,6)P<sub>3</sub>; n.d.: Wert wurde bisher nicht bestimmt

### 3.5.3 Enzymkinetische Charakterisierung von HsIP3K-B(631-946) - wt sowie der Mutante S764D zur Identifikation einer potentiellen PKC-Phosphorylierungsstelle

Wie 1999 von Communi et al. gezeigt wurde, kann die Isoform B der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase *in vivo* sowohl durch die Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) als auch durch die Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert werden; eine Proteinkinase A-medierte Phosphorylierung des Enzyms wurde hingegen in den in der oben genannten Arbeit verwendeten Zellsystemen (corticale Astrocyten der Ratte, 1321N1-Zellen) nicht beobachtet. Untersuchungen der Stöchiometrie der genannten möglichen Phosphorylierungen im Rahmen von *in vitro* Phosphorylierungsassays demonstrierten die Existenz eines durch CaMKII phosphorylierbaren Restes, durch PKC wurden zwei weitere Reste phosphoryliert; die Position dieser Reste auf der Primärstruktur der Isoform B der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase wurde jedoch bisher nicht aufgeklärt [Communi et al., 1999].

Im Fall der Isoform A der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase (und höchstwahrscheinlich auch bei der Isoform B, [Communi et al., 1999]) erfolgt die CaMKII – medierte Regulation durch die Phosphorylierung eines über alle bekannten Isoformen bei Ratte, Mensch und Huhn konservierten Threoninrestes im Bereich der katalytische Domäne. Eine Phosphorylierung dieser Aminosäure beeinflusst sowohl die basale spezifische Aktivität als auch die Interaktion des Enzyms mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-Komplex [Communi et al., 1997]. Im Abschnitt 3.5.1.2 dieser Arbeit wurde gezeigt, dass durch Austausch des betreffenden Threoninrestes in der Sequenz der GgIP3K-A durch einen bei physiologischem pH negativ geladenen Aspartatrest ein rekombinantes Protein mit dem phosphorylierten Enzym ähnlichen enzymatischen Eigenschaften generiert werden konnte. Um erste Hinweise zu erhalten, ob und in welcher Weise PKC-katalysierte Phosphorylierungen im Bereich der katalytischen Domäne der Isoform B die enzymatischen Eigenschaften des Enzyms regulieren, wurde eine auf einem katalytisch aktiven Fragment der HsIP3K-B (AS 631 – 946) basierende Mutante (S764D) generiert und enzymkinetisch charakterisiert; der Serinrest S764 (Nummerierung gemäß der Zählung der Aminosäuren in der Volllänge der HsIP3K-B) wurde für die Mutagenese ausgewählt, da er Bestandteil einer primärstrukturell im Zentrum der katalytischen Domäne lokalisierten, B-Isoform spezifischen PKC/PKA/PKG-Consensus-site ist (siehe Abbildung 3.54); eine Phosphorylierung dieses Aminosäurerestes könnte somit einen Mechanismus zur differentiellen Regulation der verschiedenen  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinase Isoformen darstellen.

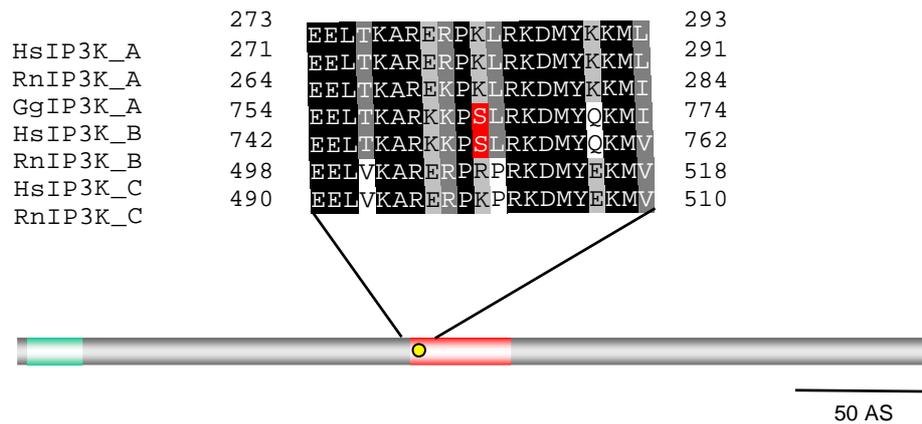


Abbildung 3.54: Partielles Alignment der *mammalia* Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase-Isoformen und der GgIP3K-A im Bereich der putativen PKC-Phosphorylierungsstelle der Isoform B. Die putative PKC-Phosphorylierungsstelle HsIP3K-B-S764 ist durch rote Unterlegung hervorgehoben. Die Lokalisation des in das Alignment aufgenommenen Sequenzbereiches der GgIP3K-A auf der Primärstruktur des auf dem Vektor pET-17b-GIK codierten rekombinanten Proteins ist anhand der im Abschnitt 3.5.1 eingeführten schematischen Darstellung dieses Proteins dargestellt; die Lage des in der GgIP3K-A anstelle des Serinrestes auftretenden Lysinrestes (K274) nahe der N-terminalen Begrenzung des gemäß [Bertsch et al., 2000] durch die Anwesenheit von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> vor proteolytischer Degradation geschützten Bereiches ist durch einen gelben Punkt markiert.

Zunächst wurde für das wt-Enzym wie für die Mutante S764D der apparente  $K_m$  – Wert für Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> mittels der in Kapitel 2.2.4.1.2.3 dargelegten single-transient-Methode bestimmt; die Initialkonzentrationen der Substrate betragen 5  $\mu\text{M}$  für Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> und 0,5 mM für ATP. Hierbei ergab sich, wie in Tabelle 3.7 dargelegt ein gegenüber dem wt-Enzym moderat, jedoch signifikant erhöhter Wert für die Mutante S764D. Die spezifischen Aktivitäten der rekombinanten Proteine unter Substratsättigungsbedingungen (Initialkonzentrationen 25  $\mu\text{M}$  Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, 0,5 mM ATP) differierten hingegen nicht statistisch signifikant, ebenso die katalytischen Effizienzen  $k_{\text{kat}}/K_m$ . Alle Messungen deren Resultate in Tabelle 3.7 zusammengefasst wurden, erfolgten unter den Standardreaktionsbedingungen, insbesondere also in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  - Ionen.

Protein	WT	S764D
$K_m$ in $\mu\text{M}$	$0,38 \pm 0,03$	$0,67 \pm 0,03$
$v_{\text{max}}$ in U/mg	$0,41 \pm 0,10$	$0,55 \pm 0,11$
$k_{\text{kat}}$ in $\text{s}^{-1}$	$0,25 \pm 0,06$	$0,33 \pm 0,07$
$k_{\text{kat}}/K_m$ in $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$	$654 \pm 217$	$492 \pm 124$

Tabelle 3.7: Enzymatische Parameter für HsIP3K-B(631-946)-wt und – S764D. Angegeben wurden jeweils die Mittelwerte aus drei Einzelmessungen; die Fehler geben die jeweiligen Standardabweichungen bzw. die gemäß dem Fehlerfortpflanzungsgesetz berechneten Fehler an.

In weiteren Experimenten wurde die Aktivierbarkeit der wt-HsIP3K-B und der Mutante S764D durch den Calcium/Calmodulin-Komplex untersucht; die Resultate sind in der Abbildung 3.55 graphisch dargestellt.

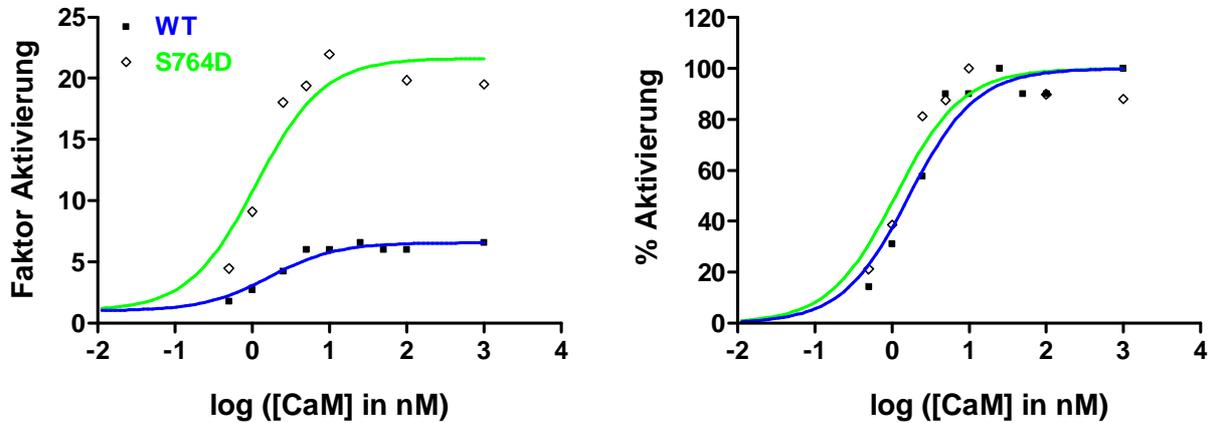


Abbildung 3.55: Aktivierbarkeit durch  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  der Enzyme HsIP3K-B(631-946)-wt und - S764D. Im linken Diagramm wurde der bei den verschiedenen Calmodulinkonzentrationen gemessene Aktivierungsfaktor (= spezifische Aktivität des Enzyms bei der gegebenen Calmodulinkonzentration/spezifische Aktivität des Enzyms in Abwesenheit von Calmodulin) dargestellt; der rechte Graph gibt dieselben Daten, aber prozentual auf die maximal für das entsprechende Protein erreichbare Aktivierung normiert, wieder. Die in Abwesenheit von Calmodulin bei der gewählten Calcium-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  gemessenen spezifischen Aktivitäten des wt-Enzyms sowie der Mutante S764D zeigten keine signifikanten Unterschiede zu den in Abwesenheit von Calciumionen bestimmten Werten.

Der Austausch des Serinrestes 764 durch einen Aspartatrest resultiert somit in einer durch den  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Komplex deutlich stärker aktivierbaren Ins(1,4,5) $\text{P}_3$  3-Kinase. Während die spezifische Aktivität des wt-Fragmentes durch die Interaktion mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  maximal um einen Faktor 7 gesteigert werden kann, erfährt die Mutante S764D ausgehend von einer mit dem wt-Enzym vergleichbaren Basalaktivität eine maximal 22,5fache Steigerung ihrer Umsatzgeschwindigkeit. Die CaM-Konzentration, bei der eine halbmaximale Enzymaktivierung erreicht wird, liegt jedoch, wie der rechte Graph in Abbildung 3.55 zeigt, für beide Proteine in der gleichen Größenordnung (2-3 nM).

Durch in Anwesenheit verschiedener Calmodulin-Konzentrationen durchgeführte single-transient-Messungen (Initialkonzentrationen der Substrate: 5  $\mu\text{M}$  Ins(1,4,5) $\text{P}_3$ , 0,5 mM ATP) wurde sowohl für das wt-Enzym als auch für die Mutante S764D die Veränderung des apparenten  $K_m$ -Wertes für Ins(1,4,5) $\text{P}_3$  mit steigender Konzentration von Calmodulin gemessen; eine graphische Darstellung der Resultate bietet Abbildung 3.56.

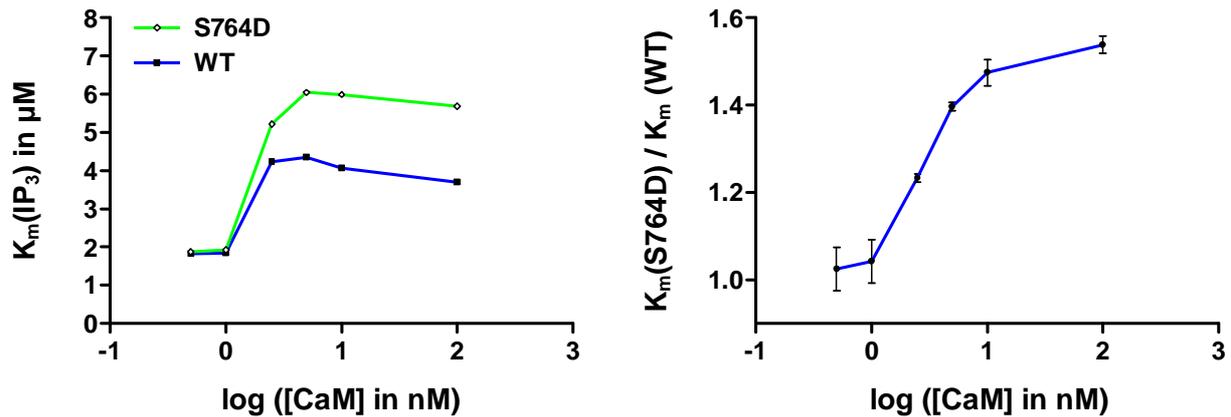


Abbildung 3.56: Abhängigkeit des apparenten  $K_m$  – Wertes für Ins(1,4,5) $P_3$  von der Calmodulin-Konzentration. Die Konzentration des freien Calciums im Ansatz wurde unter Verwendung des Programmes Maxchelator auf 10  $\mu\text{M}$  eingestellt. Die linke Graphik zeigt die für das wt-Enzym bzw. die Mutante S764D berechneten apparenten  $K_m$  – Werte für Ins(1,4,5) $P_3$  in  $\mu\text{M}$ ; das Diagramm auf der rechten Seite zeigt den für die jeweilige Calmodulin-Konzentration berechneten Quotienten  $K_m(\text{S764D}) / K_m(\text{wt})$ .

Wie aus dem linken Graph der Abbildung 3.56 hervorgeht, zeigen sowohl das wt-Enzym als auch das mutierte Protein HsIP3K-B-S764D insbesondere bei Calmodulinkonzentrationen um 10 nM einen signifikant über den in Abwesenheit von Calmodulin gemessenen Wert hinausgehenden apparenten  $K_m$  – Wert für Ins(1,4,5) $P_3$ ; der Anstieg der Konstante ist jedoch bei der Mutante S764D deutlich stärker. Während die bei einer festen Calcium-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  gemessenen apparenten  $K_m$  – Werte für Ins(1,4,5) $P_3$  in Abwesenheit von Calmodulin sowie bei Calmodulinkonzentrationen  $\leq 1\text{nM}$  nahezu identisch sind (im Gegensatz zu dem in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen erhaltenen Ergebnis, vgl. Tabelle 3.7), wurde bei einer Calmodulinkonzentration von 10 nM für die Mutante S764D ein um den Faktor 1,5 höherer Wert als für das wt-Enzym gemessen.

### 3.6 In-vitro-Phosphorylierung rekombinanter HsIP3K-B

Wie in Abschnitt 3.5.3 dargelegt, resultierte der Austausch des putativ durch Proteinkinase C phosphorylierbaren Serinrestes S764 der humanen IP3K-B gegen einen bei physiologischem pH negativ geladenen Aspartatrest in einer signifikanten Zunahme der durch Bindung von  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  induzierten Aktivitätssteigerung. Zunächst muß durch *in vitro* Phosphorylierungsassays überprüft werden, ob eine Phosphorylierung durch PKC an dieser Position in der Tat ein möglicher Regulationsmechanismus der HsIP3K-B sein könnte. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit erste Vorarbeiten (siehe Bemerkung im Methodenteil, Abschnitt 2.2.4.3) geleistet.

Die PKC-katalysierte Phosphorylierung affinitätsgereinigter, rekombinanter HsIP3K-B(631-946) - wt und - S764D wurde unter Verwendung von  $^{32}\text{P}$  – markiertem ATP durch Cerenkov-Zählung bzw. Autoradiographie quantifiziert; Abbildung 3.57 zeigt die zugehörigen Autoradiographien, Abbildung 3.58 die auf den Ergebnissen der Cerenkov-Zählung beruhenden Phosphat-Einbauraten in die beiden Proteine.

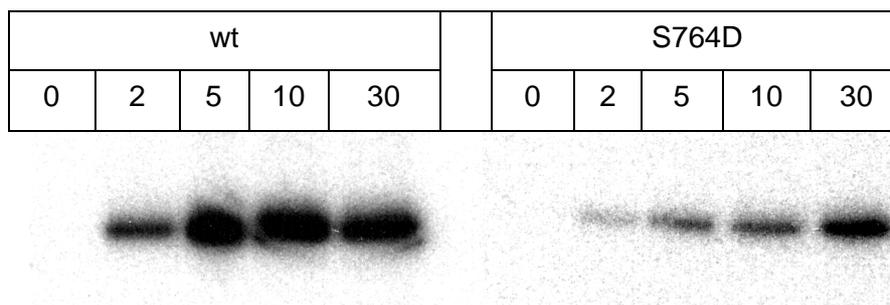


Abbildung 3.57: Autoradiographie zur *in vitro* Phosphorylierung von HsIP3K-B(641-946) – wt und – S764D. In jeder Lane wurden 500 ng rekombinante IP3K aufgetragen; die Phosphorylierungsreaktion wurde für beide Enzyme unter identischen Bedingungen durchgeführt und nach 2 min, 5 min, 10 min bzw. 30 min abgestoppt. Die getrockneten SDS-Polyacrylamidgele wurden auf einen Röntgenfilm aufgelegt (Exposition für 2 h).

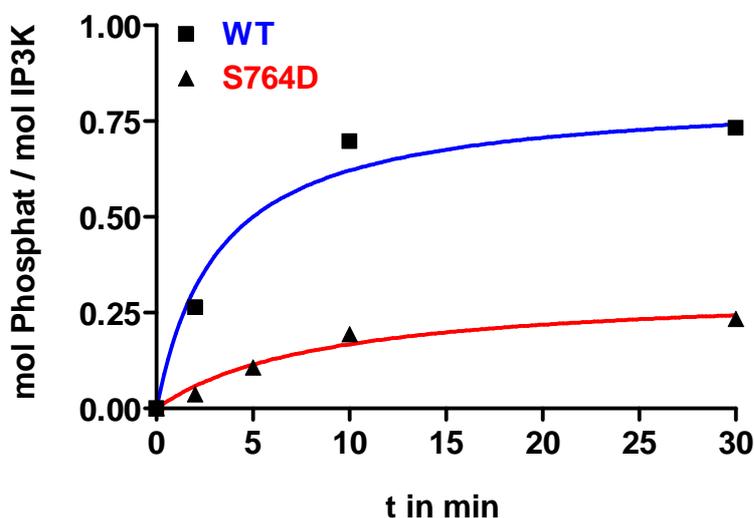


Abbildung 3.58: Erste Experimente zur Bestimmung der Stöchiometrie des PKC-katalysierten Phosphateinbaus in HsIP3K-B(631-946) - wt und - S764D. Die Daten wurden mit dem Programm GraphPad Prism hyperbolisch gefittet.

Durch hyperbolisches Fitting der Datensätze wurden die maximalen Einbauraten bestimmt. Diese betrug für das WT-Enzym 0,8 mol Phosphat / mol IP3K; für die Mutante S764D 0,3 mol Phosphat / mol IP3K. Halbmaximaler Einbau wurde unter für beide Proteine identischen Versuchsbedingungen nach 3,2 min (WT) bzw. 8,7 min (S764D) erreicht. Es wurde somit in das an der putativen PKC-Phosphorylierungsstelle mutierte Enzym signifikant weniger Phosphat mit einer deutlich langsameren Kinetik eingebaut.

Diese Resultate geben in der Tat erste Hinweise für eine Phosphorylierung des wt-Enzyms an der Position S764. Weitere, auf den hier gezeigten vorläufigen Aussagen aufbauende Experimente werden derzeit im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt (P. Hartjen, Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Abteilung für Zelluläre Signaltransduktion, UKE Hamburg). Unter optimierten Versuchsbedingungen konnte so mittlerweile gezeigt werden, dass das Fragment HsIP3K-B(631-946) *in vitro* zwei PKC-Phosphorylierungsstellen besitzt, darunter die Position S764.

### 3.7 STD-NMR-Untersuchungen an GgIP3K – wt und – Mutanten

Im Rahmen der enzymkinetischen Untersuchungen von GgIP3K-A-Punktmutanten wurden insbesondere die Aminosäurereste R276 und R322 als mögliche wichtige Determinanten für eine hochaffine Bindung des Substrates  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  identifiziert. Alle untersuchten Mutationen dieser Aminosäuren (R276L, R276K, R322L, R322K) resultierten in einer signifikanten Erhöhung des apparenten  $K_m$ -Wertes für  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ; ein Austausch des Restes R322 gegen Leucin oder Lysin bedingte zusätzlich eine drastische Abnahme der die maximale Umsatzgeschwindigkeit der jeweiligen Enzyme beschreibenden Wechselzahl  $k_{\text{kat}}$ . Desweiteren wird die vom wt-Enzym bzw. den betrachteten Mutanten R276L und R322L katalysierte  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinasereaktion durch von der GgIP3K-A nicht metabolisierbare Inositolphosphate unterschiedlich stark kompetitiv inhibiert.

Alle diese Resultate weisen auf durch die Mutationen induzierte Veränderungen der Substraterkennung und – bindung sowie der für die Katalyse essentiellen korrekten Positionierung des  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  im aktiven Zentrum der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinase hin. Unter Verwendung der im Abschnitt 2.2.4.4 in ihren Grundzügen beschriebenen Saturation Transfer Difference NMR (STD-NMR) – Methodik wurde versucht, die Auswirkungen dieser Veränderungen von der Seite des mit dem mutierten Protein interagierenden Liganden zu charakterisieren. Die erhaltenen Ergebnisse demonstrieren erstmalig die Anwendbarkeit des STD-NMR-Verfahrens bei der Charakterisierung der Auswirkung von Punktmutationen auf die Substratbindungseigenschaften hochaffiner metabolischer Enzyme.

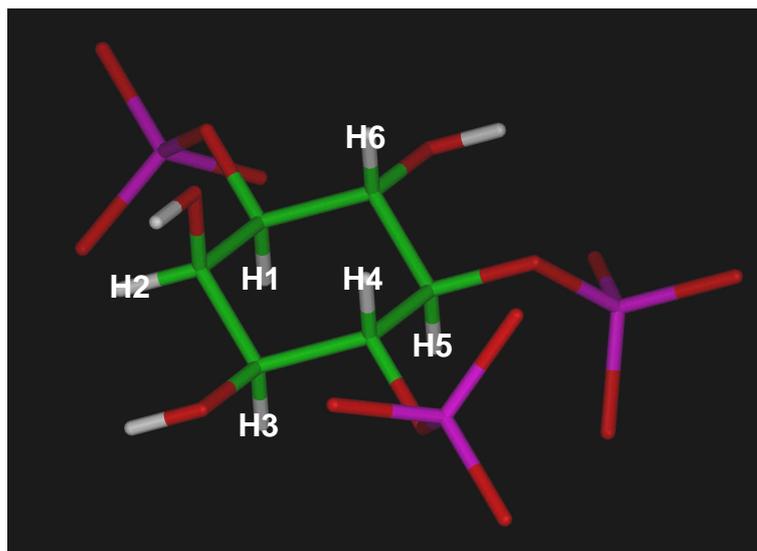


Abbildung 3.59: Molekülmodell des D-myo- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ; die im nachfolgenden Abschnitt H1 – H6 genannten Protonen des Inositolrings wurden mit der jeweiligen Bezeichnung versehen.

### Die Interaktion von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ mit der wt-GgIP3K-A

Zur Charakterisierung der Bindung des Substrates  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  an das wt-Enzym wurden zunächst sowohl STD-Titrationsexperimente (Variation der Ligandenkonzentration bei gleichbleibender Sättigungszeit) sowie STD-Sättigungszeitexperimente (Variation der Sättigungszeit bei konstanter Ligandenkonzentration) mit diesem System durchgeführt. Hierzu wurden 2 mg des StrepTagII-GgIP3K-A-Fusionsproteins (apparentes Molekulargewicht 32 kDa) in 500  $\mu\text{l}$  50 mM Tris-d11, pH 7,5 aufgenommen; die Endkonzentration an Protein betrug somit 122  $\mu\text{M}$ . Die Experimente wurden dann wie in 2.2.4.4 dargelegt durchgeführt; wobei für die zgsl-Referenzspektren jeweils 32 Scans, für die stdslsp-Spektren 512 (effektiv wegen des Differenzmodus also 256) Scans aufsummiert wurden.

Abbildung 3.60 zeigt die Gegenüberstellung eines STD-Spektrums (B) und dem zur selben Ligandenkonzentration (1,67 mM  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ) aufgenommenen Referenzspektrum (A).

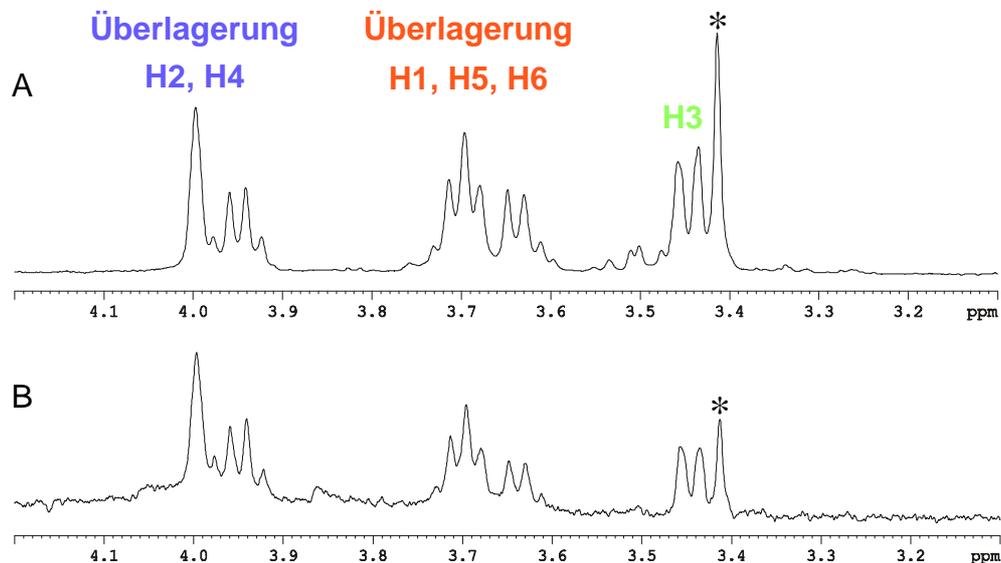


Abbildung 3.60: Strep-GIK(184-452)-wt

A: bei einer Proteinkonzentration von 122  $\mu\text{M}$  und einer  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Konzentration von 1,67 mM aufgenommenes Referenzspektrum (Pulsprogramm: zgsl)

B: unter den selben Bedingungen aufgezeichnetes STD-Spektrum (Pulsprogramm stdslsp,  $t_{\text{sat}} = 2$  s)

Die in Abbildung 3.60 angegebene Zuordnung der Signale zu den Protonen des Inositolrings erfolgte durch Vergleich der erhaltenen Spektren mit veröffentlichten 1D  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  [Scholz et al., 1990; siehe auch Anhang Abschnitt 7.2]; eine Verifizierung der Zuordnung wurde zudem durch die Aufnahme eines 2D  $^1\text{H} - ^{31}\text{P}$  – COSY – Spektrums der verwendeten  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  - Charge (in Abwesenheit von IP3K) vorgenommen. Bei dem mit einem \* gekennzeichneten Peak handelt es sich um ein von protoniertem Tris herrührendes Signal.

## 3.7 Ergebnisse

Die chemischen Verschiebungen der Protonen H1 – H6 des Inositolrings liegen alle in einem sehr schmalen Bereich (Breite < 1 ppm) gruppiert. Daher ist bereits die Aufnahme von gut aufgelösten, „klassischen“ 1D -  $^1\text{H}$  – Spektren nur durch eine aufwendige Vorbehandlung des zu untersuchenden Inositolphosphats zu erreichen [Befreiung von paramagnetischen Schwermetallen; Scholz et al., 1990]. Da die Gegenwart eines den zu untersuchenden niedermolekularen Liganden bindenden Proteins ohnehin zu einer deutlichen Linienverbreiterung der Ligandresonanzen führt [Mayer, 2001], wurde auf eine solche Vorbehandlung in den hier vorgestellten Experimenten zunächst verzichtet; weitere Experimente müssen zeigen, inwieweit auch bei den STD-Spektren eine Vorbehandlung des Inositolphosphats zur Verbesserung der Auflösung beitragen kann.

Abbildung 3.61 zeigt die Ergebnisse eines Sättigungszeitexperimentes. Dargestellt sind vier STD-Spektren welche bei einer konstanten Ligandenkonzentration von 1,67 mM mit verschiedener Sättigungszeit  $t_{\text{sat}}$  unter ansonsten identischen Bedingungen aufgenommen wurden.

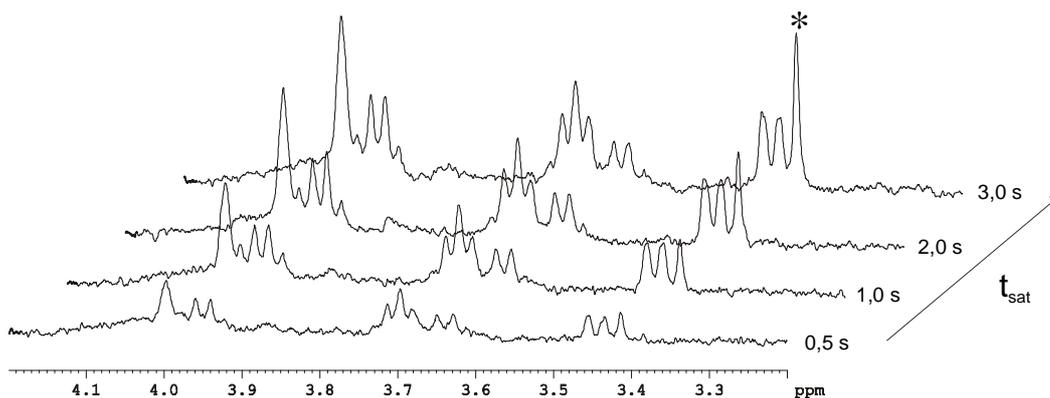


Abbildung 3.61: Bei einer Proteinkonzentration von 122  $\mu\text{M}$  und einer  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Konzentration von 1,67 mM aufgenommene STD-Spektren (Darstellung als stacked plot). Die Sättigungszeit  $t_{\text{sat}}$  betrug 0,5 sec, 1 sec, 2 sec bzw. 3 sec.

Zur Quantifizierung der STD-Effekte wurden die drei erkennbaren Peakgruppen ([H2, H4], [H1, H5, H6] und [H3]) nach gleicher Prozessierung der erhaltenen Spektren mit im jeweils zugehörigen zgsl-Referenzspektrum definierten Integralgrenzen mithilfe der Integralfunktion des Programms XWINNMR integriert; die Einzelbeiträge der Protonen H2 und H4 wurden zusätzlich manuell unter Verwendung des XWINNMR-Dual-Display-Modus untersucht und stellten sich (beim wt-Enzym) als nahezu identisch heraus. Die nachstehende Abbildung 3.62 zeigt eine Zusammenfassung der so erhaltenen Ergebnisse für das in Abbildung 3.61 gezeigte STD-Sättigungszeitexperiment sowie eines Titrationsexperimentes, bei welchem bei konstanter Sättigungszeit die Konzentration von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  zwischen 0,4 mM und 1,67 mM variiert wurde.

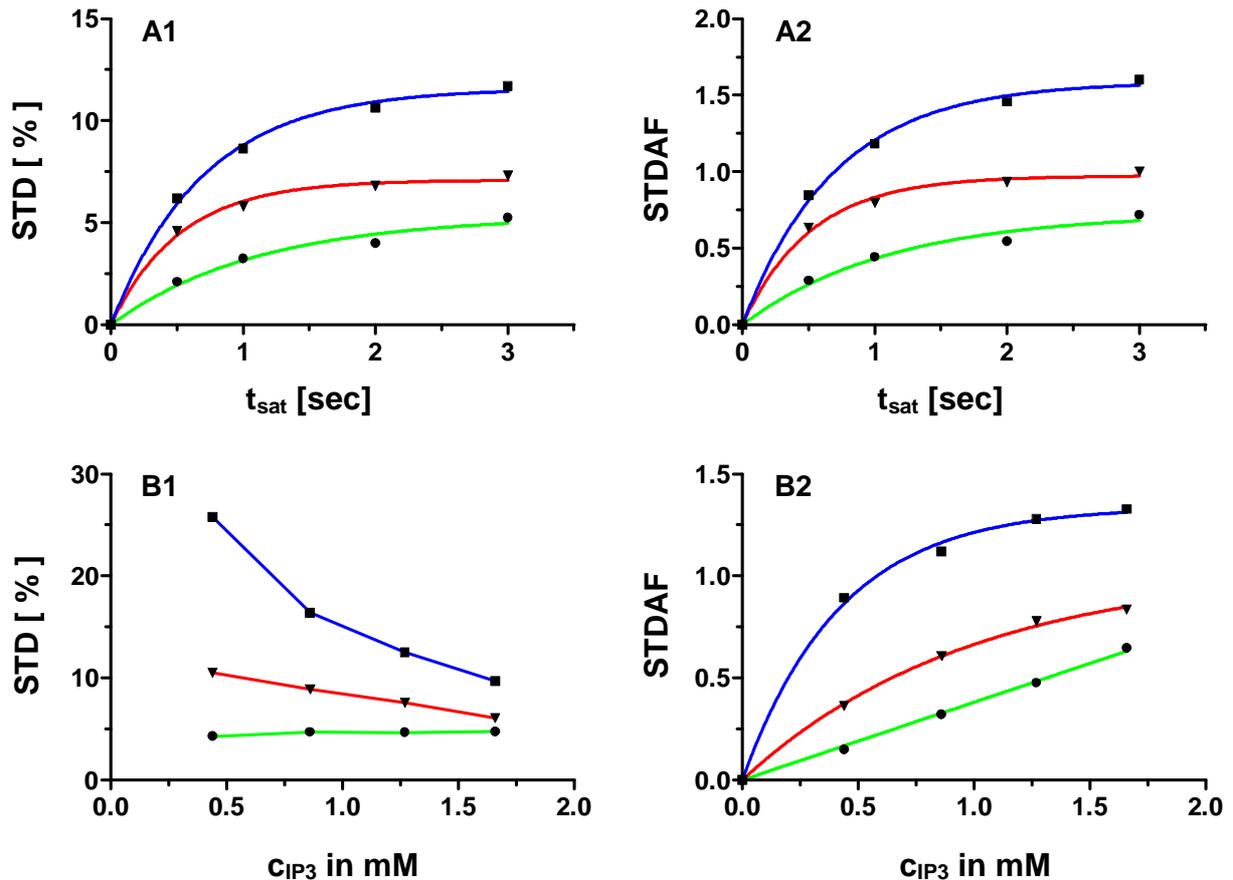


Abbildung 3.62: Interaktion von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> mit wt-GgIP3K-A: Ergebnisse eines Sättigungszeitexperimentes sowie eines Titrationsexperimentes. Angegeben wurde jeweils der prozentuale STD-Effekt (STD[%]) sowie der STD-Amplifikationsfaktor (STDAF) für die Protonengruppen (H2, H4: blau, Quadrate), (H1, H5, H6: rot, Dreiecke) und H3 (grün, Kreise).

Aufgetragen wurde gegen den jeweils variierten Parameter (Sättigungszeit  $t_{\text{sat}}$  bzw. Ligandenkonzentration  $c_{\text{IP}_3}$ ) sowohl der prozentuale STD-Effekt STD [%] (linke Spalte) als auch der STD-Amplifikationsfaktor STDAF (rechte Spalte).

Die Abhängigkeit des STD-Amplifikationsfaktors STDAF von der Sättigungszeit  $t_{\text{sat}}$  lässt sich gut durch eine exponentielle Funktion erster Ordnung beschreiben [Mayer, 2001]:

$$STDAF(t) = STDAF_{\text{max}} (1 - e^{-k_{\text{sat}} t}) \quad \text{Gleichung 3.1}$$

Hierbei gibt die als Sättigungsrate bezeichnete Größe  $k_{\text{sat}}$  die Geschwindigkeit an, mit der sich bei einer gegebenen Ligandenkonzentration das Gleichgewicht zwischen der Aufnahme von Sättigung im gebundenen Zustand und dem relaxationsbedingten Verlust der Sättigung im freien Zustand einstellt. Bei großen Werten von  $k_{\text{sat}}$  wird dieses Gleichgewicht bereits bei kurzen Sättigungszeiten erreicht; halbmaximale Sättigung wird dann bereits bei kleinen Werten von  $t_{\text{sat}}$  erreicht, da gilt:

$$STDAF(t_{0.5}) = \frac{STDAF_{\text{max}}}{2} \quad \text{für} \quad t_{0.5} = \frac{\ln 2}{k_{\text{sat}}} \quad \text{Gleichung 3.2}$$

Für die drei Protonengruppen (H2, H4), (H1, H5, H6) und H3 ergaben sich bei einem derartigen Fitting der Datenpunkte in Abb. 3.62 (Graph A2) mit Hilfe des Programms GraphPad Prism folgende Werte der Parameter  $STDAF_{\max}$ ,  $k_{\text{sat}}$  und  $t_{0.5}$ :

Parameter	(H2, H4)	(H1, H5, H6)	H3
$STDAF_{\max}$	1,59	0,97	0,73
$k_{\text{sat}}$ in $\text{sec}^{-1}$	1,43	1,94	0,90
$T_{0.5}$ in sec	0,48	0,36	0,77

Tabelle 3.8: Parameter des exponentiellen Fits der Abhängigkeit des STD-Amplifikationsfaktors  $STDAF$  von der Sättigungszeit  $t_{\text{sat}}$  der voneinander diskriminierbaren Protonengruppen im  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – STD-Spektrum des Systems wt-GgIP3K-A /  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ .

Wie aus Tabelle 3.8 und Abbildung 3.62 (A2) ersichtlich, besitzt das Signal der Protonengruppe (H1, H5, H6) die höchste Sättigungsrate ( $1,94 \text{ sec}^{-1}$ , was einer Sättigungszeit für halbmaximale Sättigung von  $0,36 \text{ sec}$  entspricht). Der höchste maximale STD-Amplifikationsfaktor  $STDAF_{\max}$  wird hingegen von den Protonen H2 und H4 ( $STDAF_{\max} = 1,59$ ) erreicht, wenn auch mit langsamerem zeitlichem Aufbau ( $t_{0.5} = 0,48 \text{ sec}$ ). Das einzelne Proton H3 erreicht nur langsam ( $t_{0.5} = 0,77 \text{ sec}$ ) einen im Vergleich zu den anderen Protonengruppen niedrigeren maximalen STD-Amplifikationsfaktor von  $0,73$ .

Die Resultate des dargestellten STD-Titrationsexperimentes (Abb. 3.62, Graph B2) korrelieren mit diesen Beobachtungen: für das (H2, H4)-Signal, gefolgt von dem Signal der Protonen (H1, H5 und H6), wurde der größte STD-Amplifikationsfaktor festgestellt. Das Proton H3 zeigt auch in diesem Experiment nur geringe Werte des STD-Amplifikationsfaktors.

Im Abschnitt 4.4 werden die hier dargelegten Resultate in Beziehung zu den von Mayer beschriebenen, am Beispiel von Lektin / Monosaccharid bzw. Lektin / Oligosaccharid - Systemen gewonnenen Ergebnissen [Mayer, 2001] gesetzt und diskutiert.

**Die STD-NMR-spektroskopische Quantifizierung der Interaktion von Inositol 1,4,5-trisphosphat mit den GgIP3K-A-Mutanten R276L und R322L zeigt charakteristische Veränderungen gegenüber dem wt-Enzym auf**

Wie oben bereits beschrieben, zeigen die hier untersuchten GgIP3K-A-Mutanten eine signifikante Erhöhung des apparenten  $K_m$ -Wertes für Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>. Während jedoch die Mutation R276L die maximale Umsatzgeschwindigkeit des Enzyms nicht wesentlich beeinflusst, wurde für die Mutante R322L zusätzlich zu der verringerten Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> – Affinität eine signifikante Verringerung der spezifischen Aktivität festgestellt (siehe Tabelle 3.5 im Abschnitt 3.5.2). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob durch NMR-spektroskopische Experimente Aussagen über die bei den verschiedenen Mutanten vorliegenden Veränderungen des aktiven Zentrums abgeleitet werden können.

Hierzu wurden, wie oben für das wt-Enzym beschrieben, die prozentualen STD-Effekte bzw. die STD-Amplifikationsfaktoren bei verschiedenen Ligandkonzentrationen und Sättigungszeiten bestimmt. Die Messungen für die Mutante R276L wurden dabei mit einer Proteinmenge von 847 µg durchgeführt; dies entspricht bei einem Volumen von 500 µl einer Konzentration von 53 µM. Die Anzahl der Scans betrug 64 für die zgsl-Referenzspektren und 128 (effektiv also 64) für die zgsl-Spektren. Für die Messungen an der Mutante R322L wurden 640 µg (40 µM) rekombinantes, affinitätsgereinigtes Protein eingesetzt. Um ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis zu erreichen, wurden für die zgsl-Referenzspektren 128 Scans aufsummiert, für die STD-Spektren wurde der die Anzahl von Scans bestimmende Parameter ns auf 1k (=1024 scans) eingestellt, was aufgrund des Differenzmodus effektiv einer Aufsummierung von 512 Scans entspricht. Die nachstehenden Abbildungen zeigen diese Untersuchungen repräsentierende Spektren; die Abweichungen zwischen den aus den Abb. 3.64 und 3.60 für die verschiedenen Protonen bestimmbar chemischen Verschiebungen sind auf geringfügige Abweichungen der jeweils verwendeten Tris-d11-Pufferlösungen zurückzuführen.

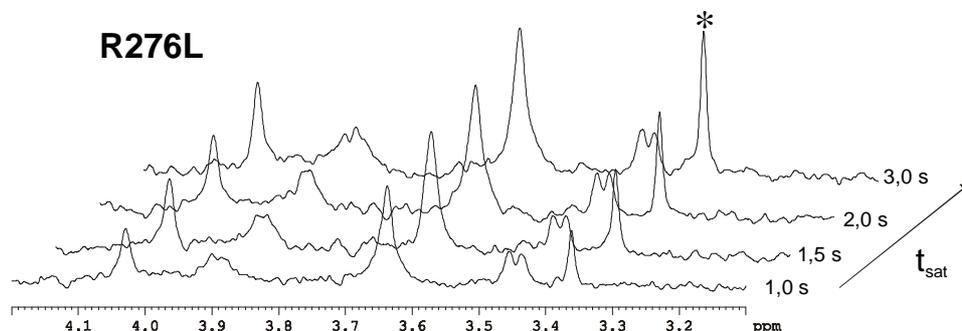


Abbildung 3.63: Strep-GIK(184-452)-R276L; STD-NMR-Spektren mit variiert Sättigungszeit  $t_{\text{sat}}$ . Dargestellt sind bei einer Proteinkonzentration von 53 µM und einer Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> – Konzentration von 1,5 mM aufgenommene STD-Spektren (stacked plot). Die Sättigungszeit  $t_{\text{sat}}$  betrug 1 sec, 1,5 sec, 2 sec und 3 sec. Aufgrund der niedrigen Anzahl aufsummierter Scans (effektiv 64) sind die Spektren stark verrauscht. Der auf die Gegenwart von protoniertem Tris zurückzuführende Peak wurde mit einem Stern gekennzeichnet.

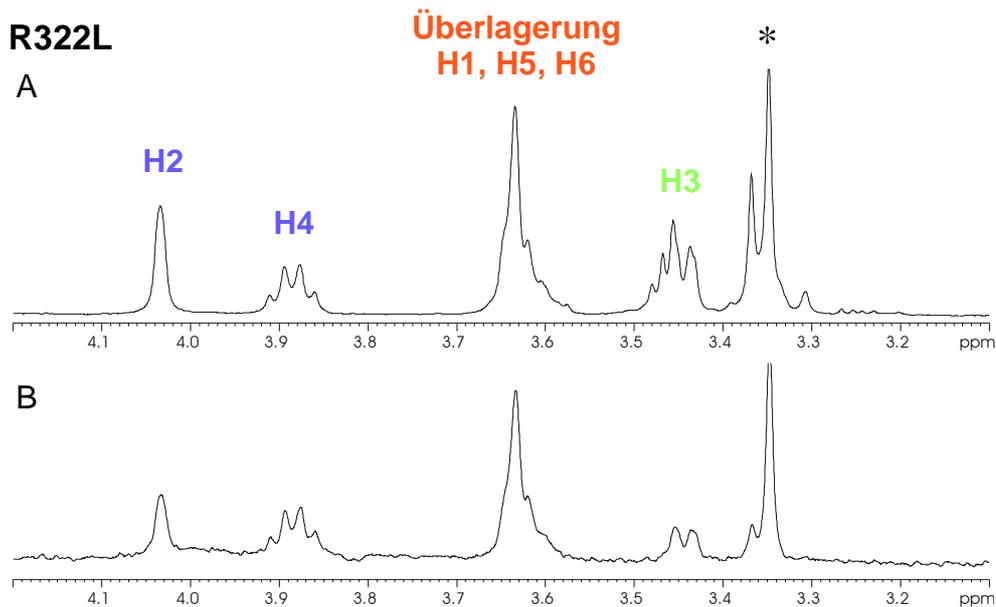


Abbildung 3.64: Strep-GIK(184-452)-R322L

A: bei einer Proteinkonzentration von 40  $\mu\text{M}$  und einer  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Konzentration von 1,6 mM aufgenommenes Referenzspektrum (Pulsprogramm: zgsl)

B: unter den selben Bedingungen aufgezeichnetes STD-Spektrum (Pulsprogramm stdslsp,  $t_{\text{sat}} = 2$  s).

Wie bereits ohne quantitative Analyse aus Abb. 3.64 ersichtlich ist, zeigen in den die Mutante R322L betreffenden STD-Spektren die relativen Peakhöhen bzw. Integrale der unterscheidbaren Protonen bzw. Protonengruppen deutliche Abweichungen von den bei der Untersuchung des wt-Enzyms auftretenden Werten (beachte insbesondere das Verhältnis der H2 - und H4 – Signale).

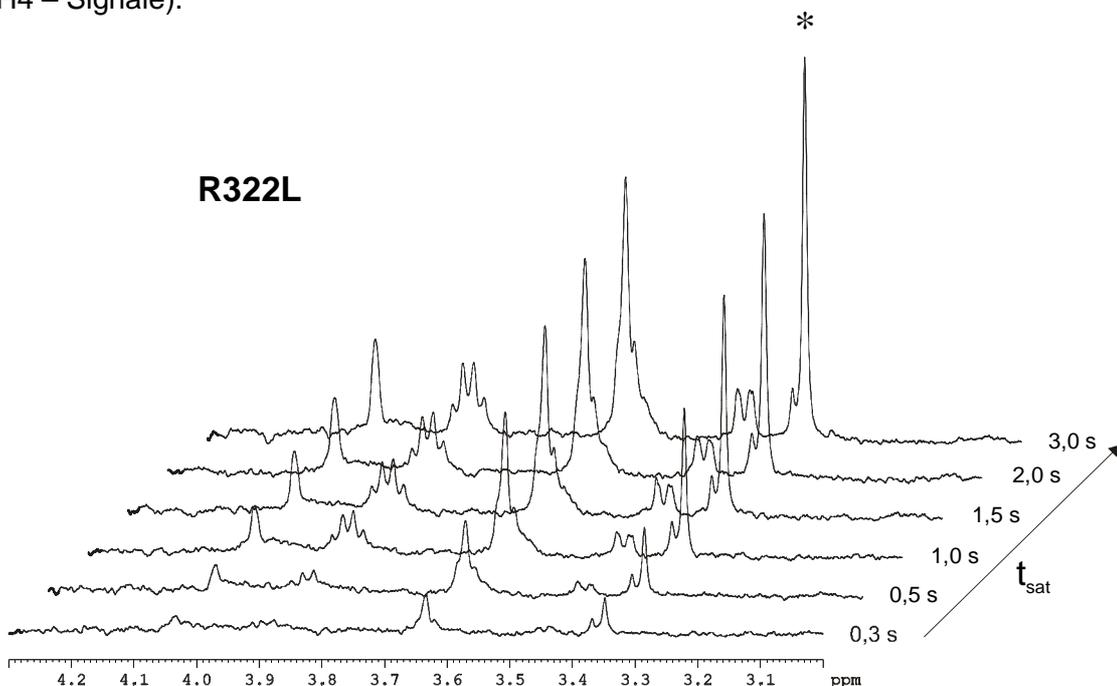
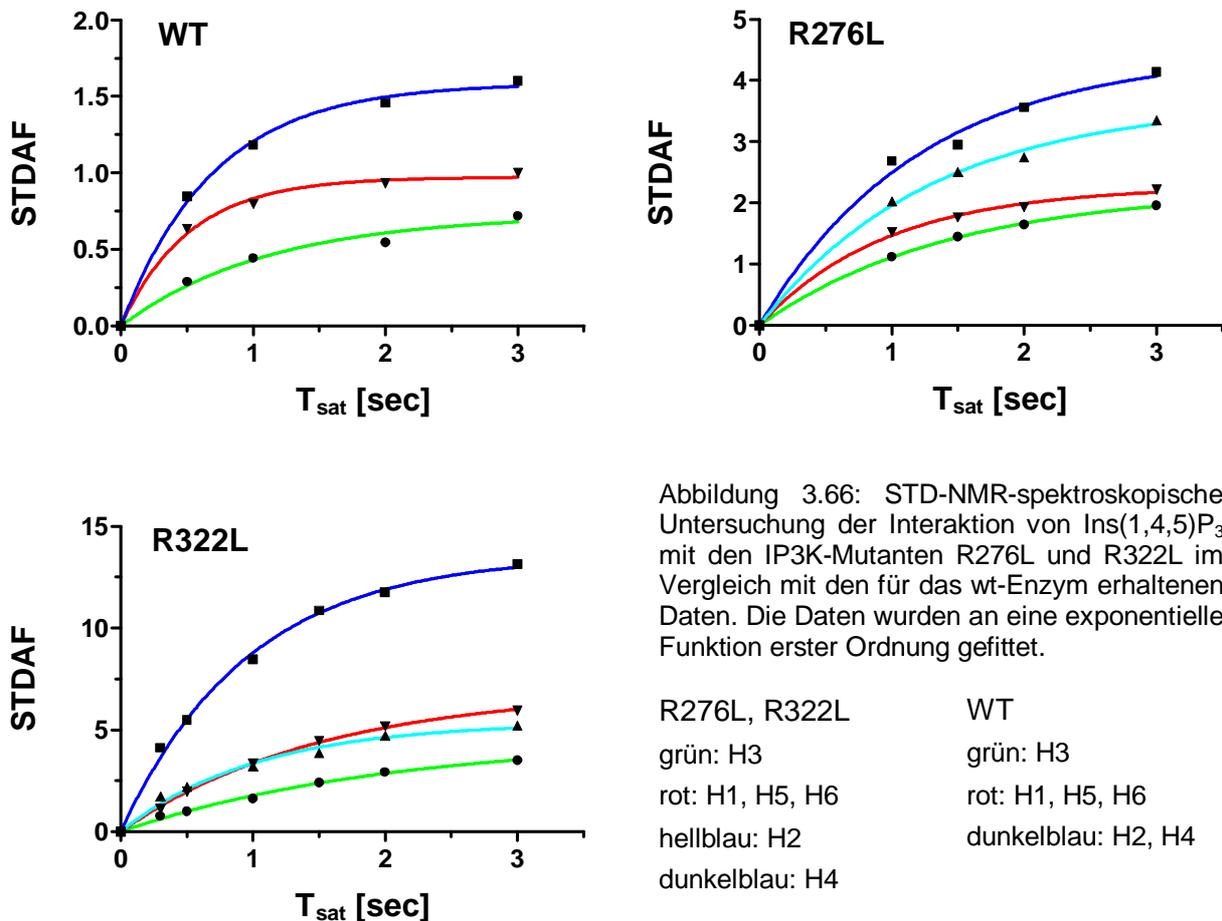


Abbildung 3.65: Strep-GIK(184-452)-R322L. Bei einer Proteinkonzentration von 40  $\mu\text{M}$  und einer  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Konzentration von 1,6 mM aufgenommene STD-Spektren (Darstellung als stacked plot). Die Sättigungszeit  $t_{\text{sat}}$  betrug 0,3 sec, 0,5 sec, 1,0 sec, 2,0 sec, 3,0 sec.

Abbildung 3.66 zeigt die quantitative Auswertung der oben dargestellten Sättigungszeitexperimente für die Mutanten R276L und R322L im Vergleich zu den auch in Abbildung 3.62 gezeigten Daten für das wt-Enzym. Die Experimente wurden in Gegenwart vergleichbarer Ligandenkonzentrationen (wt: 1,67 mM; R276L: 1,5 mM; R322L: 1,6 mM) durchgeführt. Die Datensätze wurden dabei durch eine exponentielle Funktion erster Ordnung (Gleichung 3.1) gefittet.



In den für das wt-Enzym aufgenommenen Spektren zeigte sich eine leichte Überlagerung der Signale der Protonen H2 und H4; aus diesem Grund wurde die Integration unter XWIN-NMR zunächst für beide Protonen zusammen vorgenommen. Die aus den so erhaltenen Werten berechneten und somit als eine Mittelung der einzelnen Beiträge dieser Protonen anzusehenden STD-Amplifikationsfaktoren wurden in der Abbildung 3.66 aufgetragen. Eine nachträglich vorgenommene manuelle Untersuchung mithilfe der auch für die Analyse von Spektren mit hohen Signal/Rausch-Verhältnis effizient einsetzbaren dual-display-Funktion von XWINNMR [Mayer, 2001] zeigte, dass die Einzelbeiträge der Protonen H2 und H4 zu dem im STD-Spektrum detektierbaren Signal im wesentlichen identisch sind. In den folgenden Analysen wurde aus diesem Grund approximativ gesetzt:

$$\text{STDAF}_{\text{H}_2}(t_{\text{sat}}) = \text{STDAF}_{\text{H}_4}(t_{\text{sat}}) = \text{STDAF}_{\text{H}_2, \text{H}_4}(t_{\text{sat}})$$

### 3.7 Ergebnisse

Um die bereits in der Abbildung 3.66 ersichtlichen Unterschiede deutlicher herauszuarbeiten, wurden die die gefitteten Kurven beschreibenden Parameter ( $STDAF_{max}$  und  $k_{sat}$ ) für die einzelnen Protonen H2, H4 und H3 sowie die Protonengruppe (H1, H5, H6) jeweils für die mit dem wt-Enzym, der Mutante R276L und der Mutante R322L gewonnenen Datensätze bestimmt und miteinander verglichen.

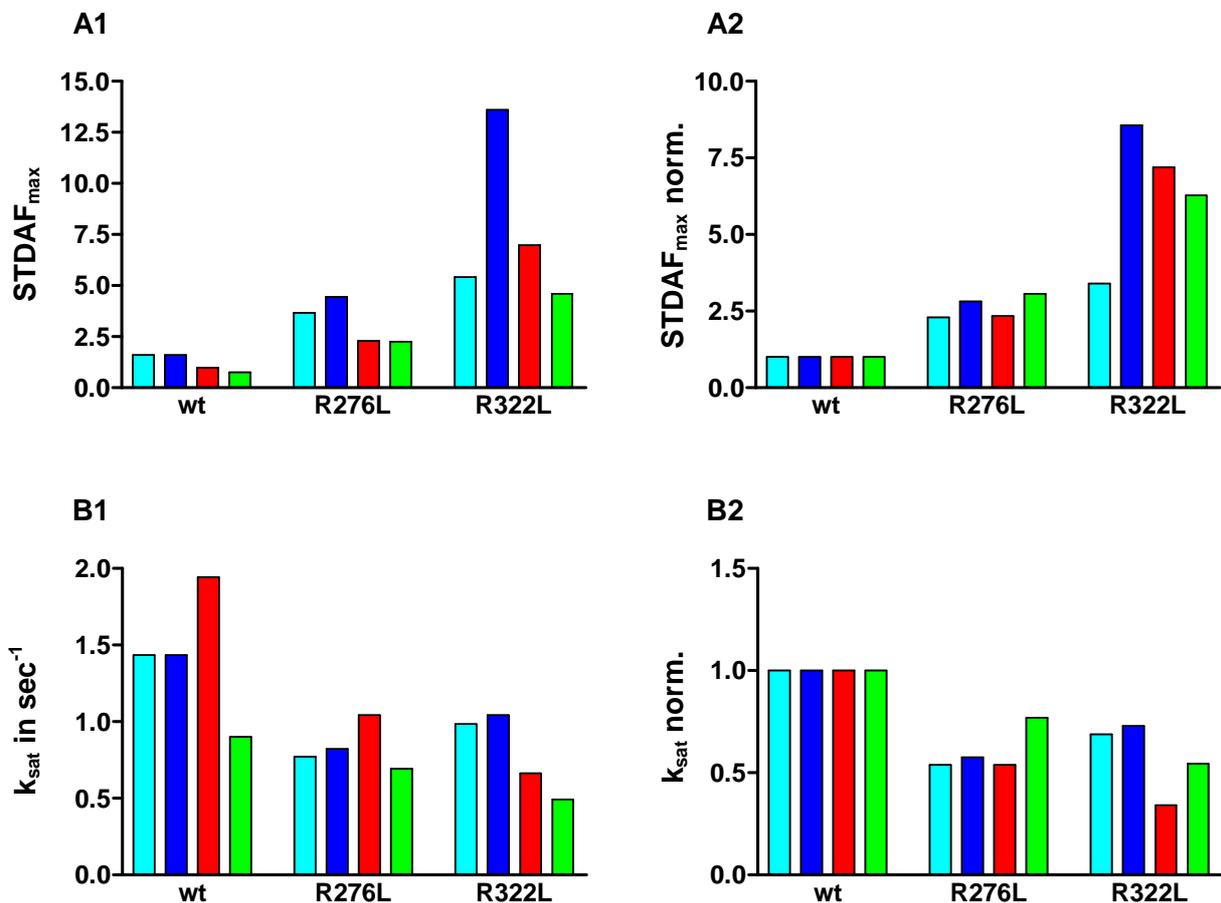


Abbildung 3.67: Maximaler STD-Amplifikationsfaktor  $STDAF_{max}$  und Sättigungsrate  $k_{sat}$  für die Protonen H2, H4, (H1, H5, H6) und H3; angegeben für die Interaktion mit dem wt-Enzym, der Mutante R276L und der Mutante R322L. Betrachtet wurden sowohl die absoluten Werte (A1, B1) als auch die auf den entsprechenden Wert des bei der Interaktion des jeweiligen Protons mit dem wt-Enzym normierten Werte (A2, B2). H2: hellblau; H4: dunkelblau; H1, H5, H6: rot; H3: grün

Bei der Betrachtung von Abb. 3.67, Graph A1 wird deutlich, dass sowohl die Mutation R276L als auch die Mutation R322L einen deutlichen Anstieg der maximal erreichten STD-Amplifikationsfaktoren der Protonen des Inositolrings bedingen. Während der größte  $STDAF_{max}$  für das wt-Enzym bei 1,6 liegt, wurde bei einer Interaktion von  $Ins(1,4,5)P_3$  mit der Mutante R276L ein maximaler Wert von 4,4 erreicht; das Proton H4 erreichte bei der Untersuchung der Mutante R322L sogar einen Wert von 13,6.

Um die bei den mutierten Enzymen auftretenden Veränderungen in der Protein/Inositolphosphat – Interaktion relativ zu der bei der Interaktion von  $Ins(1,4,5)P_3$  mit dem wt-Enzym vor-

liegenden Situation besser bewerten zu können, wurden die im Graph A1 dargestellten absoluten Werte der maximalen STD-Amplifikationsfaktoren jeweils auf den Wert des entsprechenden Protons bei der Interaktion mit dem wt-Enzym normiert (Abb. 3.67, Graph A2). Diese Auftragung verdeutlicht, dass sich die Unterschiede zwischen den Messwerten für die Interaktion von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> mit dem wt-Enzym und der Mutante R276L im wesentlichen durch eine Multiplikation der wt-Daten mit einem konstanten Faktor (ca. 2,6) beschreiben lassen. Die die Interaktion des Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> mit der Mutante R322L charakterisierenden Messwerte korrelieren nicht auf diese einfache Weise mit den wt-Daten; insbesondere zeigt das Proton H2 eine nur 3,4 fache Erhöhung seines maximalen STD-Amplifikationsfaktors, während das Proton H4 einen gegenüber dem wt-Wert um den Faktor 8,4 erhöhten  $STDAF_{max}$  aufweist. Für das Proton H3 bzw. Protonengruppe (H1, H5, H6) konnten Erhöhungen des  $STDAF_{max}$  um den Faktor 6,2 bzw. 7,2 festgestellt werden.

Ein ähnliches Bild ergibt sich bei der Analyse der absoluten bzw. relativ zu den wt-Daten betrachteten Sättigungsraten der einzelnen Protonen bzw. Protonengruppen (Abb. 3.67, Graphen B1 und B2). Beide Mutationen bedingen eine Abnahme der Sättigungsrate aller betrachteten Protonen/Protonengruppen, wobei bei der Mutante R276L für die Protonen H2, H4 und (H1, H5, H6) die Veränderung gegenüber den wt-Daten wiederum durch einen nahezu konstanten Faktor von 0,55 beschrieben werden kann. Lediglich das Proton H3 zeigt hier eine etwas weniger starke Verringerung der Sättigungsrate (Faktor 0,77). Die für die Interaktion von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> mit der Mutante R322L bestimmten Parameter zeigen auch hier keinen einfachen Zusammenhang mit den wt-Daten; insbesondere ist die Sättigungsrate der Protonengruppe (H1, H5, H6) deutlich stärker verringert (Faktor 0,34) als die Sättigungsrate der Protonen H2 (Faktor 0,68) und H4 (Faktor 0,72).

Die hier beschriebenen Resultate werden im Abschnitt 4.4 unter anderem im Kontext der für die Mutanten R276L und R322L erhobenen enzymatischen Daten diskutiert.

---

## 4 Diskussion

### 4.1 Charakterisierung der Inositolphosphatbindungsdomäne der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase

#### ***Definition einer inositolphosphatbindenden core-Domäne durch zielgerichtete Mutagenese***

Von [Bertsch et al., 2000] wurde gezeigt, dass die Bindung von Inositol 1,4,5-trisphosphat an GgIP3K-A in einem protektiven Effekt gegen proteolytische Degradation durch Trypsin resultiert. Betroffen war hiervon der Sequenzbereich zwischen den Aminosäuren R270 und R305 bzw. R310 (Abb. 4.1). In Anwesenheit ausreichender Konzentrationen von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> wurde ein durch Angriff der Protease hinter R305 bzw. R310 entstehendes 16 kDa-Fragment nicht mehr gebildet; diese Positionen sind somit entweder direkt an der Bindung des Inositolphosphates beteiligt oder gelangen infolge von durch Substratbindung induzierten Veränderungen der GgIP3K-A-Tertiärstruktur in Protease-geschützte Positionen. Die durch Trypsin katalysierte Hydrolyse der Peptidbindung zwischen R270 und E271 konnte hingegen in An- und Abwesenheit von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> stattfinden. Das auf diese Weise entstehende 21 kDa-Fragment wurde jedoch in Anwesenheit von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> nicht nur durch die Verhinderung der Proteolyse nach R305 bzw. R310 stabilisiert, vielmehr schienen auch im Sequenzbereich zwischen R270 und R305/R310 liegende, in Abwesenheit von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> von der Protease erkannte basische Reste in Anwesenheit von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> nicht mehr zugänglich zu sein [Bertsch et al., 2000]. Diese Befunde legten eine direkte Einbindung des gesamten so definierten Bereiches an der Substratbindung nahe, eine Abgrenzung dieser Hypothese gegenüber der oben bereits angesprochenen Möglichkeit rein sterischer Effekte erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch die Analyse gezielt mutierter Enzyme mit einzelnen Aminosäureaustauschen in der interessierenden Region.

Es wurden dabei zwei innerhalb des Bereiches zwischen R270 und R305/R310 liegende Reste (R276, K303) identifiziert, welche vermutlich direkt in die Bindung von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> involviert sind; zwei weitere Aminosäurereste (K255, R322), deren Mutation ebenfalls zu einer drastisch verringerten Affinität des Proteins zu Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> führt, flankieren auf Ebene der Primärstruktur den in Anwesenheit von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> vor tryptischer Proteolyse geschützten Bereich (Abbildung 4.1). Rekombinante Enzyme mit Mutationen im Bereich der N-terminalen Begrenzung des durch Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> vor Proteolyse geschützten Bereiches (T267A, R270L, K274Q, K277Q) zeigen eine im Vergleich zum wt-Enzym z.T. gesteigerte spezifische Aktivität bei gleichzeitig verringertem apparentem K<sub>m</sub> – Wert für Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>.

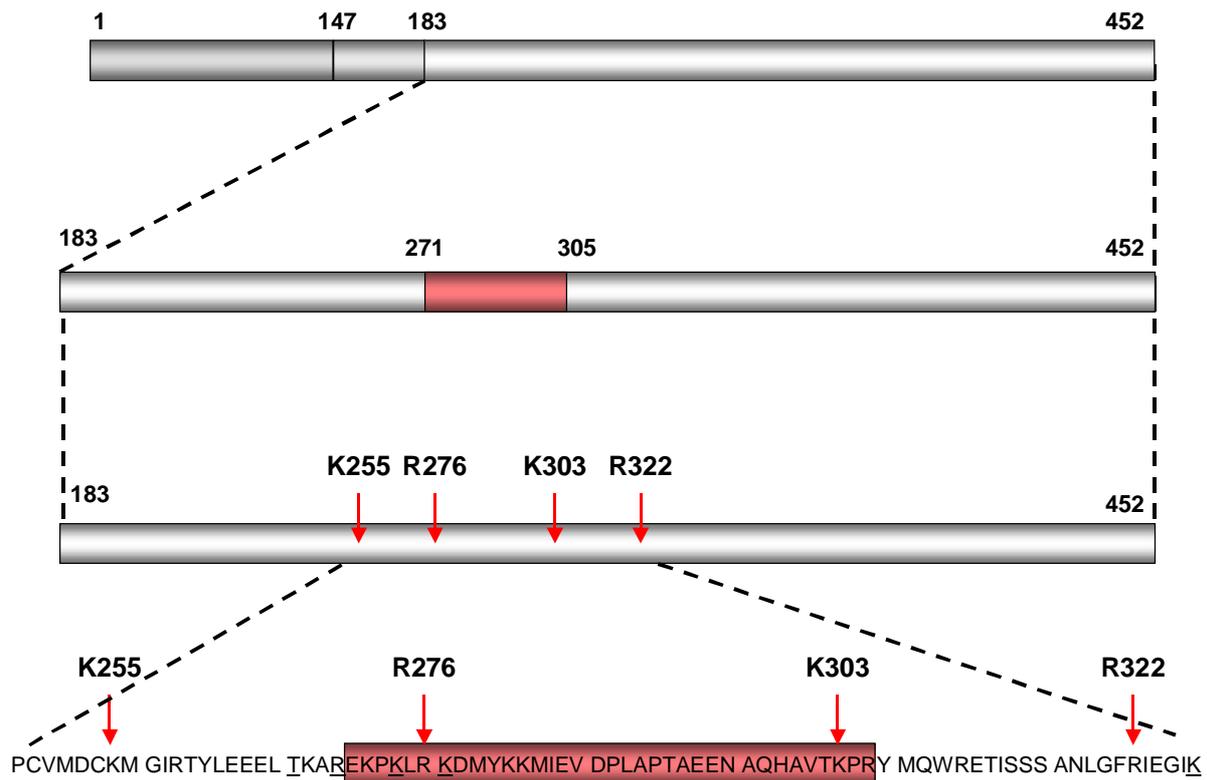


Abbildung 4.1: Definition einer inositolphosphatbindenden core-Domäne durch limitierte tryptische Proteolyse [Bertsch et al., 2000] und zielgerichtete Mutagenese. Dargestellt ist schematisch die Primärstruktur der Vollängen-GgIP3K-A: 1- 147 N-terminaler Bereich, 147 – 183: Calmodulin-Bindungsdomäne, 183 – 452: katalytische Domäne. Der in Anwesenheit von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  vor tryptischer Proteolyse geschützte Bereich [Bertsch et al., 2000] ist durch rote Unterlegung hervorgehoben (AS 271 - 305); die Lokalisation der vier für die Inositolphosphatbindung essentiellen Reste ist durch Pfeile angedeutet. Die untersuchten Mutationen der unterstrichenen Aminosäurereste führen zu einer Erhöhung der Affinität des Enzyms für  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ .

Der durch die Anwesenheit von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  vor proteolytischer Degradation geschützte Bereich und die diesen Bereich unmittelbar flankierenden Regionen erfüllen somit in der Tat direkte Funktionen bei der hochaffinen Bindung von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ . Aus diesem Grund wird der **Sequenzabschnitt K255 – R327** im Folgenden als „**inositolphosphatbindende core-Domäne**“ der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinase bezeichnet.

#### **Die N-terminale Begrenzung der inositolphosphatbindenden core-Domäne**

Deletionsstudien von [Togashi et al., 1997] an RnIP3K-A (Details siehe Einleitung Abschnitt 1.3.1.2) zeigen, dass für eine Bindung von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  der Sequenzbereich von L259 – R459 (bei RnIP3K-A; entsprechender homologer Abschnitt der GgIP3K-A: M252 – R452) hinreichend ist; darüberhinaus zeigt die zitierte Arbeit die Notwendigkeit des nur vier Aminosäuren umfassenden Abschnitts LDCK (RnIP3K-A 259 – 262; bei GgIP3K entsprechend

MDCK, 252 – 255) für hochaffine  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Bindung an N-terminal trunkierte RnIP3K-A-Konstrukte. Es scheint somit gesichert zu sein, dass das PDKG-Konsensus-Motiv bei den Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen die N-terminale Begrenzung einer sich unabhängig faltenden, zur hochaffinen Bindung von Inositolphosphaten befähigten Domäne darstellt. Diese Aussage steht in Übereinstimmung mit der oben postulierten N-terminalen Begrenzung der inositolphosphatbindenden core-Domäne der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinase.

Die konzentrationsabhängige Stabilisierung des 21 kDa – Fragments GgIP3K-A (E271 – R452) durch  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  [Bertsch et al., 2000] zeigt jedoch deutlich, dass auch ein über diese Grenze hinaus N-terminal trunkiertes Fragment nach wie vor die Fähigkeit zur Inositolphosphatbindung besitzt, wenn auch mit signifikant niedrigerer Affinität. Diese Beobachtung wurde, vermutlich aufgrund nicht genügend hoher Sensitivität des verwendeten Assaysystems, in den Experimenten von [Togashi et al., 1997] nicht gemacht; dort wurde ein vollständiger Verlust der Inositolphosphatbindung bei das PDKG-Consensus-Motiv umfassender N-terminaler Deletion beschrieben. Die Punktmutationen K255A und K255N führen bei der GgIP3K-A ebenso wie bei der RnIP3K-A (K262A, K262N, [Togashi et al., 1997]) zu einem katalytisch inaktiven Protein; der stark konservative Austausch K255R zeigte jedoch in keinem der enzymatischen Parameter signifikante Abweichungen vom wt-Enzym. Dieses Ergebnis könnte darauf hinweisen, dass das K255 weniger eine direkte Interaktion mit dem zu bindenden Inositolphosphat eingeht als vielmehr durch seine positive Ladung essentiell zu einer für hochaffine Substatbindung und effiziente Katalyse notwendigen strukturellen Organisation des aktiven Zentrums beiträgt.

### ***Die C-terminale Begrenzung der inositolphosphatbindenden core-Domäne***

Die C-terminale Begrenzung der hier postulierten inositolphosphatbindenden core-Domäne wurde, im Gegensatz zur N-terminalen Begrenzung, experimentell noch nicht validiert. Dennoch weisen verschiedene Beobachtungen darauf hin, dass der Sequenzabschnitt K255 – R327 in der Tat eine sich unabhängig faltende, die wesentlichen strukturellen Elemente zur Bildung einer hochaffinen Inositolphosphatbindung beinhaltende Domäne darstellen könnte: Der direkt an die putative C-terminale Begrenzung (K327) anschließende Abschnitt zeigt einen deutlich geringeren Prozentsatz an Aminosäureidentität zwischen den verschiedenen  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinase-Isoformen als die (putative) Bindungsdomäne selbst. Insbesondere dort vorkommende basische Reste sind im allgemeinen nicht über alle Isoformen und Spezies konserviert. Aus diesem Grund ist es unwahrscheinlich, dass Elementen des entsprechenden Sequenzbereichs in dem für alle Isoformen und Spezies prinzipiell gleich organisierten Mechanismus der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Bindung essentielle Bedeutung zukommt, wenn auch eine Isoform-spezifische Beeinflussung z.B. der Substratselektivität durch Motive in diesem

Abschnitt der Primärstruktur nicht ausgeschlossen werden kann. Des Weiteren werden die Aminosäuren GgIP3K-A R259 – K327 ebenso wie die dazu homologen Bereiche der humanen Isoformen A, B und C durch ein einziges, exakt diesen Bereich umfassendes Exon codiert. Zumindest auf Ebene der genomischen Organisation bilden diese Aminosäuren also eine funktionelle Einheit.

Auch die zunächst konträr erscheinenden Ergebnisse der Untersuchungen C-terminaler Deletionsmutanten von [Togashi et al., 1997] (Details siehe Einleitung, Abschnitt 1.3.1.2) widersprechen nicht unbedingt dem hier vorgeschlagenen Modell einer auf Ebene der Primärstruktur im Zentrum der katalytischen Domäne lokalisierten  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – core – Bindungsdomäne. Beachtenswert sind in diesem Kontext die Resultate von [Yoshikawa et al., 1996] zur strukturellen Eingrenzung der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Bindungsdomäne des MmIP3R1. Hier führte die sukzessive N-terminale Verkürzung eines größeren, inositolphosphatbindenden Fragmentes zunächst zu einem völligen Verschwinden der Bindungsaffinität; größere N-terminale Deletionen resultierten jedoch in Fragmenten mit im Vergleich zum Vollängenprotein signifikant höherer  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Affinität. Ein ähnlicher Effekt wäre auch bei der Betrachtung C-terminaler Deletionen von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinasen vorstellbar.

### ***Ein in die Inositolphosphatbindung involviertes Sequenzmotiv zeigt Homologie zur Prototyp – $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ – Bindungsdomäne des Inositol (1,4,5)-trisphosphat – Rezeptors***

Ein Vergleich des inositolphosphatbindenden core-Motivs der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinase mit der Inositolphosphatbindungsdomäne des  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Rezeptors [Newton et al., 1994] offenbart eine auf bestimmte Teilbereiche der jeweiligen Sequenzen beschränkte Ähnlichkeit der beiden Proteine (Alignment siehe Abb. 4.3). Der betreffende Abschnitt des  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Rezeptors (Aminosäuren 495 – 512 des MmIP3R-1) wurde bereits 1996 durch Mutagenesestudien als für die Ligandenbindung essentielles Strukturelement identifiziert [Yoshikawa et al., 1996]; neuere Untersuchungen [Yoshikawa et al., 1999a, b] legen einen wie in Abbildung 4.2 schematisch dargestellten, modularen Aufbau der hochaffin Inositolphosphate bindenden IP3R-Domäne nahe. Yoshikawa et al. belegten zunächst durch limitierte tryptische Proteolyse des aus Membranfraktionen des Cerebellums gewonnenen MmIP3R-1 den Aufbau der Ligandenbindungsdomäne aus zwei kompakt gefalteten strukturellen Komponenten, welche durch einen u.a. von den Aminosäuren der SI-Spleißregion (318 – 332) gebildeten exponierten Loop verbunden sind. Die Analyse der so erhaltenden, den  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Bindungsbereich abdeckenden tryptischen Fragmente (Bindungsdomänen I (1 -  $\approx$  317) und II ( $\approx$  346 -  $\approx$  923) bzw. II\* ( $\approx$  346 -  $\approx$  604; entstehend bei extensiverer tryptischer Proteolyse)) zeigte, dass erst durch das Zusammentreten der beiden Bereiche eine hochaffine Inositolphosphatbindung möglich wird. Während die als Glutathion-S-Transferase (GST) – Fusionsprotein pro-

karyotisch exprimierte Bindungsdomäne I keine messbare  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Bindungsaffinität besaß, wurde für das GST-Bindungsdomäne II\* – Fusionsprotein eine im Vergleich zur vollständigen Bindungsdomäne niedrig affine Bindung ( $K_d = 4,7 \mu\text{M}$ ) gemessen. Ein Zusammenbringen der beiden GST-Fusionsproteine jedoch resultierte in der Ausbildung einer hochaffinen  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Bindungsstelle ( $K_d = 11 \text{ nM}$ ). Die Bindungsdomäne II\*, deren Sequenz zum Teil Homologie zur inositolphosphatbindenden core-Domäne der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinase aufweist, stellt somit einen Prototyp einer  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Bindungsdomäne dar. Erst durch das Hinzutreten der per se nicht  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – bindenden Domäne I (1 -  $\approx$  317) erlangt diese die Fähigkeit zur hochaffinen Inositolphosphatbindung.

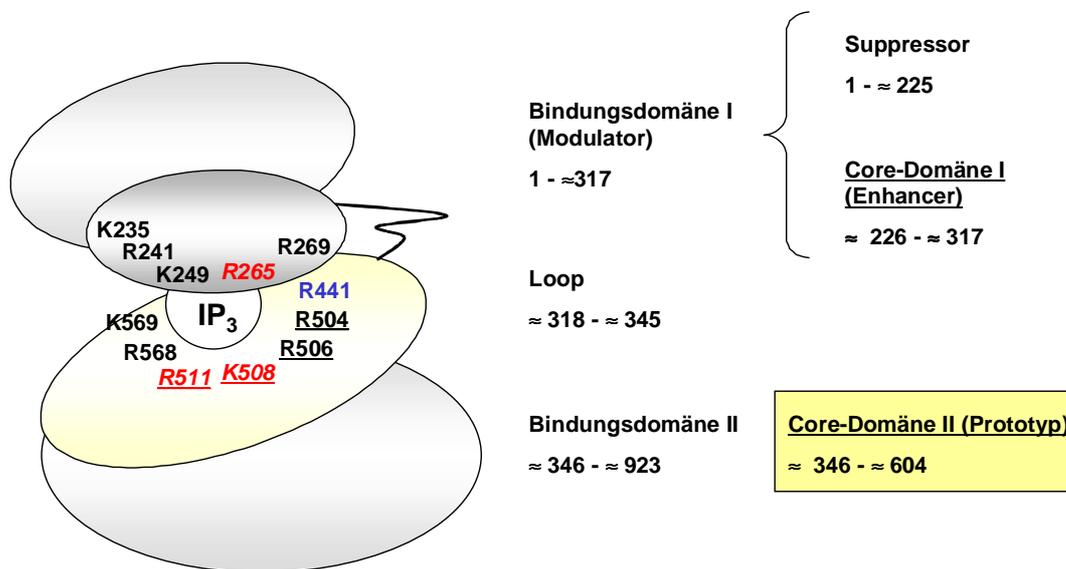


Abbildung 4.2: Schematisches Modell der Domänenstruktur der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Bindungsdomäne des IP3R (nach [Yoshikawa et al., 1999b]). Explizit bezeichnete Aminosäurereste sind gemäß den Mutagenesestudien [Yoshikawa et al., 1996] in die Ligandenbindung involviert; besondere Bedeutung scheint dabei den rot/kursiv dargestellten Resten zuzukommen. Mutation des R441 (blau) zu Q resultiert in einer gesteigerten Affinität gegenüber  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ . Durch Unterstreichen hervorgehobene Aminosäuren befinden sich in dem in dem Alignment in Abbildung 4.2 dargestellten Sequenzabschnitt.

Die in Abbildung 4.2 dargestellte Einteilung der Bindungsdomäne I in eine Suppressor- und eine Enhancer-Domäne resultiert aus den Ergebnisse von Bindungsstudien an N-terminal trunkeerten  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Rezeptorfragmenten [Yoshikawa et al., 1996]. Ein die MmIP3R-Aminosäuren 224 – 734 umfassendes Fragment wies eine um den Faktor 10 höhere  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Bindungsaffinität als das N-terminal vollständige Protein (AS 1 – 734) auf. Der Sequenzbereich 1 – 225 scheint somit supprimierend auf die Inositolphosphatbindung zu wirken.



ten. Der ebenfalls in allen Sequenzen identische vorliegende Lysinrest K268 (GgIP3K) bzw. K501 (MmIP3R-1) scheint für die Funktion beider Protein nicht essentiell zu sein; entsprechende Mutationen (GgIP3K-A: K268E; MmIP3R-1: K501Q) zeigten keine gegenüber dem wt-Protein signifikante Veränderung der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Bindungsaffinität.

Deutliche funktionale Unterschiede bestehen hingegen zwischen den im Zentrum des von den Resten K268 und R276 (GgIP3K-A) bzw. K501 und R511 (MmIP3R-1) flankierten Bereiches gelegenen Aminosäureresten. Während bei Fragmenten des MmIP3R-1 die Mutationen K504Q, K506Q sowie K508Q, K508A und K508R zu einer starken Verringerung der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Bindungsaffinität und somit zu einer Funktionsminderung des IP3R führen, haben ähnliche an der GgIP3K-A untersuchte Mutationen (R270L, K272D, K274Q) keine negativen Auswirkungen auf die Inositolphosphatbindung. Im Gegenteil wurde für die Mutanten R270L und K274Q sogar ein signifikant verringerter apparenter  $K_m$  – Wert für  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  gemessen; die Mutante R270L zeigte zusätzlich noch eine Steigerung ihrer spezifischen Aktivität. Diese durch in vitro Mutagenese generierten Proteine stellen somit (ihre katalytische Effizienz betreffend) artifiziell verbesserte Versionen des wt-Enzyms dar; ein Befund der in starkem Kontrast zu den entsprechenden Resultaten für die Funktion des MmIP3R-1 steht.

Auch auf Ebene der Sekundärstruktur scheinen Unterschiede in der Organisation des zwischen  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinasen und – Rezeptoren homologen Bereiches zu bestehen. Die in Abbildung 4.3 gezeigten jpred-Consensus-Sekundärstrukturvorhersagen für die GgIP3K-A und den HsIP3R-1 sind insbesondere in dem im vorigen Abschnitt diskutierten funktionell disjunkten Sequenzabschnitt deutlich verschieden (IP3R:  $\alpha$  - helikal; IP3K: Loop ?). Dies wird vermutlich im Wesentlichen durch die unterschiedlichen Positionen der als Helixbrecher wirkenden Prolinreste (GgIP3K-A: C-terminal von R270 und K272; HsIP3R-1: N-terminal von den entsprechenden Resten R504 und R506) bedingt.

Die inositolphosphatbindende core-Domäne der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinasen scheint somit zwar in einem evolutiven Zusammenhang mit einem Teilbereich des von [Yoshikawa et al., 1999b] anhand des MmIP3R-1 definierten Prototyps einer  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – bindenden Domäne zu stehen; funktionell und mit großer Wahrscheinlichkeit auch strukturell bestehen jedoch deutlich Unterschiede zwischen diesen beiden Sequenzabschnitten. Eine Erklärung für diese vermutlich divergente Entwicklung aus einem gemeinsamen Vorläufermotiv könnte in den gegenüber einem reinen Rezeptorprotein deutlich erweiterten Anforderungen an ein metabolisch hochaktives Enzym liegen.

---

***Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3 – Kinasen werden durch Phosphorylierungen im Bereich der inositolphosphatbindenden core-Domäne reguliert***

Wie bereits in den Abschnitten 1.3.1.2 und 3.5.1.2 ausgeführt, wird sowohl die spezifische Aktivität als auch die Interaktion der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen mit dem Calcium/Calmodulin-Komplex durch signalgesteuerte, posttranslationale Modifikationen beeinflusst. Die Isoformen A und B wurden im Rahmen von *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen als Targets der Proteinkinasen A und C [Woodring et al., 1997; Communi et al., 1999; Sim et al., 1990; Lin et al., 1990], sowie der Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II [Communi et al., 1997] identifiziert; bisher wurde jedoch nur für die von CaMKII katalysierte Phosphorylierung der Isoform A aus Ratte die von der Phosphorylierung betroffene Aminosäure bestimmt [T311 in RnIP3K-A, Communi et al., 1997]. Aufgrund von stöchiometrischen Daten [Communi et al., 1999] und der Konservierung der CaMKII-Konsensussequenz R-X-X-S/T-X in den B-Isoformen werden vermutlich auch diese Enzyme durch Phosphorylierung des entsprechenden Threoninrestes reguliert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Austausch des entsprechenden Threoninrestes (T302) der GgIP3K-A gegen einen bei physiologischem pH negativ geladenen Aspartatrest zur Expression eines rekombinanten Enzyms führt, welches zum Teil ähnliche enzymkinetische Eigenschaften wie das tatsächlich phosphorylierte Enzym besitzt. Insbesondere entsprach die an der Mutante T302D bezüglich der Interaktion mit Ca<sup>2+</sup>/CaM gemachte Beobachtung exakt der von [Communi et al., 1997] beschriebenen Auswirkung einer Phosphorylierung der RnIP3K-A an T311: in beiden Experimenten wurde eine gesteigerte Sensitivität gegenüber dem Ca<sup>2+</sup>/CaM-Komplex bei unveränderter maximaler Aktivierung beobachtet. Als nicht durch den Austausch von T durch D imitierbar erwies sich hingegen die durch die Phosphorylierung bewirkte, hochsignifikante Steigerung der basalen, in Abwesenheit von Calmodulin gemessenen, Aktivität: der für das rekombinante Protein bestimmte  $v_{\max}$  – Wert entsprach, ebenso wie der apparente  $K_m$  – Wert der Mutante für Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, dem für das wt-Enzym gemessenen Parameter.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde durch eine mittels der Phosphobase-Datenbank (<http://www.cbs.dtu.dk/databases/PhosphoBase/>) vorgenommene Analyse der Primärstruktur der HsIP3K-B eine B-Isoform-spezifische putative Phosphorylierungsstelle innerhalb der inositolphosphatbindenden core-Domäne identifiziert (siehe Abbildung 4.4). Der hier lokalisierte Serinrest (S764 in HsIP3K-B) könnte entsprechend seines Sequenzumfeldes sowohl durch Proteinkinase A (Konsensus R-X<sub>1-2</sub>-S/T-X), durch Proteinkinase C (Konsensus X-S/T-X-R/K) oder Proteinkinase G (Konsensus (R/K)<sub>2-3</sub>-X-S/T-X) modifiziert werden. Die Resultate der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente (Kapitel 3.5.3 sowie 3.6) legen eine tatsächliche Rolle der (PKC-vermittelten ?) Phosphorylierung von S764 in der Regulation der Isoform B nahe. Unter der Annahme, dass auch hier zumindest Einzelaspekte der durch die Phospho-

rylierung induzierten Veränderungen an einem entsprechend mutierten Enzym (S764D) messbar sind, könnte der physiologische Effekt einer Phosphorylierung an dieser Position in einer Steigerung der  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-vermittelten Aktivierung der Kinase bestehen.

Ein Vergleich mit den bisher in der Literatur beschriebenen Effekten einer Phosphorylierung der Isoform B durch PKC ist nur bedingt möglich, da das aus Geweben bzw. Zellen isolierte Vollängen - Enzym *in vitro* an zwei verschiedenen Serin- oder Threoninreste bisher unbekannter Position durch PKC phosphoryliert wird [Communi et al. (1999)]. In enzymkinetischen Untersuchungen am *in vitro* PKC-phosphorylierten Enzym ([Communi et al., 1999]; [Woodring et al., 1997]) wurde somit vermutlich der überlagerte Effekte beider Phosphorylierungen beschrieben; dieser besteht in einer Absenkung der spezifischen Aktivität um den Faktor 2. Die Aktivierbarkeit der PKC-phosphorylierten Isoform B durch den  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-Komplex wurde bisher nicht untersucht; der überlagerte Effekt der PKC- und CaMKII – katalysierten *in vivo* Phosphorylierungen des Vollängenenzym besteht nach [Communi et al., 1999] in einem ca. 7fachen Anstieg der basalen spezifischen Aktivität, einer unveränderten Affinität zum  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-Komplex und einer verringerten  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-Stimulierbarkeit (Faktor 7 gegenüber Faktor 10 für das unphosphorylierte Enzym).

Sowohl die für die Isoform A experimentell verifizierte [Communi et al., 1997] CaMKII – Phosphorylierungsstelle als auch die in dieser Arbeit untersuchte putative B-Isoform-spezifische PKC - Phosphorylierungsstelle liegen im Sequenzbereich der inositolphosphatbindenden core-Domäne (siehe Abb. 4.4). Mutation der entsprechenden Reste in der GgIP3K-A (CaMKII-site T302) bzw. der HsIP3K-B (putative PKC, PKA, PKG – site S764) zu einem bei physiologischem pH negativ geladenen Aspartatrest resultierte in beiden Fällen in einem bezüglich der basalen enzymkinetischen Parameter (apparenter  $K_m$  – Wert für  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ , spezifische Aktivität) im wesentlichen unveränderten Protein. Deutliche Unterschiede zum jeweiligen wt-Enzym wurden jedoch bei beiden Mutanten bei der Messung der  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-Aktivierbarkeit festgestellt (erhöhte Sensitivität bei unveränderter maximaler Aktivierung bei GgIP3K-A-T302D, unveränderte Sensitivität bei erhöhter maximaler Aktivierung bei HSIP3K-B-S764D).

Diese Beeinflussung der  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM mediierten Regulation der Kinaseaktivität durch Mutationen bzw. Phosphorylierungen im Bereich des als inositolphosphatbindende core-Domäne identifizierten Sequenzbereichs könnte ein Hinweis auf eine direkte, durch  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM – Bindung modifizierbare Interaktion der CaM-Bindungsdomäne mit der Inositolphosphatbindungsdomäne sein. In der Tat wurden ähnliche Mechanismen bereits für die  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-regulierte Aktivierung von Serin/Threonin-Proteinkinasen wie der Calmodulin dependent kinase, der Phosphorylase Kinase sowie der Myosin light chain kinase beschrieben [Review: Wilmann et al., 2000].

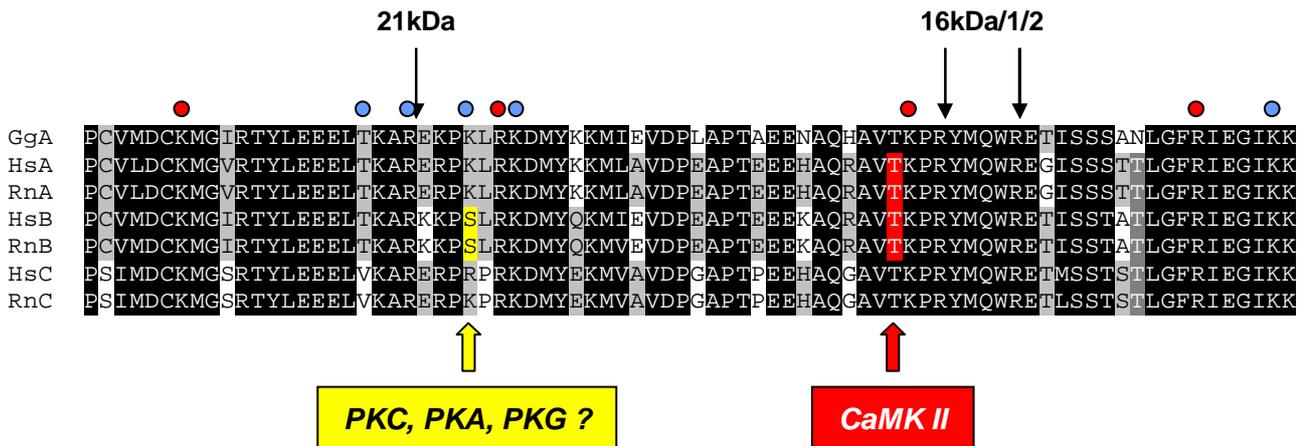


Abbildung 4.4: Lokales Alignment der inositolphosphatbindenden core-Domänen der verschiedenen IP3K-Isoformen A, B und C in Huhn (Gg), Mensch (Hs) und Ratte (Rn). Die Lokalisation der in den Isoformen A und B vorhandenen CaMK II – Phosphorylierungsstelle ([Communi et al., 1997] rot unterlegt) sowie der Isoform B – spezifischen putativen PKC/PKA/PKG – Phosphorylierungsstelle (gelb unterlegt) wurde in Beziehung zu dem in Anwesenheit von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  vor tryptischer Proteolyse geschützten Bereich ([Bertsch et al., 2000], zwischen den Markierungen 21 kDa und 16 kDa/1/2) und den Positionen der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten, die Inositolphosphatbindung beeinflussender Mutationen gesetzt (rote Punkte: Mutation verringert Affinität zu  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ; blaue Punkte: Mutation erhöht Affinität zu  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ).

Aligniert wurden die Sequenzen der

- GgIP3K-A (GgA, AS 249 – 328)
- HsIP3K-A (HsA, AS 258 – 337)
- RnIP3K-A (RnA, AS 256 – 335)
- HsIP3K-B (HsB, AS 739 – 818)
- RnIP3K-B (RnB, AS 727 – 806)
- HsIP3K-C (HsC, AS 483 – 562)
- RnIP3K-C (RnC, AS 475 – 554)

## 4.2 Variationen der inositolphosphatbindenden core-Domäne der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase in anderen Kinasen der PDKG – Kinase-Familie: Implikationen zur Substratselektivität

### *Funktionell wichtige Bereiche der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen sind in anderen Kinasen der PDKG-Kinase-Familie konserviert*

In diesem Kapitel wird diskutiert, in welcher Weise die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse auf die anderen Mitglieder der PDKG-Superfamilie, die Inositolhexakisphosphatkinasen und die Inositolpolyphosphatmultikinasen, übertragbar sind. In Form von lokalen Alignments werden Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den verschiedenen Kinasen aufgezeigt; mögliche, experimentell noch zu verifizierende Hypothesen zur Erklärung der differierenden Substratselektivitäten der Kinasen werden diskutiert.

Die Abbildungen 4.5 und 4.6 stellen schematische Zusammenfassungen der wesentlichen Aussagen dieses Kapitels dar. Abbildung 4.5 bietet dabei eine Übersicht über die Lokalisation der entsprechenden Sequenzbereiche auf der Primärstruktur der GgIP3K-A. Aufgrund der hohen Sequenzidentität zwischen den verschiedenen Vertebraten-IP3K-Isoformen im Bereich der katalytischen Domäne des Enzyms (in Abb. 4.5 durch grau gestrichelte Unterlegung deutlich gemacht) gilt dieses Schema prinzipiell für alle IP3K-Isoformen; lediglich die Länge und Aminosäurekomposition des sich N-terminal an die CaM-Bindungsdomäne anschließenden Bereichs zeigt ausgeprägte Variabilität zwischen den Isoformen A, B und C.

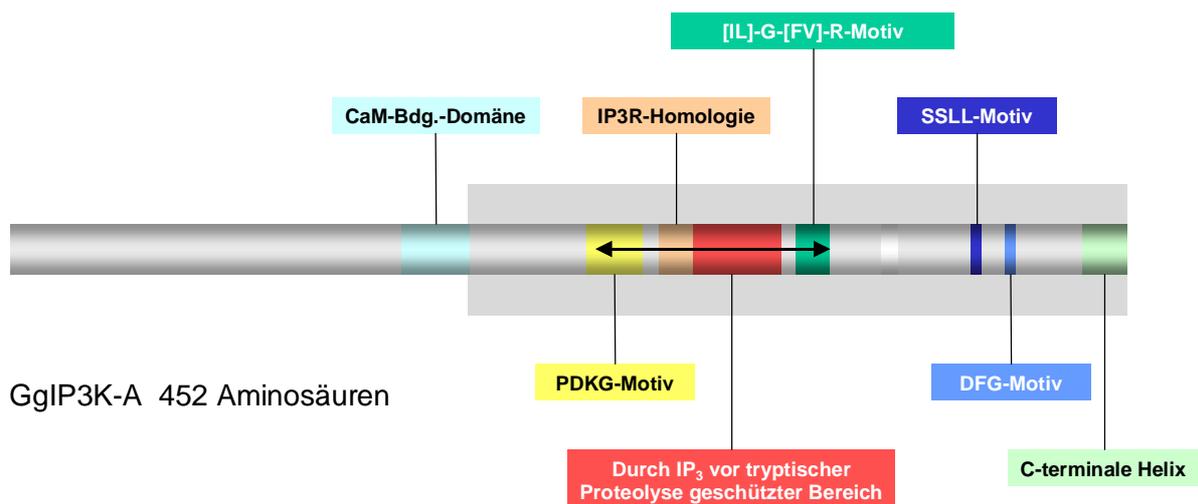


Abbildung 4.5: Schematische Darstellung der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase – Primärstruktur. Die katalytische Domäne wurde schraffiert hinterlegt; neben der CaM-Bindungsdomäne und der im Abschnitt 4.1 behandelten IP3R-Homologie wurden weitere, in den folgenden Abschnitten 4.2 und 4.3 diskutierte Sequenzbereiche farbig hervorgehoben. Der schwarze Doppelpfeil bezeichnet die im Abschnitt 4.1 definierte inositolphosphatbindende core-Domäne der IP3K.

Abbildung 4.6 zeigt eine schematische Gegenüberstellung der Primärstrukturen ausgewählter Vertreter der Unterklassen der PDKG-Familie (GgIP3K-A, HsIP6K-2 und HsIPMK). Die Bedeutung der in den Bereich der inositolphosphatbindenden core-Domäne der IP3K (in den Abb. 4.5 und 4.6 durch einen Doppelpfeil markiert) fallenden Motive (PDKG und [IL]-G-[FV]-R) wird im Kapitel 4.2 diskutiert. Nur die IP6K besitzen ein weiteres, dem [IL]-G-[FV]-R-Motiv ähnliches Motiv ([IL]-[EQ]-G-F-[RK]), welches in einem Bereich (gestrichelt dargestellt) mit nur geringer Homologie zu den IP3K, aber ausgeprägterer Ähnlichkeit zu den *mammalia* Inositolpolyphosphatmultikinasen lokalisiert ist.

Weitere Sequenzidentitäten bestehen im Bereich des auf nicht bekannte Weise in den katalytischen Prozess eingebundenen SSSL-Motivs [Saiardi et al., 2001b] sowie des extremen C-Terminus der Kinasen. Dieser wurde in Abbildung 4.5, aufgrund der übereinstimmenden Sekundärstrukturvorhersagen als C-terminale Helix bezeichnet.

Die Rolle des eine Homologie zu der großen Familie der Proteinkinasen herstellenden DFG-Motivs wird in Abschnitt 4.3 näher betrachtet.

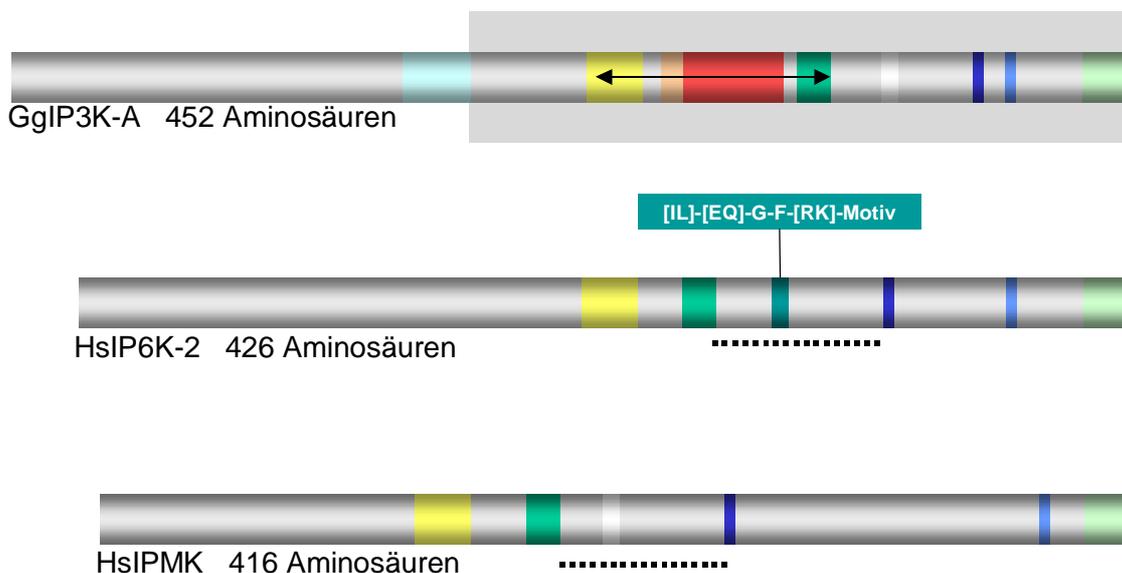


Abbildung 4.6: Schematischer Vergleich der Primärstrukturen der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen (IP3K), der Inositolhexakisphosphatkinasen (IP6K) und der *mammalia* Inositolpolyphosphatmultikinase (IPMK). Dargestellt wurden die in den Abschnitten 4.2 und 4.3 diskutierten Homologiebereiche (Bezeichnung und Farbcodierung siehe Abb. 4.5). Nur die IP6K besitzen ein zwischen den Isoformen 1, 2 und 3 konserviertes [IL]-[EQ]-G-F-[RK] – Motiv; die entsprechenden Sequenzabschnitte der IP3K und IPMK sind weiß dargestellt. Der unterstrichene Bereich zeigt deutliche Ähnlichkeiten zwischen den IP6K und IPMK, aber nur schwache Homologie zu dem entsprechenden Abschnitt der IP3K.

### Das PDKG-Consensus-Motiv

Von [Saiardi et al., 1999, 2001a, b] wurde das in dieser Arbeit abgekürzt als PDKG-Motiv bezeichnete Consensus-Motiv **P-X-[VI]-[ML]-D-X-K-[MI]-G** als ein den Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen, Inositolhexakisphosphatkinasen und Inositolphosphatmultikinasen gemeinsames Signaturmotiv beschrieben. Die Abbildung 4.7 zeigt ein diesen Bereich betreffendes lokales Alignment; einbezogen wurden die hier untersuchte Isoform A aus Huhn (GgIP3K-A) sowie die humanen Sequenzen der IP3K-Isoformen A, B und C (HsIP3K-A, B, C) sowie der IP6K 1, 2 und 3 (HsIP6K-1, 2, 3) und der IPMK (HsIPMK). Auch auf Ebene der mit Hilfe des Jpred-Servers erstellten Sekundärstrukturvorhersagen (exemplarisch dargestellt für GgIP3K-A, HsIP6K-2 und IPMK) zeigt sich eine deutliche Übereinstimmung zwischen den Sequenzen.

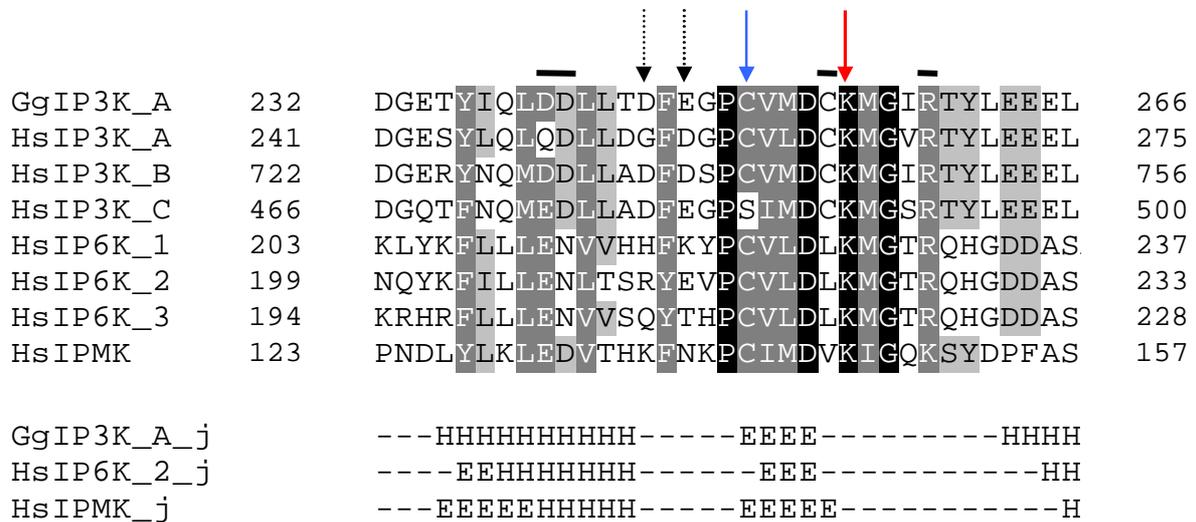


Abbildung 4.7: Lokales Alignment der IP3K-Isoformen A, B und C sowie der IP6K-Isoformen 1, 2 und 3 und der IPMK im Bereich des PDKG-Consensusmotivs. Schwarz hinterlegt: Rest identisch in allen IP3K, IP6K und IPMK; dunkelgrau hinterlegt: identisch oder konservativ ersetzt in allen IP3K, IP6K und IPMK (max. 1 Isoform Ausnahme); hellgrau hinterlegt: identisch oder konserviert in den meisten IP3K, IP6K, IPMK (mehr als 1 Isoform Ausnahme). Die Sekundärstrukturvorhersagen wurden mit Hilfe von Jpred (<http://jura.ebi.ac.uk:8888/>) erstellt. Bedeutung der Balken und Pfeile siehe Text.

Die Bedeutung dieses Sequenzbereiches für die Inositolphosphatbindung wurde für die Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen [Togashi et al., 1997] und die Inositolhexakisphosphatkinasen ([Morrison et al., 2001], [Luo et al., 2002]) bereits demonstriert; in der vorliegenden Arbeit konnten diese Resultate zum einen durch Untersuchung der Mutanten K255A und K255N bestätigt werden, zum anderen konnten aber auch weitere Aussagen abgeleitet werden. So wurde gezeigt, dass an der Position 255 (in Abb. 4.7 durch roten Pfeil gekennzeichnet) lediglich eine positiv geladene Aminosäure notwendig ist; die enzymatischen Eigenschaften der Mutante K255R stimmten mit dem wt-Enzym überein. Darüberhinaus fiel auf,

dass bei allen im Gegensatz zum wt-Enzym nach der Expression in *E.coli* komplett unlöslichen Mutanten (D240A/D241A, C254S, R259N; in Abb. 4.7 durch schwarze Balken gekennzeichnet) Aminosäuren im Bereich des PDKG-Motivs ausgetauscht worden waren. Dieser Sequenzabschnitt scheint somit eine für die Aufrechterhaltung der korrekten 3D-Struktur der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase bedeutsame Funktion zu haben. Für eine (niedrigaffine) Bindung von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> scheint das PDKG – Motiv jedoch nicht zwingend erforderlich zu sein, wie aus der beobachtbaren Interaktion von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> mit dem bei der tryptischen Proteolyse entstehenden 21 kDa-Fragment ersichtlich ist [Bertsch et al., 2000].

Weitere Mutationen in diesem Abschnitt der GgIP3K-A beeinflussten sowohl die Bindung von ATP (D245A, E247L; schwarze Pfeile in Abb. 4.7) und die maximale Umsatzgeschwindigkeit (C250S; blauer Pfeil in Abb. 4.7) des rekombinanten Enzyms. Dies impliziert eine direkte oder indirekte Rolle des Motivs entweder bei der Positionierung des Substrats ATP oder dem katalytischen Transfer des  $\gamma$ -Phosphats auf die Akzeptorhydroxylgruppe des Inositolrings.

***Das Motiv S – [STA]<sub>3</sub> – X – [LI] – G – [FV] – R – [IV] – X – G ist in den IP3K und IP6K stark, in der IPMK nur schwach konserviert***

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das R322 der GgIP3K-A als ein in die Inositolphosphatbindung involvierter Rest identifiziert. Ein Austausch dieser Aminosäure gegen Leucin oder Lysin resultierte in einer signifikanten Erhöhung des apparenten K<sub>m</sub> – Wertes für Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> sowie in einer deutlichen Abnahme der maximalen Umsatzgeschwindigkeit des Enzyms. STD-NMR-Analysen und Vergleiche mit der katalytischen Untereinheit der Phosphatidylinositol 3-Kinase  $\gamma$  (PDB – ID: 1E8X) legen, wie in den nachfolgenden Abschnitten 4.3 und 4.4 beschrieben, eine Interaktion dieser Aminosäure mit dem Phosphatrest an Position 4 des Liganden Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> nahe. Die Phosphatgruppen an den Positionen 4 und 5 des Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> gehören zu den wesentlichsten Determinanten eines durch Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinasen hochaffin gebundenen Inositolphosphates ([Van Dijken et al., 1994]; [Hillemeier, 2001]), somit korrelieren die im Rahmen dieser Arbeit gemachten enzymkinetischen Beobachtungen gut mit dieser Annahme.

Ein Vergleich des Sequenzumfeldes von GgIP3K-A-R322 mit der Primärstruktur und vorhergesagten Sekundärstruktur der Inositolhexakisphosphatkinasen ergibt, wie in Abbildung 4.8 dargestellt, deutliche Übereinstimmungen zwischen diesen beiden Enzymklassen. Insbesondere ist der dem GgIP3K-A-R322 entsprechende Argininrest (markiert durch einen roten Pfeil) in allen IP3K und IP6K – Isoformen vorhanden.

GgIP3K_A	311	ETISSSANLGFRIEGIKKADGT	332
HsIP3K_A	320	EGISSSTTLGFRIEGIKKADGS	341
HsIP3K_B	801	ETISSSTATLGFRIEGIKKEDGT	822
HsIP3K_C	545	ETMSSTSTLGFRIEGIKKADGT	566
HsIP6K_1	248	CEQSTSATLGVVCGMQVYQLD	269
HsIP6K_2	244	CQQSTSAVIGVAVCGMQVYQAG	265
HsIP6K_3	239	CAQSTSACLGVRIICGMQVYQTD	260
HsIPMK	166	SKYPLMEEIGFLVVGMRVYHVH	187

GgIP3K_A_j	EEE----EEEEEEE--HHH---
HsIP6K_2_j	-----EEEEEEE--EE----
HsIPMK_j	-----EEEEEEEEEEEEEE---

Abbildung 4.8: Lokales Alignment der IP3K-Isoformen A, B und C sowie der IP6K-Isoformen 1, 2 und 3 und der IPMK im Bereich des S-[STA]<sub>3</sub>-X-[LI]-G-[FV]-R-[IV]-X-G Consensus Motivs. Schwarz hinterlegt: Rest identisch in allen IP3K, IP6K und IPMK; dunkelgrau hinterlegt: identisch oder konservativ ersetzt in allen IP3K, IP6K und IPMK (max. 1 Isoform Ausnahme); hellgrau hinterlegt: identisch oder konservativ in den meisten IP3K, IP6K, IPMK (mehr als 1 Isoform Ausnahme). Die Sekundärstrukturvorhersagen wurden mit Hilfe von Jpred (<http://jura.ebi.ac.uk:8888/>) erstellt.

Ob der dem GgIP3K-A-R322 entsprechende Argininrest der Inositolhexakisphosphatkinasen in der Tat in die Substratbindung dieser Enzyme involviert ist, wird derzeit im Rahmen der Promotion von N. Bischoff (IMBM UKE Hamburg, Abteilung für Zelluläre Signaltransduktion) geprüft; erste derzeit durchgeführte Analysen weiterer GgIP3K-A-Mutanten (L319A, I323A, F321A) geben Anhaltspunkte auf die funktionelle und strukturelle Bedeutung weiterer in dem in Abb. 4.8 gezeigten Sequenzbereich lokalisierte Aminosäuren.

Auffallend ist die geringe Ausprägung des Motivs in der Inositolpolyphosphatmultikinase. Zwar ist eine Verwandtschaft der entsprechenden Sequenzabschnitte insbesondere mit den Inositolhexakisphosphatkinasen klar zu erkennen, es fehlt jedoch das charakteristische Cluster kleiner, polarer Aminosäuren (S, T). Zudem ist die dem GgIPK-A-R322 entsprechende Position mit einem Leucin besetzt, genau dieser Austausch wirkte sich im Falle der GgIP3K-A negativ auf  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Affinität sowie maximale Umsatzgeschwindigkeit aus. Die Inositolpolyphosphatmultikinasen katalysieren die Übertragung der  $\gamma$ -Phosphatgruppe des ATP sowohl auf die Hydroxylgruppe an C3 des  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  als auch an C6 des  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ ; sie sind also im Gegensatz zu den Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen in der Lage, das Inositolphosphat in den beiden, in Abbildung 4.9 dargestellten Orientierungen zu binden und die jeweils zu phosphorylierende Hydroxylgruppe in eine für die Katalyse günstige Position zu bringen. Eventuell kann im Fall der von den  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinasen nicht katalysierten Reaktion ein im aktiven Zentrum lokalisierter Leucinrest durch hydrophobe Wechselwirkung mit den Protonen des Inositolrings zur Bindung beitragen.



Abb. 4.9: Zwei Orientierungen des  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ , welche durch  $180^\circ$ -Drehung um die grün eingezeichnete Achse ineinander überführbar sind.

***Inositolhexakisphosphatkinasen: veränderte Selektivität durch Doppelung eines zu einem Motiv der inositolphosphatbindenden core-Domäne der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinase homologen Bereiches ?***

Wie im vorigen Abschnitt diskutiert, stellt die Sequenz  $\text{S-}[\text{STA}]_3\text{-X-[LI]-G-[FV]-R-[IV]-X-G}$  ein in Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen und Inositolhexakisphosphatkinasen konserviertes Motiv dar, dessen funktionelle Bedeutung für die Inositolphosphatbindung im Fall der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen im Rahmen dieser Arbeit experimentell belegt wurde. Bei der Betrachtung der Primärstrukturen der Inositolhexakisphosphatkinasen fällt ein ca. 30 Aminosäuren C-terminal des  $\text{S-}[\text{STA}]_3\text{-X-[LI]-G-[FV]-R-[IV]-X-G}$  – Motivs gelegener Bereich auf, welcher schwache (da auf wenige Aminosäuren beschränkte) Sequenzhomologie zu diesem Motiv aufweist (Consensus:  $[\text{ILV}]\text{-X}(0,1)\text{-G-F-[RK]}$ ); diese Homologie umfasst den bei den IP3K in die Inositolphosphatbindung involvierten Argininrest (R322 in GgIP3K-A).

Wie in Abbildung 4.10 dargestellt, lässt sich der fragliche Bereich der Inositolhexakisphosphatkinasen bei Einführung eines 6 Aminosäuren langen Gaps mit den Sequenzen der IP3Ks alignen (schwarz unterlegte Reste in Abb. 4.10). Die gezeigten Sequenzausschnitte der IP3K-Isoformen befinden sich ebenfalls ca. 30 Aminosäuren C-terminal des  $\text{S-}[\text{STA}]_3\text{-X-[LI]-G-[FV]-R-[IV]-X-G}$  – Motivs; gerade die dem Argininrest im putativen „zweiten GFR-Motiv“ entsprechende Position zeigt jedoch zwischen den Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen große Variabilität.

HsIP3K_C	584	LED <del>F</del> V <del>D</del> G <del>D</del> H <del>V</del> I <del>L</del> -----Q <del>K</del> Y <del>V</del> A <del>C</del> L <del>E</del> E <del>L</del> R	606
HsIP3K_B	841	F <del>R</del> E <del>F</del> T <del>K</del> G <del>N</del> H <del>N</del> I <del>L</del> -----I <del>A</del> Y <del>R</del> D <del>R</del> L <del>K</del> A <del>I</del> R	863
GgIP3K_A	350	F <del>V</del> E <del>F</del> I <del>E</del> G <del>N</del> T <del>T</del> I <del>L</del> -----K <del>K</del> Y <del>L</del> K <del>R</del> L <del>Q</del> E <del>I</del> H	372
HsIP3K_A	359	F <del>E</del> E <del>F</del> V <del>Q</del> G <del>D</del> E <del>E</del> V <del>L</del> -----R <del>R</del> Y <del>L</del> N <del>R</del> L <del>Q</del> Q <del>I</del> R	381
HsIP6K_2	278	R <del>K</del> L <del>S</del> V <del>Q</del> G <del>F</del> K <del>E</del> A <del>L</del> F <del>Q</del> F <del>F</del> H <del>N</del> G <del>R</del> Y <del>L</del> R <del>R</del> E <del>L</del> L <del>G</del> P	306
HsIP6K_1	282	R <del>G</del> L <del>S</del> I <del>E</del> G <del>F</del> R <del>N</del> A <del>L</del> Y <del>Q</del> Y <del>L</del> H <del>N</del> G <del>L</del> D <del>L</del> R <del>R</del> D <del>L</del> F <del>E</del> P	310
HsIP6K_3	273	R <del>K</del> L <del>S</del> V <del>E</del> G <del>F</del> R <del>Q</del> A <del>L</del> Y <del>Q</del> F <del>L</del> H <del>N</del> G <del>S</del> H <del>L</del> R <del>R</del> E <del>L</del> L <del>E</del> P	301
HsIP3K_A_1	324	S <del>S</del> T <del>T</del> L <del>-</del> G <del>F</del> R <del>I</del> E <del>G</del> I <del>K</del> K <del>A</del> D <del>G</del> S <del>C</del> S <del>T</del> D <del>F</del> K <del>T</del> T <del>R</del> S	351
		●	
GgIP3K_A_j		HHHH-----HHHH-----HHHH-----	
IP6K_2_j		-----HHHHHHHHHHHH-----HHHHHHHHHH	
HsIP3K_A_1		-----EEHHHHHH-----	

Abbildung 4.10: Lokales Alignment der IP3K-Isoformen A, B und C sowie der IP6K-Isoformen 1, 2 und 3 im Bereich des putativen „zweiten GFR“-Motivs der Inositolhexakisphosphatkinasen sowie mit dem S-[STA]<sub>3</sub>-X-[LI]-G-[FV]-R-[IV]-X-G – Motiv der HsIP3K-A. Durch schwarze Unterlegung hervorgehoben wurden zwischen den IP3K-A-Isoformen und den IP6K-2-Isoformen konservierte Bereiche; dunkelgrau unterlegt / weiße Schrift und zusätzlich gelb geboxt wurde die Homologie zum S-[STA]<sub>3</sub>-X-[LI]-G-[FV]-R-[IV]-X-G-Motiv (HsIP3K\_A\_1). Graue Unterlegung / schwarze Schrift kennzeichnet Identitäten bzw. homologe Ersetzungen innerhalb der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen bzw. Inositolhexakisphosphatkinasen. Der Punkt kennzeichnet die Position des bei den IP3K in die Inositolphosphatbindung involvierten Argininrestes im S-[STA]<sub>3</sub>-X-[LI]-G-[FV]-R-[IV]-X-G-Motiv.

Die Konservierung zwischen den IP6K-Isoformen und die vergleichsweise starke Variabilität der entsprechenden IP3K-Sequenzen (vgl. die ausgeprägte Konservierung der inositolphosphatbindenden core Domäne in Abb. 4.4) weisen auf eine IP6K-spezifische Funktion dieses Bereichs hin. Eine mögliche Modellvorstellung wäre die Existenz von zwei funktionalen [ILV]-X(0,1)-G-F-[RK] – Motiven in den IP6K. Während das zweite Motiv in den phylogenetisch älteren Inositolhexakisphosphatkinasen [Saiardi et al., 1999] zur hochaffinen Bindung des hochphosphorylierten InsP<sub>6</sub> benötigt werden könnte (und somit unter evolutivem Druck zur Erhaltung des Bindungsmotivs auf Sequenzebene steht), könnte zur im wesentlichen über die Erkennung der vicinalen äquatorialen Phosphatgruppen an C4 und C5 vermittelten Bindung des Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> durch IP3K-Isoformen [Van Dijken et al., 1994] lediglich eines der beiden Motive genügen.

Der Selektionsdruck auf das entsprechende, für die Funktion des Enzyms nicht essentielle Sequenzmotiv wäre dadurch vermindert, was mit einer divergenten Evolution dieses Bereichs in verschiedenen IP3K-Isoformen korrelieren könnte.

### ***Inositolpolyphosphatmultikinase: eine IP6K-Variation mit IP3K-ähnlicher Substratselektivität ?***

Wie aus der schematischen Darstellung 4.6 ersichtlich, ähnelt die *mammalia* Inositolphosphatmultikinase in ihrem Aufbau mehr den Inositolhexakisphosphatkinasen als den Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen. Die ca. 420 Aminosäurereste umfassenden Proteine besitzen keine Calmodulin-Bindungsdomäne; im Bereich des PDKG-Motivs (Abb. 4.7) als auch des in den IPMK modifiziert vorliegenden [IL]-G-[FV]-R-Motivs (Abb. 4.8) sind ausgeprägtere Sequenzidentitäten zwischen IPMK und IP6K als zwischen IPMK und IP3K zu beobachten. Der Abstand zwischen diesen beiden Motiven in der IPMK-Primärstruktur entspricht ihrem Abstand in der IP6K-Primärstruktur; in den IP3K ist diese Distanz mehr als doppelt so groß und beinhaltet den zur Inositolphosphatbindungsdomäne des Inositol 1,4,5-trisphosphat-Rezeptors homologen Sequenzbereich. Eine solche IP3R-Homologie kann in den Inositolhexakisphosphatkinasen und Inositolpolyphosphatmultikinasen nicht klar definiert werden. Auch in dem direkt C-terminal an das [IL]-G-[FV]-R-Motiv anschließenden, sich bis zum SSSL-Motiv erstreckenden Sequenzbereich weisen IPMK und IP6K deutlich höhere Sequenzidentität zueinander auf (Abb. 4.11); der Bereich ist jedoch nur schwach konserviert zwischen IP3K und IP6K (vgl. Abb. 4.10) bzw. IP3K und IPMK. Funktionell stellt die Fähigkeit zur Katalyse der Ausbildung energiereicher Phosphorsäureanhydridbindungen ein gemeinsames, nicht von den Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen geteiltes Charakteristikum der Inositolphosphatmultikinasen sowie der Inositolhexakisphosphatkinasen dar.

HsIPMK	196	QHYGRSLTKETIKDGVSRFFHNGYCLRKDAVAASIQKTEKIL	237
HsIP6K_2	274	KYHGRKLSVQGFKEALFQFFHNGRYLRRELLGPVLEKLTTELK	313
HsIP6K_1	278	KYYGRGLSIEGFRNALYQYLHNGLDLRRDLFEPILSKLRGLK	319
HsIP6K_3	269	KYYGRKLSVEGFRQALYQFLHNGSHLRRELLLEPIIHQIRALL	310
HsIP6K_2_j		-----HHHHHHHHHHHH-----HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	
HsIPMK_j		-----HHHHHHHHHHHH-----HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	

Abbildung 4.11: Lokales Alignment der HsIPMK und der drei Isoformen der humanen IP6K im Bereich zwischen dem in der IPMK modifiziert vorliegenden [IL]-G-[FV]-R-Motiv und dem SSSL-Motiv. Schwarz unterlegt: identischer Rest in IPMK und allen IP6K-Isoformen; dunkelgrau unterlegt: identischer Rest oder konservativer Austausch in IPMK und allen IP6K-Isoformen; hellgrau unterlegt: identischer Rest oder konservativer Austausch in IPMK und mindestens zwei IP6K-Isoformen. Das in den IP6K, nicht aber der IPMK konservierte [VI]-[QE]-G-F-[RK]-Motiv (vgl. Abb. 4.10) wurde geboxt.

Wie in Abbildung 4.11 gezeigt, ist trotz der Konservierung des betrachteten Sequenzabschnittes zwischen den IP6K und der IPMK das [VI]-[QE]-G-F-[RK]-Motiv nicht in der IPMK vorhanden. Sollte sich die im vorhergehenden Abschnitt diskutierte Hypothese zur Funktionalität dieses Motivs in den IP6K im Experiment bestätigen lassen, könnte der Wegfall dieses Motivs in der IPMK einen möglichen Erklärungsansatz für die veränderte Substratselektivität der Inositolphosphatmultikinase bieten.

### 4.3 Phosphatidylinositol 3-Kinasen und Proteinkinasen als Referenzstrukturen für Inositolphosphatkinasen der PDKG-Kinase-Familie

**Das für die Katalyse des Phosphat-Transfers essentielle DF[GA]-Motiv ist konserviert zwischen den Proteinkinasen, Phosphatidylinositol 3-Kinasen und Inositolphosphatkinasen**

Wie in Abb. 4.6 dargestellt, ist ein weiteres, allen Kinasen der PDKG-Kinase-Familie gemeinsames Merkmal das im extremen C-Terminus in der katalytischen Domäne gelegene DF[GA]-Motiv. Ein Alignment dieser Sequenzbereiche in den IP3K, IP6K und IPMK zeigt die Abbildung 4.12.

GgIP3K_A	399	GNANVWLIDFGKTTLLPD	416
HsIP3K_A	408	HRAGVWLIDFGKTTPLPD	425
HsIP3K_B	889	EQAKVWMIDFGKTTPLPE	906
HsIP3K_C	633	GLAKVWMIDFGKTVALPD	650
HsIP6K_1	391	PKVDVRMIDFAHSTFKGF	408
HsIP6K_2	375	SSVDVRMIDFAHTTCRLY	392
HsIP6K_3	361	TKVDIRMIDFAHTTYKGY	378
HsIPMK	377	AEVEVRMIDFAHVFPST	394

Abbildung 4.12: Lokales Alignment der 3 Isoformen der IP3K, der 3 Isoformen der IP6K und der IPMK im Bereich des DF[GA]-Motivs. Schwarz unterlegt: identischer Rest in allen Sequenzen; dunkelgrau unterlegt: identischer Rest oder konservativer Austausch in allen Sequenzen; hellgrau unterlegt: identischer Rest oder konservativer Austausch in den meisten Isoformen. Der für die Katalyse essentielle Aspartatrest wurde durch einen roten Pfeil gekennzeichnet.

Das DFG-Motiv ist jedoch nicht nur innerhalb der PDKG-Kinase-Familie der Inositolphosphatkinasen konserviert; vielmehr ist es ein strukturell und funktionell gut charakterisiertes Consensus-Motiv der Proteinkinasen. Das Alignment in Abb. 4.13 zeigt das Vorkommen des DFG-Motivs sowohl in Serin/Threonin-Kinasen wie Phosphorylase Kinase und Proteinkinase A als auch in Tyrosinkinase wie Lck. Darüber hinaus besitzt auch die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), die neben ihrer Lipidkinase- auch Proteinkinaseaktivität aufweist [Stack et al., 1994] und deren dreidimensionale Struktur deutliche Ähnlichkeiten zur Faltung der Proteinkinasen zeigt (siehe Abb. 4.14), ein DFG-Motiv. Ein Vergleich der für die in dem Alignment gezeigten Proteinkinasen und die PI3K aus den in der Protein Data Bank (PDB) abgelegten Kristallstrukturen entnommenen Sekundärstrukturen mit der Jpred-Vorhersage der GgIP3K-A-Sekundärstruktur zeigt klare Übereinstimmungen. Die räumlichen Strukturen der entsprechenden Bereiche der Phosphorylase Kinase und der Phosphatidylinositol 3-Kinase  $\gamma$  sind in Abb. 4.14 zu ersehen.

GgIP3K_A	391	LLFVHDGSGNANVWLIDFGKTTLLP	415
SsPI3Kg	948	HNDNIMISETGNIHFHIDFGHILGNY	972
OcPhK	151	KPENILLDDDMNIKLTDFGFSCQLD	175
BtPKA	168	KPENLLIDQQGYIQVTDFGFQAKRVK	192
HsLck	136	RAANILVSDTLSCKIADFGGLARLIE	160
GgIP3K_A_j		EEEE-----EEEEEE-----	
SsPI3Kg_s		----EEEE----EEE-----	
OcPhK_s		----EEE-----EEE-----EE--	
BtPKA_s		-----EE-----EEE-----EE--	
HsLck_s		----EEE-----EEE-----EE--	

Abbildung 4.13: Lokales Alignment des das konservierte DFG-Motiv enthaltenden Sequenzbereiches. Verglichen wurden die Sequenzen der GgIP3K-A, der Phosphatidylinositol 3-Kinase  $\gamma$  aus *Sus scrofa* (1E8X), der Phosphorylasekinase aus *Oryctolagus cuniculus* (PDB: 1QL6), der Proteinkinase A aus *Bos taurus* (1STC) und der humanen Lck (1QPJ). Die mit Jpred erstellte Sekundärstrukturvorhersage (j) für die GgIP3K-A wurde den aus den aus der PDB entnommenen, experimentell bestimmten Sekundärstrukturen (s) der anderen Kinasen gegenübergestellt.

Die Analyse zahlreicher, durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärter Proteinkinase-Strukturen (z.B. Phosphorylase Kinase: [Lowe et al., 1997]; Review: [Johnson et al., 1998]) demonstriert die funktionelle Bedeutung des im DFG-Motiv enthaltenen Aspartatrestes. [Skamnaki et al., 1999] zeigten anhand des ternären Komplexes aus Phosphorylase Kinase, einem Peptidsubstrat und dem nicht hydrolysierbaren ATP-Analogon AMPPNP (Adenylymidodiphosphat) die essentielle Funktion der Carboxylgruppe des D167 (vgl. Abb. 4.13) für die koordinative Bindung beider Metallionen des AMPPNP/Mn<sup>2+</sup> und somit für die korrekte Positionierung des Nukleotidanalogs in der Bindungstasche des Enzyms. In der *Sus scrofa* Phosphatidylinositol 3-Kinase  $\gamma$  wird diese Funktion von D964 erfüllt [Walker et al., 1999]. Die Phosphatidylinositol 3-Kinase der Hefe, das Protein Vps34p, wird durch die Mutation des entsprechenden Aspartatrestes D749 zu Arginin komplett inaktiviert [Stack et al., 1994]; Mutation des entsprechenden Aspartatrestes der Tyrosinkinase v-fps zu Glutamat oder Asparagin resultierte ebenfalls in einer kompletten Inaktivierung des Enzyms [Moran et al., 1988]; gleiches wurde von [Communi et al., 1993] für die Mutation D414N der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform A aus Ratte beobachtet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte dieses Resultat noch einmal an der GgIP3K-A reproduziert werden (Mutante D407S). Diese Betrachtungen zeigen, dass zumindest Teilaspekte der bei den Proteinkinasen realisierten Substratbindungs- und Katalysemeechanismen in analoger Form auch in der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase verwirklicht sind. In den nachfolgenden Abschnitten wird diskutiert, in welcher Hinsicht die in dieser Arbeit beschriebenen Resultate Hinweise auf eventuelle weitere strukturelle und regulatorische Ähnlichkeiten zwischen der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase und den bekannten Strukturen der Proteinkinasen bzw. der Phosphatidylinositol 3-Kinase geben können.

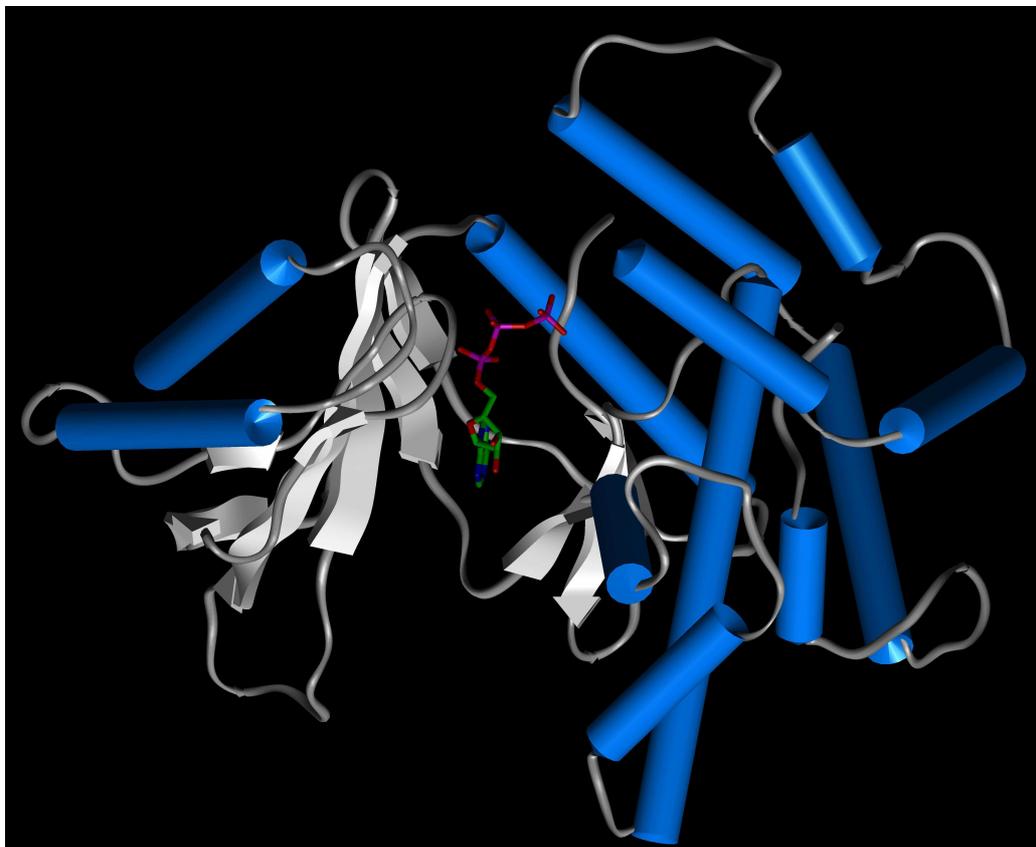
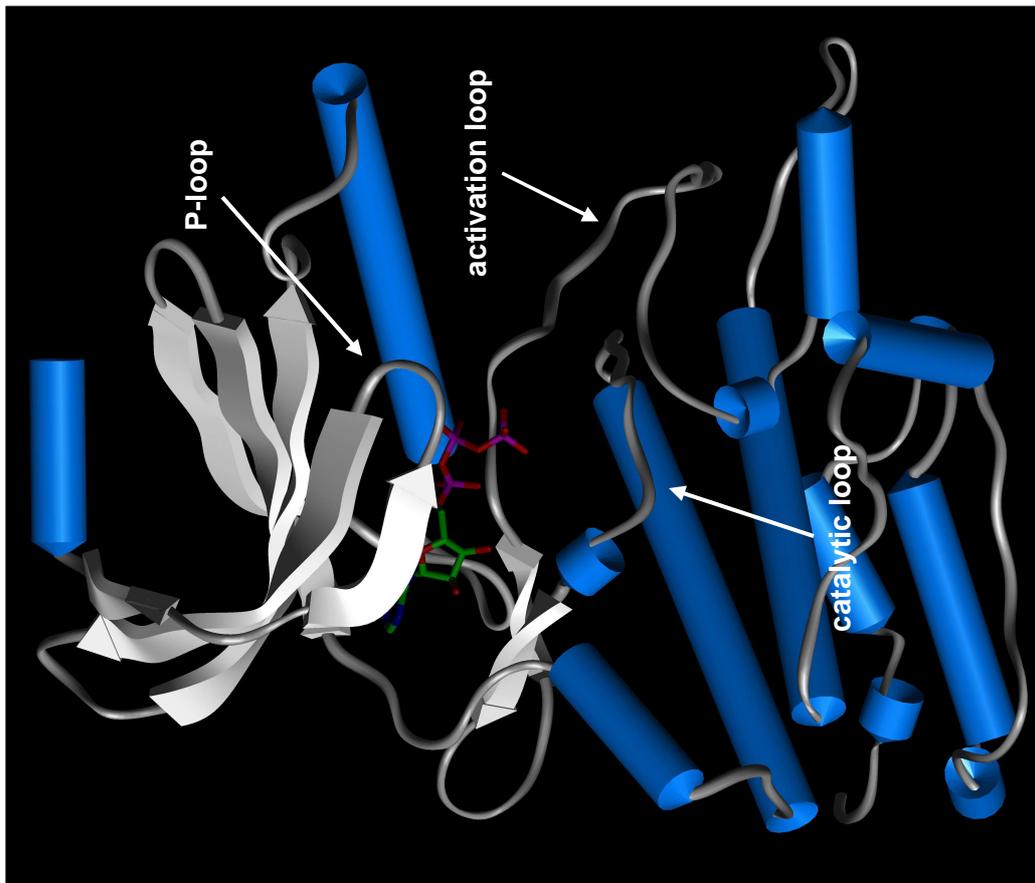


Abbildung 4.14: Vergleich der Strukturen der Phosphatidylinositol 3-Kinase  $\gamma$  (1E8X) und der Phosphorylase Kinase (1QL6) im Komplex mit ATP bzw. AMPPNP.

### ***Proteinkinasen und Phosphatidylinositol 3-Kinase $\gamma$ zeigen strukturelle und funktionelle Homologien***

Abbildung 4.14 bietet einen Vergleich der durch Röntgenstrukturanalyse erhaltenen Strukturen der katalytischen Domänen der Phosphorylase Kinase [PDB:1QL6; Johnson et al., 1998]; und der Phosphatidylinositol 3-Kinase  $\gamma$  [PDB:1E8X; Walker et al., 1999] im Komplex mit ATP (1E8X) bzw. dem nichthydrolysierbaren Analogon AMPPNP (1QL6). Trotz der geringen, sich im Wesentlichen auf das DFG-Motiv beschränkenden Sequenzhomologie dieser Proteine lassen sich einige beiden Strukturen gemeinsame Charakteristika klar herausarbeiten [Grishin, 1999].

Die katalytische Domäne beider Enzyme besteht aus zwei voneinander differenzierbaren Einheiten. Die kleinere, den N-terminalen Sequenzanteil der katalytischen Domäne umfassende Einheit (**N-lobe**) ist strukturell durch das Vorhandensein eines aus fünf antiparallelen beta-Strängen gebildeten beta-Faltblatts charakterisiert; der vom N-lobe durch eine sogenannte **hinge-Region** getrennte **C-lobe** weist dagegen einen hohen alpha-helikalen Anteil auf. Die Funktion des in die korrekte Lokalisierung der Phosphate des Nukleotids involvierten **glycine loops (P-loops)** der Proteinkinasen übernimmt in der Phosphatidylinositol 3-Kinase der  $\beta 3$ - $\beta 4$ -loop, dessen Sequenz jedoch nicht der glycinreichen Proteinkinase-P-loop-Consensussequenz entspricht. Dem **DFG-Motiv** geht in beiden Kinasen eine charakteristische, aus zwei antiparallelen beta-Strängen gebildete beta-Faltblattstruktur voraus (siehe auch Abb. 4.13). Direkt C-terminal an das DFG-Motiv schließt sich in den Proteinkinasen der **activation loop** an; dieser stark Lösungsmittel exponierte Bereich liegt in Strukturen ohne Peptidsubstrat häufig ungeordnet vor. Bei durch Phosphorylierung aktivierten Proteinkinasen (z.B. CDK2) ist der zu phosphorylierende Rest innerhalb des activation loops lokalisiert. Auch in der PI3K-Struktur schließt sich C-terminal an das DFG-Motiv ein ungeordneter (und aus diesem Grund keine Elektronendichte liefernder) Bereich an. N-terminal der dem DFG-Motiv vorausgehenden beta-Faltblattstruktur liegt bei den Proteinkinasen der **catalytic loop**. In diesem Bereich sind für die Katalyse essentielle Aminosäurereste lokalisiert, so z.B. das vermutlich direkt in die Katalyse des Phosphattransfers eingebundene D146 der Phosphorylase Kinase [Skamnaki et al., 1999]. Mutationen von Aminosäureresten im entsprechenden Bereich der Phosphatidylinositol 3-Kinase führen ebenfalls zur Inaktivierung des Enzyms: Die Mutanten D371A, D735K als auch N736V der *Saccharomyces cerevisiae* PI3K Vps34p sind katalytisch inaktiv [Stack et al., 1994]; ebenso die Mutation R916P der *Bos taurus* PI3K [Dhand et al., 1994]. Die entsprechenden Aminosäurereste in der Struktur der hier näher betrachteten *Sus scrofa* PI3K $\gamma$  sind D946, D950, N951 und R947 (siehe Abb. 4.15).

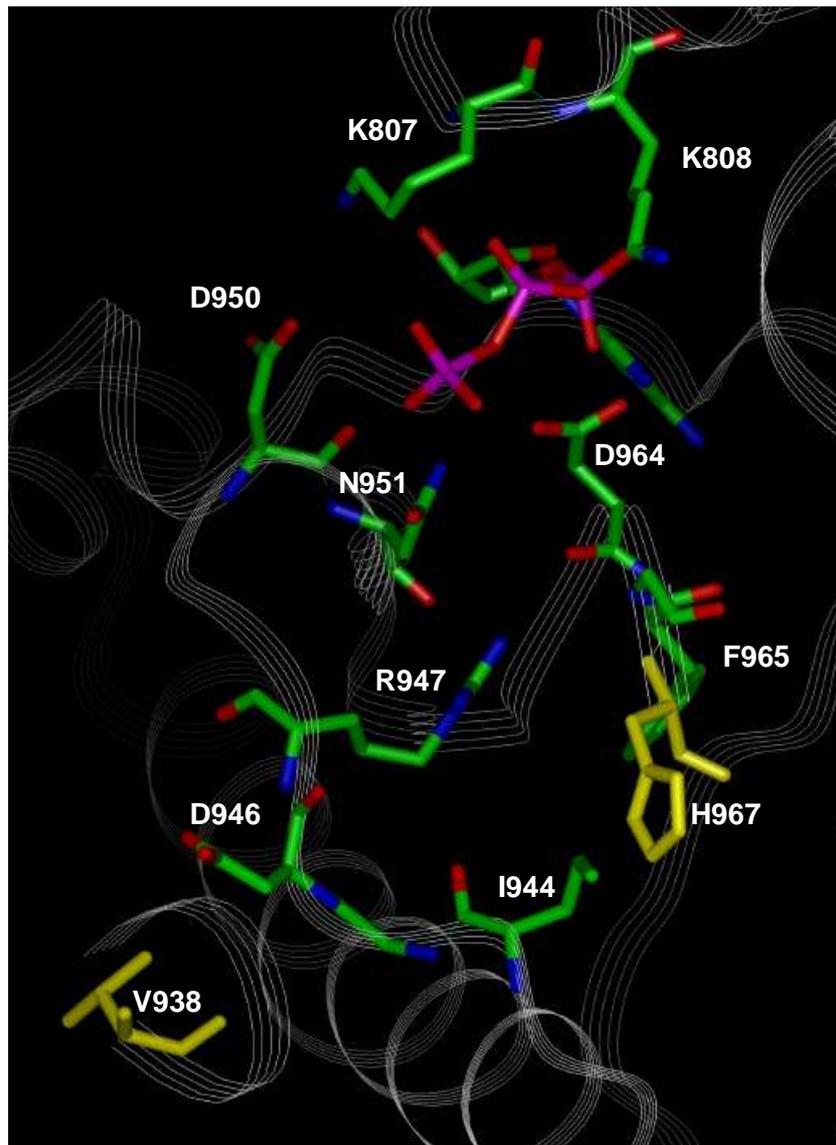


Abbildung 4.15: Detailansicht der Struktur des aktiven Zentrums der SsPI3K $\gamma$  im Komplex mit ATP (PDB:1E8X). Der 15 Aminosäuren umfassende Bereich zwischen den gelb dargestellten Aminosäuren H967 und V938 lieferte wegen großer Flexibilität keine Elektronendichte [Walker et al., 1999].

***Ein in die Phosphatidylinositolbindung involvierter Sequenzbereich im catalytic loop der PI3K $\gamma$  zeigt Homologie zum [LI] – G – [FV] – R – Motiv der Inositolphosphatkinasen***

Abb. 4.15 zeigt eine Detailansicht des in die Substratbindung involvierten Bereiches der katalytischen Domäne der Phosphatidylinositol 3-Kinase  $\gamma$  im Komplex mit Adenosintriphosphat [PDB: 1E8X, Walker et al., 1999]. Da es nicht gelang, nach Soaken der erhaltenen Kristalle mit Phospholipidanaloga Strukturen zu generieren, die auch die Position des zweiten Substrates erkennen lassen, wurde von [Walker et al., 1999] die hydrophile Kopfgruppe des PI3K-Substrats Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat, das Inositol 1,4,5-trisphosphat, in die aus der Struktur 1E8X ableitbare Bindungstasche modelliert. Im Rahmen dieses Modells wird das Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> in dem durch die C-terminale Helix, den catalytic loop und den (in der Kristallstruktur aufgrund hoher Flexibilität nicht sichtbaren) activation loop begrenzten Bereich gebunden; die Phosphatgruppe an Position D1 interagiert mit den zum P-loop zählenden Aminosäuren K807 und K808, die Phosphatgruppe an Position D4 mit dem R947 des catalytic loop. Des Weiteren wird eine Wechselwirkung des im activation loop lokalisierten K973 mit den Phosphatgruppen an D5 und D4 postuliert. Ob diese Modellvorstellung jedoch, zumindest approximativ, den tatsächlich in der Struktur des ternären Komplexes aus PI3K $\gamma$ , ATP und Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> realisierten Gegebenheiten entspricht, ist fraglich, da für eine große Anzahl der strukturell verwandten Proteinkinasen eine durch die Substratbindung induzierte, teilweise nicht unbeträchtliche strukturelle Veränderung insbesondere der relativen Orientierung des N- und des C-lobes beschrieben wurde [Review: Johnson et al., 1998]. Ein solcher, durch die Bindung des Substrates PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (bzw. des Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>) initiiertes induced-fit-Mechanismus könnte auch in der Phosphatidylinositol 3-Kinase realisiert sein, was signifikante Unterschiede in der Struktur des aktiven Zentrums des Enzyms im Inositolphosphatgebundenen gegenüber dem Inositolphosphatungebundenen Zustand bedingen würde.

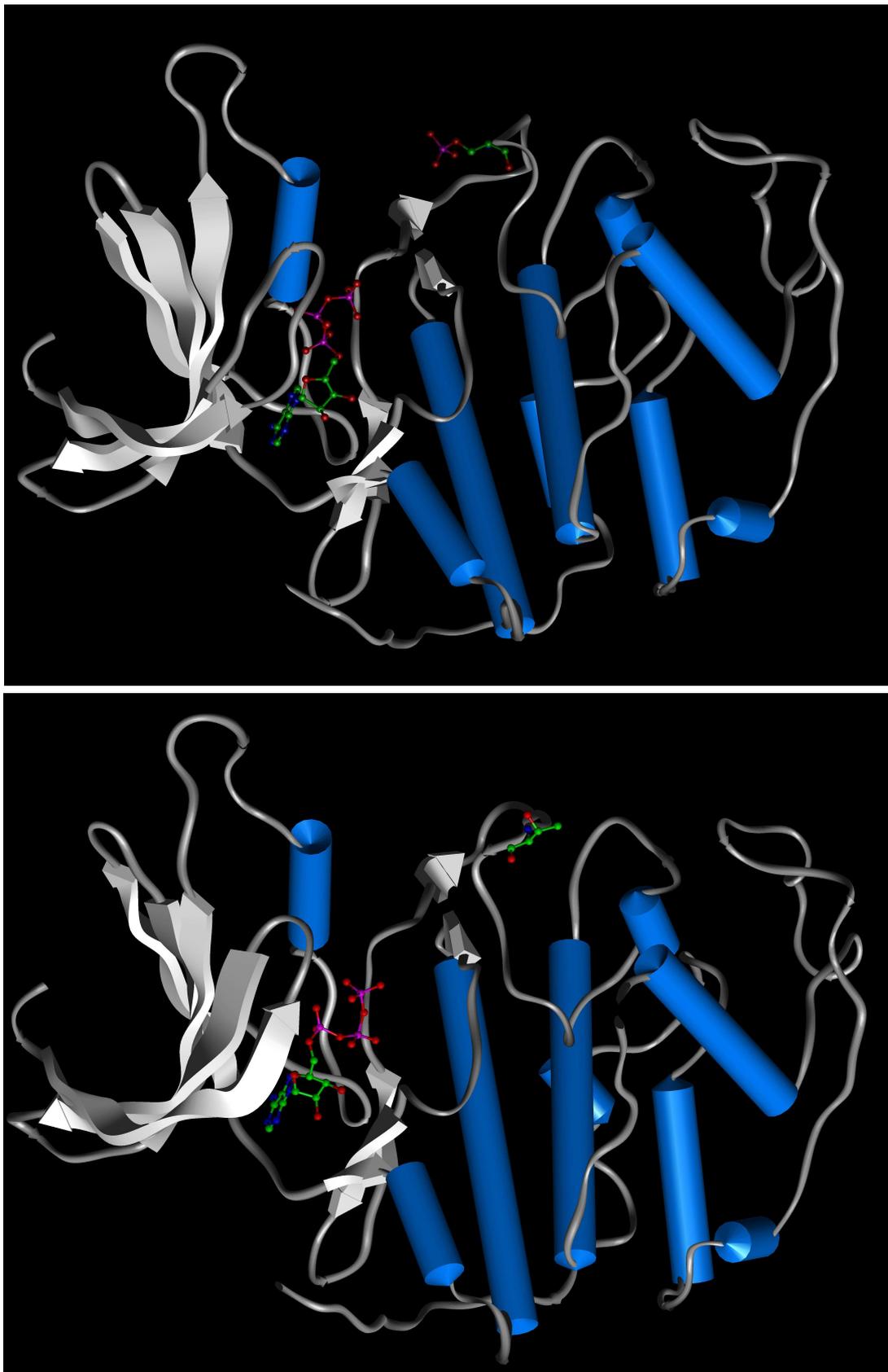
Die Bedeutung des im Rahmen des oben beschriebenen Modells von [Walker et al., 1999] mit der Phosphatgruppe an D4 wechselwirkenden Argininrestes R947 wurde, wie oben beschrieben, bereits in Mutagenesestudien von [Dhand et al., 1994] deutlich. Der das R947 umfassende Sequenzbereich ist zwischen den verschiedenen PI3K-Isoformen stark konserviert und zeigt schwache Homologie zu dem in Kapitel 4.2 diskutierten [LI] – G – [FV] – R – Consensus-Motiv der Inositolphosphatkinasen der PDKG-Familie (siehe Abb. 4.16). Dabei entspricht der im Rahmen dieser Arbeit als in die Inositolphosphatbindung involvierter Rest identifizierte Argininrest R322 der GgIP3K-A dem R947 der SsPI3K $\gamma$ . Die wie im Falle des DFG-Motivs auf wenige Aminosäurereste beschränkte Primärstruktur-Homologie wird somit auch hier auf funktioneller Ebene bestätigt.

GgIP3K_A	311	ETIS	SSANL	GFRI	EGIK	327
HsIP3K_B	801	ETIS	STATL	GFRI	EGIK	817
HsIP3K_C	545	ETMS	STSTL	GFRI	EGIK	561
HsPI3K_a	905	CVAT	FILGI	GDRH	SNSI	921
HsPI3K_b	909	CVAS	YVLGI	GDRH	SDNI	925
SsPI3K_g	936	CVAT	FVLGI	GDRH	NDNI	952
HsPI3K_d	883	CVAT	YVLGI	GDRH	SDNI	899
ScVps34	733	CVIT	YILGV	GDRH	LDNL	749

Abbildung 4.16: Lokales Alignment des [LI] – G – [FV] – R – Consensus-Motivs der Inositolphosphatkinasen mit einem funktionell wichtigen Bereich des catalytic loop der Phosphatidylinositol 3-Kinasen. Verglichen wurden die Sequenzen der IP3K-Isoformen A, B und C mit den PI3K-Isoformen  $\alpha$ (a),  $\beta$ (b),  $\gamma$ (g) und  $\delta$ (d). Der sowohl in den IP3K, als auch in den PI3K in die Bindung des Inositolphosphates/Phosphatidylinositols involvierte Argininrest (R322 in GgIP3K-A, R947 in SsPI3K $\gamma$ ) wurde durch einen roten Pfeil gekennzeichnet.

### ***Ein funktionell Proteinkinase-ähnlicher activation loop in den Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen ?***

Die Phosphorylierung von Serin- oder Threoninresten im Bereich des oben beschriebenen activation loops ist ein wesentlicher Regulationsmechanismus von Proteinkinaseaktivitäten [Review: Johnson et al., 1998]. Ein klassisches Beispiel für eine solche aktivierende kovalente Modifikation stellt die CAK (cdk-activating kinase)-katalysierte Phosphorylierung der in die Zellzyklusregulation involvierten Serin-/Threonin-Proteinkinase CDK2 (cyclin dependent kinase 2) an dem Threoninrest T160 dar. [Russo et al., 1996] demonstrierten anhand der Kristallstruktur des Komplexes aus phosphorylierter CDK2, der regulatorischen Untereinheit Cyclin A und ATP (PDB: 1JST), dass die Phosphorylierung eine Verlagerung des activation loops um eine Distanz von 7 Å und strukturelle Veränderungen der putativen Substratbindungsdomäne bedingt (Abb. 4.17). Von [Hagopian et al., 2001] wurden hingegen die kinetischen Konsequenzen dieser Modifikation untersucht. Es wurde eine durch die Phosphorylierung bedingte Steigerung der  $k_{\text{kat}}$  um den Faktor 843 bei einem gleichzeitigen Absinken des  $K_{\text{m}}$ -Wertes für das Peptid-Substrat um den Faktor 137 gemessen; die katalytische Effizienz  $k_{\text{kat}}/K_{\text{m}(\text{peptide})}$  des Enzyms wird somit durch die Phosphorylierung ca. um den Faktor  $10^6$  gesteigert.



1JST

1FIN

Abbildung 4.17: Vergleich der Strukturen der unphosphorylierten (PDB: 1FIN) sowie der an T160 phosphorylierten (PDB: 1JST) Cyclin dependent kinase 2 (CDK2) im Komplex mit ATP. Der Threonin- bzw. Phosphothreoninrest wurde jeweils hervorgehoben.

Der Phosphorylierungs-mediierte Aktivierungsmechanismus der Proteinkinasen ähnelt in einigen Punkten der bei den Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinasen vorliegenden Situation. Durch die CaMKII-katalysierten Phosphorylierung der HsIP3K-A an T311 ([Communi et al., 1997]; siehe auch Kapitel 4.1) kommt es zu einer Steigerung der  $k_{\text{kat}}$ , wenn auch nur um den Faktor 8 – 10. Darüber hinaus legen die durch limitierte tryptische Proteolyse [Bertsch et al., 2000] gewonnenen Resultate eine Lokalisation des entsprechenden Threoninrestes (T302 in GgIP3K-A, siehe Abb. 4.4) in einem in Abwesenheit von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> leicht zugänglichen (und somit Protease-suszeptiblen) (Loop-?)Bereich nahe, welcher jedoch durch die Anwesenheit des Inositolphosphats entweder direkt blockiert wird oder aber durch sterische Veränderungen des Proteins in eine geschützte Position gelangt. Die Mutation des der Phosphorylierungsstelle direkt benachbarten Lysinrestes K303 zu Glutamin resultierte in einer Verringerung der  $k_{\text{kat}}$  um den Faktor 4, einer Erhöhung des apparenten  $K_m$  – Wertes für Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> um den Faktor 18 und somit in einer Verringerung der katalytischen Effizienz um den Faktor 72. [Skamnaki et al., 1999] zeigten, dass Aminosäurereste des activation loops der Phosphorylase Kinase über Wasserstoffbrückenbindungen und ionische Wechselwirkungen mit Resten des katalytischen Zentrums der Kinase wechselwirken; Mutationen an solchen Positionen resultierten in einer Abnahme der  $k_{\text{kat}}$ , einer Zunahme der  $K_m$ -Werte für beide Substrate und infolgedessen zu einer Abnahme der katalytischen Effizienz  $k_{\text{kat}}/K_m$  der mutierten Enzyme.

### ***Proteinkinasen als Referenzstrukturen für die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase ?***

Wie in den vorausgehenden Abschnitten diskutiert, geben die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Resultate Hinweise auf funktionelle wie strukturelle Gemeinsamkeiten zwischen den Inositol 1,4,5,-trisphosphat 3-Kinasen und den Proteinkinasen, denen letztendlich auch die Phosphatidylinositol 3-Kinasen zuzurechnen sind. Hier werden die bereits angeführten Punkte noch einmal zusammengefasst und durch einige weitere, aus den Ergebnissen anderer Arbeiten zu entnehmende Punkte ergänzt.

Die katalytische Domäne der Proteinkinasen umfasst ca. 270 Aminosäuren [Johnson et al., 1998]; dies entspricht genau der Größe des von [Togashi et al., 1997] durch Deletionsstudien identifizierten minimalen, noch katalytisch aktiven Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase-Fragments. In den genannten Experimenten führte die N-terminale Deletion eines 20 Aminosäurereste umfassenden Bereiches, welcher 4 Glycinreste, 5 Serin- bzw. Threoninreste und 3 Alaninreste sowie einen Lysinrest beinhaltet, zu einem vollständigen Verlust der katalytischen Aktivität; Mutation des Lysinrestes (K197 in der RnIP3K-A) zu Isoleucin resultierte in einer verringerten spezifischen Aktivität sowie einem erhöhten  $K_m$  – Wert für ATP des mutierten Enzyms. In den Proteinkinasen erfolgt die Bindung des Substrates ATP unter Beteiligung des häufig glycinreichen P-loops (aus diesem Grund auch als **Glycine-loop** bezeichnet); die-

ser liegt ebenfalls in unmittelbarer Nähe der N-terminalen Begrenzung des minimalen, katalytisch noch aktiven Fragments. Neben einem vermutlich funktionell dem Glycine-loop der Proteinkinasen entsprechenden Bereich besitzen die Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen wie oben ausführlich diskutiert ein funktionelles **DFG-Motiv** in einem gemäß den Jpred-Sekundärstrukturvorhersagen ähnlichen strukturellen Kontext wie das entsprechende, zwischen den verschiedenen Proteinkinasen hochkonservierte Motiv. Der **catalytic loop** der Phosphatidylinositol 3-Kinase zeigt Homologie zu den Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen sowohl auf Ebene der Primärstruktur als auch in funktioneller Hinsicht. Durch Phosphorylierung eines in einem in Abwesenheit von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  stark exponierten Loopbereiches lokalisierten Threoninrestes kann die Aktivität der IP3K-Isoform A gesteigert werden; dieser Mechanismus entspricht der Aktivierung von Proteinkinasen durch Phosphorylierungen von Serin- bzw. Threoninresten des **activation loops**.

Die nur geringen Homologien auf Ebene der Primärstruktur sprechen nicht gegen eine Proteinkinase-ähnliche Faltung der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen, da auch innerhalb der Familie der Serin/Threonin-Proteinkinasen bei im Wesentlichen gleicher struktureller Organisation die Aminosäuresequenzen stark variieren. So besitzt z.B. die von [Yamaguchi et al., 2001] kristallisierte Serin/Threonin-Proteinkinasedomäne [Runnels et al., 2001] der Trp-Kanal-Isoform LTRPC7 [Cahalan, 2001] keine signifikante Sequenzhomologie zu den klassischen eukaryotischen Serin/Threonin-Proteinkinasen; selbst das in allen sonst bekannten Proteinkinasen konservierte DFG-Motiv fehlt. Dennoch ergab die Kristallstrukturanalyse des Moleküls eine zwar in einigen Einzelheiten abweichende, aber im Wesentlichen der Proteinkinase-Faltung entsprechende Struktur (Abb. 4.18), in der insbesondere ein dem glycine-loop entsprechender Bereich sowie (trotz der Abwesenheit des DFG-Consensus-Motivs !) die charakteristische, in den Proteinkinasen dem DFG-Motiv vorausgehende Faltblatt-Struktur zu erkennen ist.

Zusammenfassend ergeben sich somit zahlreiche Hinweise auf eine Proteinkinase-ähnliche, strukturelle und funktionelle Organisation der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen.

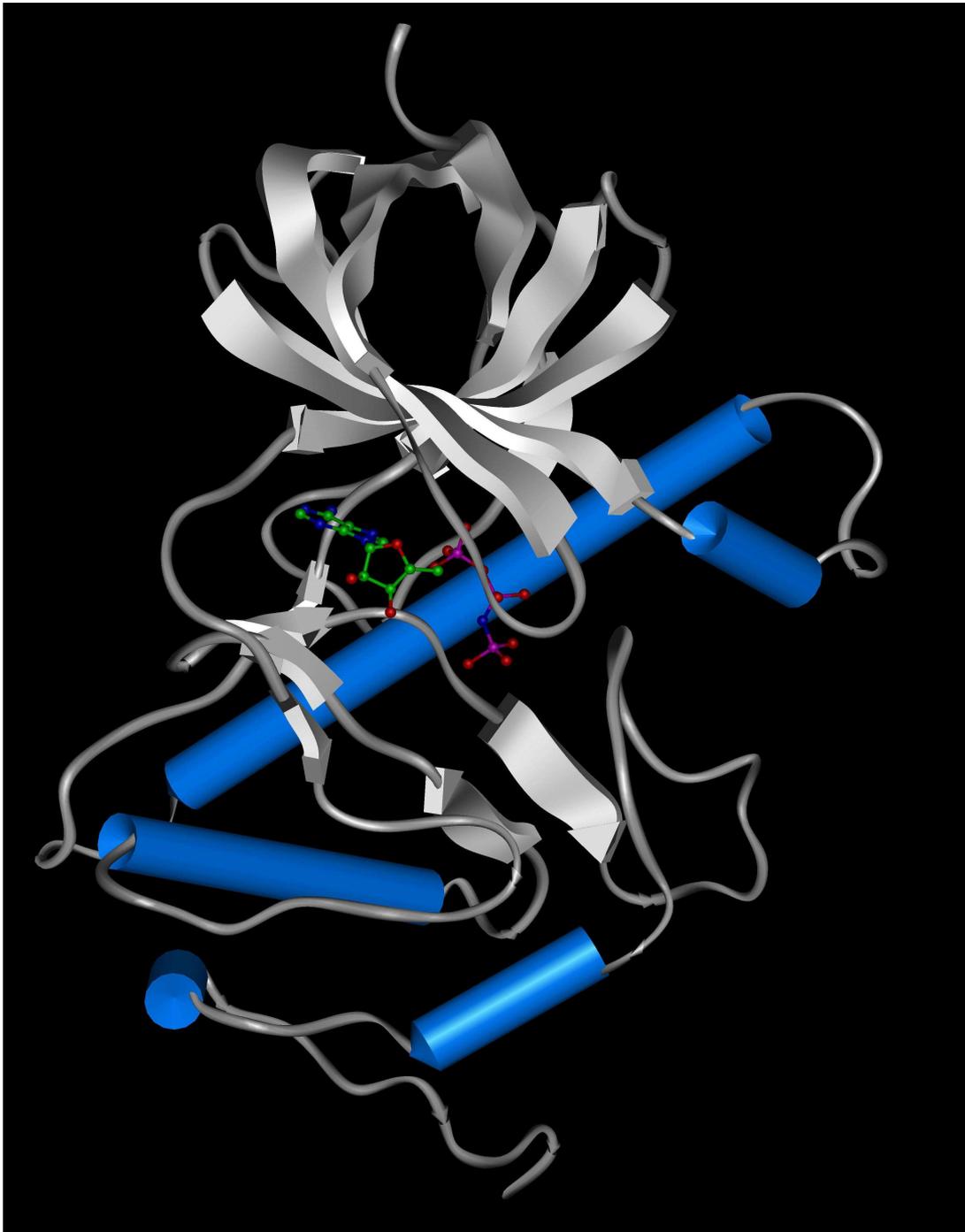


Abbildung 4.18: Struktur der Chak-Proteinkinase im Komplex mit dem nichthydrolysierbaren ATP-Analogon Adenylylimidodiphosphat (Ampnp); PDB: 1IA9

#### 4.4 Saturation Transfer Difference NMR – Untersuchungen der Interaktion zwischen Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> und Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase in Kombination mit enzymkinetischen Daten: Charakterisierung der durch gezielte Mutationen induzierten Veränderungen der Inositolphosphatbindung

Im Abschnitt 3.7 wurden die Resultate von STD-NMR-Experimenten zur Untersuchung der Interaktion von wt- und gezielt mutierter GgIP3K-A mit Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> dargelegt. Hier sollen diese Ergebnisse in Beziehung zu in der Literatur beschriebenen Charakteristika der Interaktion zwischen IP3K und Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> gesetzt und im Kontext der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen enzymatischen Daten für die GgIP3K-A-Mutanten R276L und R322L diskutiert werden.

##### ***Die Interaktion von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> mit wt-GgIP3K-A: Active site mapping durch STD-NMR***

Die STD-NMR-spektroskopische Untersuchung des Systems wt-GgIP3K-A / Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> zeigte, dass bei allen betrachteten Sättigungszeiten und Ligandenkonzentrationen die höchsten STD-Amplifikationsfaktoren (STDAF) von den Protonen H2 und H4 erreicht wurden, während das Proton H3 stets den niedrigsten STDAF aufwies. Die Signale der Protonen H1, H5 und H6 konnten nicht einzeln aufgelöst werden, aus diesem Grund wurde lediglich der STDAF des aus der Überlagerung resultierenden Gesamtsignals bestimmt. Dieser einer Mittelung der STD-Amplifikationsfaktoren der Einzelsignale entsprechende Wert lag stets zwischen den STD-Amplifikationsfaktoren der Protonen H2 bzw. H4 und H3 (siehe z.B. Tabelle 3.8).

Der niedrige STDAF des **Protons H3** weist auf einen größeren Abstand dieses Protons von der Proteinoberfläche hin. Diese Annahme wird bestärkt durch den flachen Verlauf der Kurve STDAF<sub>H3</sub> (t<sub>sat</sub>): erst bei langen Sättigungszeiten wird der Maximalwert der Sättigung erreicht. In der Tat spricht eine Reihe von Untersuchungen für eine Positionierung der Substituenten am Kohlenstoffatom 3 des D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> in einem sterisch nicht stark restriktiven Bereich. So kann die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinasereaktion effizient durch Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> – Analoga mit anstelle der 3-Hydroxylgruppe eingeführten sperrigen Substituenten inhibiert werden (z.B. durch 3-meta-benzoyl-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>; [Hirata et al., 1995]); eine Anzahl weiterer kompetitiv inhibitorisch wirkender Inositolphosphate (z.B. D-myo-Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>, scyllo-Ins(1,2,3,5)P<sub>4</sub>; [Hillemeier, 2001]) besitzt an der D-3-äquivalenten Position (D-3\*) statt der äquatorialen OH-Gruppe eine äquatoriale Phosphatgruppe. Das Inositolphosphat-Analogon 3-Hyms-InsP<sub>3</sub> besitzt an der Position D-3\* eine Hydroxymethylgruppe und kann sowohl an dieser Gruppe als auch an der OH-Gruppe an D-6\* durch die IP3K phosphoryliert werden [Hillemeier, 2001]. Von Safrany et al. [Safrany et al., 1992b] wurde die inhibitorische Wirkung des nicht von der IP3K

metabolisierbaren L-chiro-Ins(2,3,5)P<sub>3</sub> (K<sub>i</sub> = 7,1 μM) demonstriert. Diese Verbindung unterscheidet sich lediglich an der Position D-3\* von dem natürlichen Substrat D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>: während bei D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> die OH-Gruppe an der Position D-3 äquatorial orientiert ist, besitzt das L-chiro-Ins(2,3,5)P<sub>3</sub> an der entsprechenden Position D-3\* eine axiale Hydroxylgruppe. Wie Abbildung 4.19 noch einmal verdeutlicht, ist eine affine Bindung an IP3K somit auch möglich, wenn statt des Protons H3 eine OH-Gruppe auftritt; die Bindungstasche muss in diesem Bereich sterisch zumindest dieser Gruppe Platz bieten können.

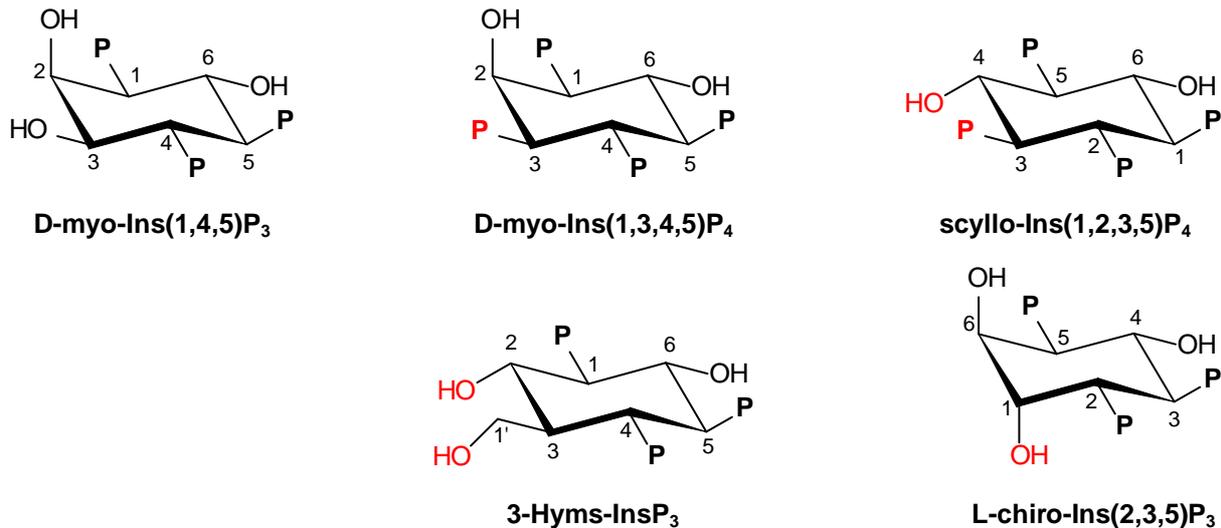


Abbildung 4.19: Strukturen des D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, des D-myo-Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>, des scyllo-Ins(1,2,3,5)P<sub>4</sub>, des 3-Hyms-InsP<sub>3</sub> und des L-chiro-Ins(2,3,5)P<sub>3</sub>. Die Strukturen wurden in der Position abgebildet, in der maximale strukturelle Übereinstimmung mit dem IP3K-Substrat D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> erreicht wurde; in dieser Position vorliegende Unterschiede zum D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> wurden rot hervorgehoben.

Auch D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> – Analoga mit sperrigen Substituenten anstelle der axialen Hydroxylgruppe am Kohlenstoffatom 2 werden von der IP3K erkannt, affin gebunden und in einigen Fällen auch umgesetzt [Hirata et al., 1990, Van Dijken et al., 1994]. Z.B. wurden zwei von Hirata et al. analysierte Analoga (Analog 206: D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, axiale OH-Gruppe an D-2 ersetzt durch Aminocyclohexancarboxyl – Gruppe; Analog 209: D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, axiale OH-Gruppe an D-2 ersetzt durch Aminobenzoyl-Gruppe) mit zur Bindung von D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> vergleichbarer Affinität von der untersuchten IP3K gebunden; allerdings wurde nur das Analog 206 auch durch die Kinase metabolisiert. Weitere Arbeiten geben ebenfalls Hinweise auf die eher untergeordnete Rolle der Substituenten an der Position D-2 für die Erkennung des D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> durch die IP3K. So wird auch das Fluoro-Analogon (-)-D-2,2-difluoro-2-deoxy-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> (D-2,2-F<sub>2</sub>-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>) von der IP3K umgesetzt [Safrany et al., 1990]; die Phosphorylierung von D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> wird durch D-2,2-F<sub>2</sub>-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> mit einem apparenten K<sub>i</sub> – Wert von 10,2 μM inhibiert [Safrany et al., 1992a]. Von Hillemeier [Hillemeier, 2001] konnten sowohl das D-myo-Ins(1,4,6)P<sub>3</sub> als auch das L-scyllo-Ins(1,2,4)P<sub>3</sub> als Substrate der GgIP3K-A identifiziert werden. Wie aus Abbildung 4.20

ersichtlich ist, unterscheidet sich das L-scylo(1,2,4)P<sub>3</sub> von D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> lediglich durch den Substituenten an der jeweiligen zu D-2 des D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> äquivalenten Position: während D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> hier eine axiale Hydroxylgruppe besitzt, liegt bei L-scylo-Ins(1,2,4)P<sub>3</sub> eine äquatoriale OH-Gruppe vor. Das D-myo-Ins(1,4,6)P<sub>3</sub> besitzt an dieser Position eine äquatoriale Phosphatgruppe. Während für beide alternativen Substrate ein mit dem Wert für D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> vergleichbarer apparer K<sub>m</sub>-Wert ermittelt wurde, zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede in den jeweiligen spezifischen Aktivitäten [Hillemeier, 2001]: während die Phosphorylierung des L-scylo-Ins(1,2,4)P<sub>4</sub> zu L-scylo-Ins(1,2,4,6)P<sub>4</sub> mit einer um den Faktor 4 gegenüber der Metabolisierung des natürlichen Substrats D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> verringerten Geschwindigkeit erfolgte, wurde das D-myo-Ins(1,4,6)P<sub>3</sub> nur langsam zu D-myo-Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub> umgesetzt (Faktor 500 gegenüber der Metabolisierung von D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>). Die signifikant kleineren Umsatzgeschwindigkeiten der hochaffin gebundenen alternativen Substrate D-myo-Ins(1,4,6)P<sub>3</sub> und L-scylo-Ins(1,2,4)P<sub>3</sub> könnten zum einen auf eine elektrostatische und/oder sterische Behinderung der Übertragung des  $\gamma$ -Phosphates des ATP auf die jeweilige äquatoriale Hydroxylgruppe an D-3-äquivalenter Position beruhen, zum anderen könnte auch eine gegenüber dem D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> veränderte Positionierung des Substrates in der Bindungstasche zu einer Verlangsamung der enzymatisch katalysierten Reaktion führen. Die gegenüber den Werten für das Proton H3 höheren STD-Amplifikationsfaktoren für das **Proton H2** des D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> weisen auf eine größere räumliche Nähe dieses Protons zur Proteinoberfläche hin, was die Möglichkeit einer vollständig korrekten Positionierung eines Isomers mit einer Hydroxylgruppe (L-scylo-Ins(1,2,4)P<sub>3</sub> bzw. einer noch wesentlich raumfordernderen Phosphatgruppe (D-myo-Ins(1,4,6)P<sub>3</sub>) anstelle des Protons H2 eher unwahrscheinlich erscheinen lässt.

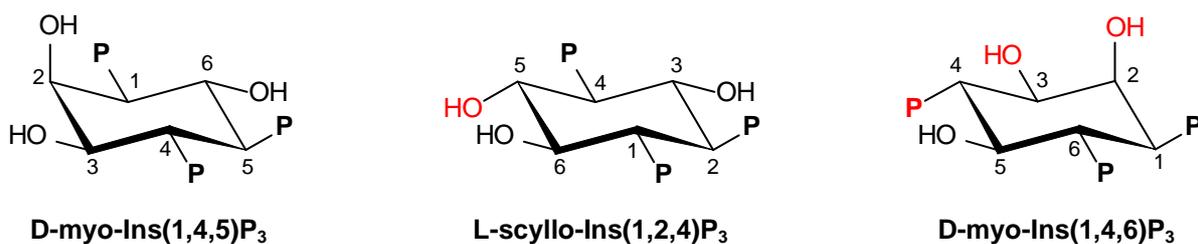


Abbildung 4.20:  
Strukturen des D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, des L-scylo-Ins(1,2,4)P<sub>3</sub> und des D-myo-Ins(1,4,6)P<sub>3</sub>.

Für das **Proton H4** wurden für das wt-Enzym (und auch für die Mutante R276L) im wesentlichen mit den für das Proton H2 identische STD-Amplifikationsfaktoren bestimmt, d.h. auch dieses Proton scheint im Vergleich zum Proton H3 räumlich näher zur Proteinoberfläche zu stehen. In der Tat wurden von Hillemeier [Hillemeier, 2001] für Inositolphosphate, welche anstelle des Protons H4 (axiale) Phosphat- bzw. Hydroxylgruppen, also Gruppen mit größe-

rer Raumforderung, aufwiesen (z.B. m-Ins(1,2,3)P<sub>3</sub>, D-myo-Ins(1,3)P<sub>2</sub>, L-chiro-Ins(1,4,6)P<sub>3</sub>), deutlich gegenüber dem D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> herabgesetzte Affinitäten zur GgIP3K-A festgestellt. Allerdings ist anzumerken, dass diese Effekte vermutlich mit größerer Wahrscheinlichkeit vor allem auf das Fehlen der 4,5-äquivalenten vicinalen äquatorialen Phosphatgruppen bei diesen Inositolphosphaten zurückzuführen sind. Die Bedeutung dieser Konfiguration für die hochaffine Bindung von Inositolphosphaten wurde bereits mehrfach demonstriert [Hillemeier, 2001; Yoshimura et al., 1999]. Bei verschiedenen pH-Werten durchgeführte Untersuchungen mit den Phosphofluoridat-Analoga D-myo-Inositol 1,5-bis(phosphat) 4-phosphofluoridat, D-myo-Inositol 1,4 – bis(phosphat) 5-phosphofluoridat und D-myo-Inositol 1-phosphat 4,5-bis(phosphofluoridat) zeigen die essentielle Bedeutung der ionischen Interaktionen zwischen den bei physiologischem pH-Wert dianionischen Phosphatgruppen an D-4 und D-5 [White et al., 1991] und der IP3K für die hochaffine Bindung des D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> [Yoshimura et al., 1999].

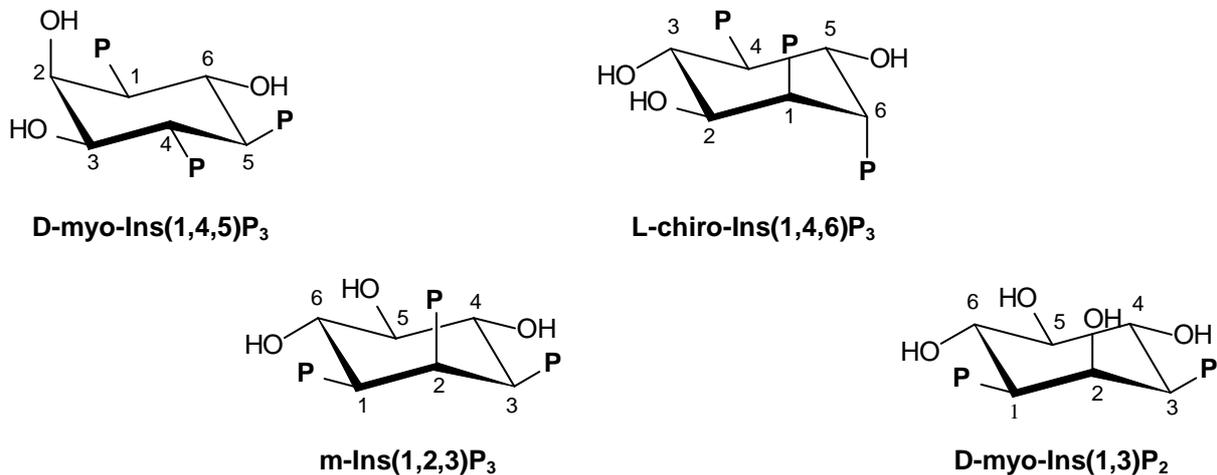


Abbildung 4.21:

Strukturen des D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, des L-chiro-Ins(1,4,6)P<sub>3</sub>, des m-Ins(1,2,3)P<sub>3</sub> und des D-myo-Ins(1,3)P<sub>2</sub>.

Die Signale der **Protonen H1, H5 und H6** des Inositolrings konnten aufgrund von starker Überlappung insbesondere bei den mit den wt-Daten zu vergleichenden Untersuchungen der IP3K-Mutanten nicht getrennt analysiert werden. Der gemittelte STD-Amplifikationsfaktor dieser drei Protonen lag zwischen den von den Protonen H3 und H2 bzw. H4 erreichten STD-Amplifikationsfaktoren; die gemittelte Sättigungsrate der Protonengruppe (H1, H5, H6) überstieg die Sättigungsraten der Protonen H2, H4 und H3.

Während, wie oben dargelegt, die vicinalen äquatorialen Phosphatgruppen an den D-4 und D-5 äquivalenten Positionen essentielle Voraussetzungen für eine hochaffine Bindung eines Inositolphosphats durch die IP3K sind [Hillemeier, 2001], muss an der zu D-1 – äquivalenten Position nicht obligat eine Phosphatgruppe vorliegen. In der Tat werden auch Substratanalo-

ga wie Glycerol-Inositol 4,5-bisphosphat (GroP(4,5)P<sub>2</sub>) sowie Glucositol-P<sub>3</sub>, also Verbindungen mit einer raumfordernderen Gruppe als der bei D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> vorliegenden Phosphatgruppe als Substrat akzeptiert [Hillemeier, 2001]. Im Falle des GroP(4,5)P<sub>2</sub> lag der apparente K<sub>m</sub>-Wert zwar signifikant über dem apparenten K<sub>m</sub> für D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, die maximal erreichte Umsatzgeschwindigkeit war jedoch sogar größer als der bei der Umsetzung des natürlichen Substrats erreichte Wert [Hillemeier, 2001]. Daneben ist auch das D-myo-Ins(4,5)P<sub>2</sub> ein gutes alternatives Substrat der IP3K [Hillemeier, 2001].

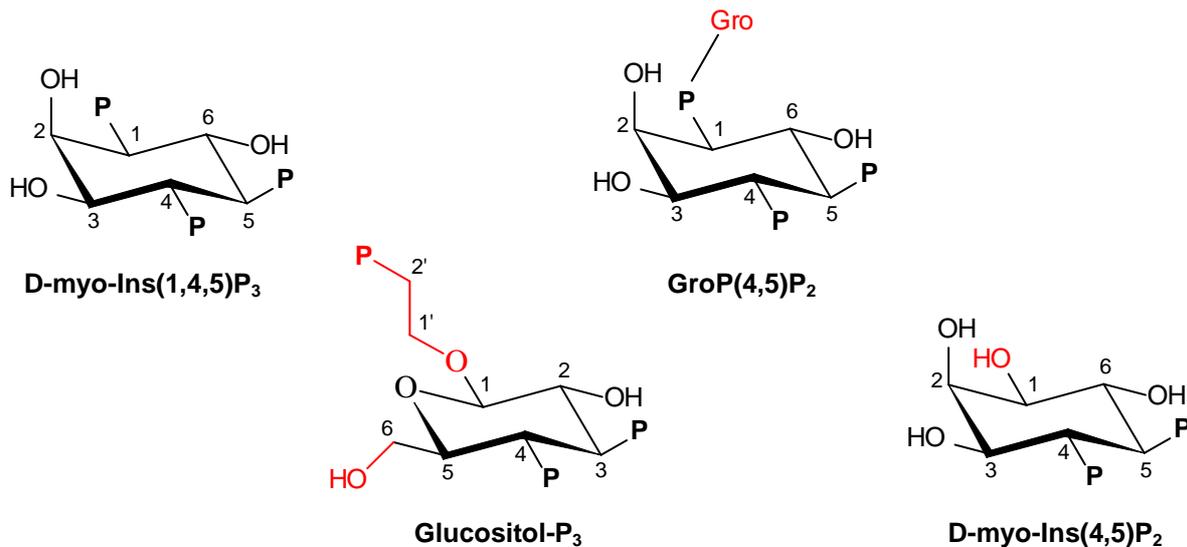


Abbildung 4.22:

Strukturen des D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, des GroP(4,5)P<sub>2</sub>, des Glucositol-P<sub>3</sub> und des D-myo-Ins(4,5)P<sub>2</sub>

Die äquatoriale Hydroxylgruppe an der Position D-6 ist nicht essentiell für eine hochaffine Bindung an IP3K: auch das D-6-deoxy-myo-Inositol 1,4,5-trisphosphat inhibiert effizient die Phosphorylierung von [<sup>3</sup>H]-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> durch die IP3K [Safrany et al., 1991]. Allerdings scheint der für alternative Substituenten an D-6 äquivalenter Position zur Verfügung stehende Raum limitiert zu sein, wie Untersuchungen an Inositolphosphaten mit äquatorialen Phosphatresten anstelle der äquatorialen Hydroxylgruppe des D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> zeigen [Hillemeier, 2001]. Während das Isomer L-scylo-Ins(1,2,4)P<sub>3</sub> mit einem dem Wert für Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> gleichen apparenten K<sub>m</sub> von der Kinase erkannt und phosphoryliert wird, besitzt das sich von L-scylo-Ins(1,2,4)P<sub>3</sub> lediglich in der Orientierung der OH-Gruppe an D6-äquivalenter Position unterscheidende L-myo-Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> einen um den Faktor 7 erhöhten apparenten K<sub>m</sub>-Wert, die für die jeweiligen Metabolisierungen ermittelten maximalen Umsatzgeschwindigkeiten sind etwa gleich [Faktor 3 geringer als bei der Metabolisierung von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>; Hillemeier, 2001]. Die axiale Orientierung der Hydroxylgruppe an der D-6-äquivalenten Position des L-myo-Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> scheint somit die korrekte Positionierung des alternativen Substrats in der Bindungstasche nicht wesentlich zu beeinflussen; die Affinität der Kinase bezüglich des Substrats ist jedoch deutlich gegenüber dem L-scylo-Ins(1,2,4)P<sub>3</sub> verringert. Ursachen dieser

Effekte können entweder das Fehlen der Hydroxylgruppe in äquatorialer Position (und somit der Verlust von durch diese Gruppe vermittelten Protein-Ligand-Interaktionen) oder aber eine sterische Behinderung der Substratbindung durch die axiale Hydroxylgruppe sein. Im letzteren Fall sollten sich bei NMR-Spektren, bei denen die separate Vermessung des H6-Signals gelingt, aufgrund des in diesem Fall zu postulierenden engen räumlichen Kontaktes des Protons H6 mit der Bindungstasche große STD-Amplifikationsfaktoren für dieses Proton bestimmen lassen.

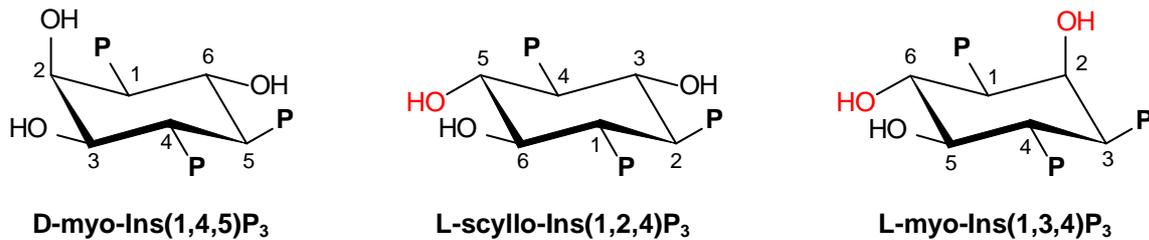


Abbildung 4.23:  
Strukturen des D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, des L-scylo-Ins(1,2,4)P<sub>3</sub> und des L-myo-Ins(1,3,4)P<sub>3</sub>

### ***Die Orientierung des Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> in der Bindungstasche der GgIP3K-A-Mutante R276L entspricht im wesentlichen der beim wt-Enzym beobachteten Substratpositionierung***

Wie im Ergebnisteil (Abschnitt 3.7) dargelegt, besteht approximativ ein einfacher Zusammenhang zwischen den für die Interaktion mit dem wt-Enzym bzw. mit der Mutante R276L berechneten maximalen STD-Amplifikationsfaktoren für die einzelnen betrachteten Protonen bzw. Protonengruppen. In der Tat ergeben sich die für die Mutante R276L erhaltenen Werte im wesentlichen durch eine Multiplikation der wt-Werte mit einem konstanten Faktor (ca. 2,6); ähnliches gilt, mit der Ausnahme des Protons H3, für die Sättigungsraten  $k_{\text{sat}}$  (Faktor ca. 0,5; für H3: 0,8). Diese Beobachtungen legen nahe, dass von einer nahezu identischen Orientierung des Inositolphosphats in der Bindungstasche der beiden Enzyme ausgegangen werden kann; die bei Interaktion mit der Mutante R276L auftretenden erhöhten STD-Amplifikationsfaktoren könnten dann die Folge einer erhöhten Austauschrate zwischen gebundenem und freiem Zustand sein.

Diese Interpretation der Ergebnisse der STD-NMR-Untersuchungen wird unterstützt durch die Resultate der enzymatischen Charakterisierung der GgIP3K-A-Mutante R276L. Sowohl das für die STD-NMR-Analysen eingesetzte GgIP3K-A-R276L Fragment (katalytische Domäne mit N-terminalem StrepTagII) als auch das die Calmodulin-Bindungsdomäne und die katalytische Domäne umfassende, die entsprechende Mutation tragende Fragment wiesen

signifikant gegenüber den entsprechenden wt-Konstrukten erhöhte apparente  $K_m$  – Werte für D-myo-Ins(1,4,5) $P_3$  auf (Erhöhung um den Faktor 8 bzw. Faktor 11). Gleichzeitig waren jedoch die erreichten maximalen Umsatzgeschwindigkeiten der mutierten Konstrukte mit den wt-Parametern vergleichbar bzw. im Falle des die Calmodulin-Bindungsdomäne mitbeinhaltenen Konstrukts sogar signifikant höher als diese (Faktor 1,8). Die enzymkinetischen Daten unterstützen somit das aus den STD-NMR-Untersuchungen abgeleitete Bild einer korrekten, eine effiziente Phosphorylierung ermöglichenden Substratpositionierung auch bei Vorliegen der Mutation R276L; der erhöhte apparente  $K_m$ -Wert für D-myo-Ins(1,4,5) $P_3$ , interpretierbar im Sinne einer niedrigeren Affinität des mutierten Enzyms für sein Substrat, zeigt sich ebenfalls in den STD-NMR-Daten in Form einer auf dem schnelleren Austausch zwischen gebundenem und ungebundenem Zustand beruhenden Zunahme der maximal erreichten STD-Amplifikationsfaktoren.

### ***Interagiert die Aminosäure R276 der GgIP3K-A mit der Phosphatgruppe an Position D-1 des D-myo-Ins(1,4,5) $P_3$ ?***

Die Aminosäure R276 spielt somit zwar offenbar eine essentielle Rolle bei der Erkennung und hochaffinen Bindung des D-myo-Ins(1,4,5) $P_3$ ; eine korrekte Positionierung des Substrats und eine effiziente Katalyse ist jedoch auch in Abwesenheit dieses Argininrestes gewährleistet. Denkbar wäre aus diesem Grund z.B. eine Funktion des R276 bei der elektrostatischen Interaktion der IP3K mit der äquatorialen Phosphatgruppe an Position D-1 des D-myo-Ins(1,4,5) $P_3$ . Die Anwesenheit dieser Phosphatgruppe trägt zwar wesentlich zur Bindungsaffinität der IP3K gegenüber einem gegebenen Inositolphosphat bei, sie ist jedoch nicht in dem Maße für eine korrekte Positionierung des Substrats essentiell wie die vicinalen äquatorialen Phosphatgruppen an den zu D-4 und D-5 äquivalenten Positionen [Hillemeier, 2001].

Die an dem auch für die STD-NMR-Untersuchungen eingesetzten StrepTagII-GgIP3K-A-R276L-Fusionsprotein durchgeführten kompetitiven Inhibitorstudien mit den Inositolphosphaten D-myo-Ins(1,3,4,5) $P_4$ , D-myo-Ins(1,4,6) $P_3$  und scyllo-Ins(1,2,3,5) $P_4$  können zusätzliche Hinweise auf die räumliche Beziehung der Aminosäure 276 zu den Substituenten des Inositolrings des D-myo-Ins(1,4,5) $P_3$  geben (siehe auch Tabelle 3.6 im Abschnitt 3.5.2 sowie Abbildung 4.24). So wird das D-myo-Ins(1,3,4,5) $P_4$  sowohl vom wt-Enzym als auch von der Mutante R276L deutlich schlechter gebunden als das D-myo-Ins(1,4,5) $P_3$ , der Faktor zwischen dem in erster Näherung als  $K_d$  – Wert für die Interaktion mit dem D-myo-Ins(1,4,5) $P_3$  interpretierbaren apparenten  $K_m$ -Wert für D-myo-Ins(1,4,5) $P_3$  und dem für das D-myo-Ins(1,3,4,5) $P_4$  gemessenen  $K_i$  – Wert beträgt für beide Enzyme ca. 3. Das zusätzliche Auftreten der äquatorialen Phosphatgruppe an der Position D-3 des D-myo-Ins(1,3,4,5) $P_4$  anstelle der äquatorialen Hydroxylgruppe an der Position D-3 des D-myo-Ins(1,4,5) $P_3$  wirkt sich somit auf die Bin-

dungsaffinitäten beider Proteine (wt und Mutante R276L) in gleicher Weise aus; die mutierte Aminosäure R276 scheint somit keine Rolle bei der Erkennung von Substituenten an der Position D-3 zu spielen. Anders ist dies bei der Betrachtung der kompetitiven Inhibition durch scyllo-Ins(1,2,3,5)P<sub>4</sub>: dieses Inositolphosphat unterscheidet sich von D-myo-Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> lediglich in der Orientierung der Hydroxylgruppe an D-2-äquivalenter Position (siehe auch Abb. 4.24), diese liegt bei D-myo-Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> axial, bei scyllo-Ins(1,2,3,5)P<sub>4</sub> äquatorial vor. Während sich bei Betrachtung des wt-Enzyms der K<sub>i</sub> – Wert für die kompetitive Inhibition durch scyllo-Ins(1,2,3,5)P<sub>4</sub> nicht signifikant von dem K<sub>i</sub> – Wert für D-myo-Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> unterscheidet, wird die GgIP3K-A-Mutante R276L wesentlich besser durch scyllo-Ins(1,2,3,5)P<sub>4</sub> als durch D-myo-Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> inhibiert. In der Tat liegt der K<sub>i</sub> – Wert für scyllo-Ins(1,2,3,5)P<sub>4</sub> mit 18,8 µM hier sogar niedriger als der apparente K<sub>m</sub> – Wert des mutierten Enzyms für das Substrat D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> (30,4 µM). Auch das eine äquatoriale Phosphatgruppe an D-2-äquivalenter Position aufweisende D-myo-Ins(1,4,6)P<sub>3</sub>, welches ebenfalls ähnlich affin wie D-myo-Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> vom wt-Enzym gebunden wird, bindet besser als D-myo-Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> an das die Mutation R276L tragende Enzym, die Affinität ist jedoch geringer als bei scyllo-Ins(1,2,3,5)P<sub>4</sub>.

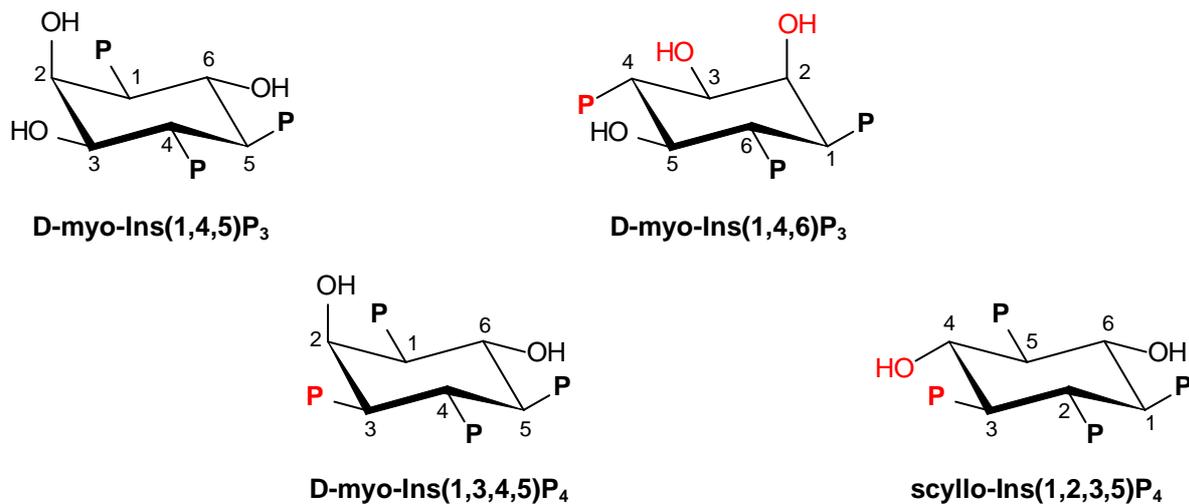


Abbildung 4.24:  
Strukturen des D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, des D-myo-Ins(1,4,6)P<sub>3</sub>, des D-myo-Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> und des scyllo-Ins(1,2,3,5)P<sub>4</sub>

Der Vergleich zwischen den K<sub>i</sub>-Werten für scyllo-Ins(1,2,3,5)P<sub>4</sub> und D-myo-Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> für das wt-Enzym demonstriert klar, dass die Bindung dieser beiden Isomere an das wt-Enzym nicht wesentlich von der Orientierung der Hydroxylgruppe an Position D-2 bzw. D-2-äquivalenter Position beeinflusst wird. Dies gilt jedoch nicht mehr bei Vorliegen der Mutation R276L: hier wird die äquatoriale Orientierung dieser Hydroxylgruppe bei der Bindung deutlich bevorzugt. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung kann unter der Annahme gegeben werden, dass das R276 beim Wildtyp-Enzym mit dem gebundenen Substrat D-myo-

Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> über die axiale Hydroxyfunktion an D-2 (und die äquatoriale Phosphatgruppe an D-1) interagiert. Bei Belegung der Position 276 mit einem bei physiologischem pH positiv geladenen Argininrest wäre dann die ionische Interaktion mit dem Phosphat an Position 1 mit großer Wahrscheinlichkeit die dominierende Wechselwirkung; eine Veränderung der Orientierung der benachbarten Hydroxylgruppe von axial nach äquatorial und eine daraus eventuell resultierende leicht veränderte Positionierung des Inositolphosphats in der Bindungstasche (siehe oben, großer STDAF von H2 und Substrateigenschaften von L-scylo-Ins(1,2,4)P<sub>3</sub>) hätten vermutlich keinen größeren Einfluss auf die Bindungsaffinität. Bei Austausch des positiv geladenen Argininrestes gegen den etwas kleineren hydrophoben Leucinrest wären bei einer Interaktion mit z.B. D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> und D-myo-Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> die oben beschriebenen Wechselwirkungen mit der axialen Hydroxylgruppe an Position D-2 und der äquatorialen Phosphatgruppe an Position D-1 nicht vorhanden, das Substrat wäre weniger affin gebunden. Diese Beobachtung korreliert mit den enzymkinetischen Daten für die Mutante R276L. Bei einer Bindung von scylo-Ins(1,2,3,5)P<sub>4</sub> an das mutierte Enzym wäre nun denkbar, dass durch die Belegung der Position des hohe STD-Amplifikationsfaktoren zeigenden Protons H2 durch die nun äquatorial stehende Hydroxylgruppe an D-2-äquivalenter Position aufgrund sterischer Limitierungen eine leichte Veränderung der Positionierung des Inositolphosphats in der Bindungstasche induziert wird. Unter Umständen könnte eine solche Umorientierung eine Annäherung von Protonen des Inositolrings (z.B. die Protonen an den D-2, D-4 und D-6-äquivalenten Positionen) an den anstelle des R276 vorliegenden hydrophoben Leucinrest erfolgen, so dass hier über eine hydrophobe Interaktion eine effizientere Bindung dieses Inositolphosphates erfolgen könnte.

Neben der hier vorgestellten Interpretation der die Mutante R276L betreffenden Daten sind auch noch andere Modelle für die Interaktion dieser Mutante mit den betrachteten Inositolphosphaten denkbar. So könnte ein Wegfall der postulierten ionischen Interaktion des R276 mit der Phosphatgruppe an D-1-äquivalenter Position zu einer um 180° gedrehten Positionierung des Inositolphosphats im aktiven Zentrum des Enzyms führen (siehe Abb. 4.25).

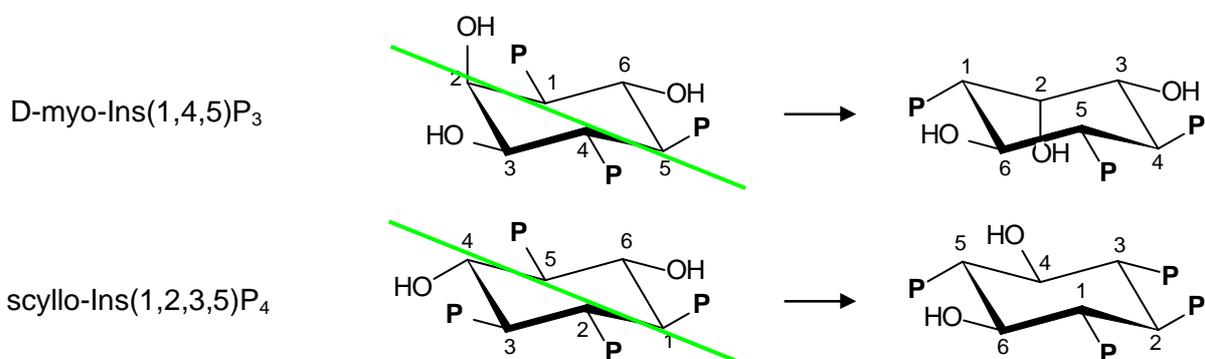


Abb. 4.25: Zwei Orientierungen des D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> sowie des scylo-Ins(1,2,3,5)P<sub>4</sub>, welche jeweils durch 180°-Drehung um die grün eingezeichnete Achse ineinander überführbar sind.

Bei dieser Umorientierung bleiben wesentliche, bereits in der Literatur beschriebene Determinanten einer effizienten Interaktion eines Inositolphosphats mit IP3K erhalten, insbesondere die 4,5-äquivalenten vicinalen äquatorialen Phosphatgruppen [Hillemeier et al., 2001]. Darüberhinaus zeigen Untersuchungen von [Hillemeier, 2001], dass das D-myo-Ins(4,5)P<sub>2</sub> nicht nur an der Hydroxylgruppe an D-3 sondern zu einem geringeren Maße auch an D-6 durch die IP3K phosphoryliert werden kann; fehlt also die Phosphatgruppe an Position D-1 so erfolgt die Bindung tatsächlich in beiden gezeigten Orientierungen. Wie MDD-HPLC-Untersuchungen zeigten, erfolgt die Phosphorylierung des D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> durch die Mutante R276L jedoch wie beim wt-Enzym ausschließlich an der Position D-3. Eine mögliche Modellvorstellung wäre, dass eine wie in Abb. 4.25 rechts gezeigte Positionierung des D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> aufgrund der axialen Orientierung der OH-Gruppe an D-2 sterisch eher ungünstig ist; das scyllo-Ins(1,2,3,5)P<sub>4</sub>, welches an der entsprechenden Position eine äquatoriale OH-Gruppe besitzt, könnte hingegen in beiden gezeigten Orientierungen mit dem Enzym interagieren. In der Tat werden auch einige Inositolphosphate mit einer äquatorialen Phosphatgruppe an D-6-äquivalenter Position von der GgIP3K-A gebunden und metabolisiert, wie die von [Hillemeier, 2001] beschriebenen Umsetzungen des D-myo-Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub> bzw. D-myo-Ins(1,2,4,6)P<sub>4</sub> zu D-myo-Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> bzw. D-myo-Ins(1,2,3,4,6)P<sub>5</sub> belegen.

Diese Hypothese bietet einen Erklärungsansatz für die bei der Mutante R276L auftretenden Unterschiede der K<sub>i</sub> – Werte für D-myo-Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> und scyllo-Ins(1,2,3,5)P<sub>4</sub>, der durch weitere enzymkinetische Untersuchungen, insbesondere unter Verwendung alternativer Substrate (z.B. L-scyllo-Ins(1,2,4)P<sub>3</sub>) zu verifizieren oder zu widerlegen wäre.

***Die Mutation R322L bedingt eine stark vom wt-Enzym abweichende Orientierung des Substrats Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> im aktiven Zentrum des Enzyms***

Im Gegensatz zu den für die Interaktion von D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> mit der GgIP3K-A-Mutante R276L ermittelten maximalen STD-Amplifikationsfaktoren und Sättigungsraten der Protonen des Inositolrings zeigen die zur Mutante R322L gehörenden Messwerte keinen einfachen, approximativ multiplikativen Zusammenhang mit den wt-Daten (siehe Abbildung 3.67 im Abschnitt 3.7). Insbesondere das Proton H2 zeigt eine deutlich geringere Zunahme des maximalen STD-Amplifikationsfaktors als die Protonen H3 und H4; der gemittelte maximale STD-Amplifikationsfaktor der Protonen H1, H5 und H6 liegt zwischen den Werten für H4 und H3. Bei der Betrachtung der Sättigungsraten fällt auf, dass diese Konstante für die Protonengruppe (H1, H5, H6) deutlich stärker gegenüber dem bei der Interaktion mit dem wt-Enzym erreichten Wert abgesenkt ist als die Sättigungsraten für die Protonen H2, H4 und H3.

Diese Beobachtungen weisen auf eine wesentlich gegenüber der Situation bei der Bindung an das wt-Enzym veränderte Orientierung des D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> in der Bindungstasche des mutierten Enzyms hin. In der Tat ist nicht nur der apparente K<sub>m</sub>-Wert für D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> der GgIP3K-Mutante R322L signifikant gegenüber dem für das wt-Enzym bestimmten Wert erhöht (Faktor 15 im Fall des die Calmodulinbindungsdomäne und die katalytische Domäne umfassenden Konstruktes, Faktor 6 für das auch für die STD-NMR-Untersuchungen benutzte StrepTagII-Fusionsprotein), vielmehr wird das Substrat auch nur mit einer sehr geringen maximalen Umsatzgeschwindigkeit von 0,26 U/mg (StrepTagII-Fusionsprotein) bzw. 0,54 U/mg (CaM-Bindungs- und katalytische Domäne umfassendes Fragment) metabolisiert. Wie aus Tabelle 3.4 im Abschnitt 3.5.1.3 zu ersehen ist, führt auch der konservative Austausch des R322 gegen einen Lysinrest zu einem signifikant erhöhten apparenten K<sub>m</sub>-Wert für D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> und einer mit dem für die Mutante R322L bestimmten Wert vergleichbaren, gegenüber dem wt-Enzym stark abgesenkten maximalen Umsatzgeschwindigkeit von 0,63 U/mg. Die beobachteten Effekte sind somit vermutlich tatsächlich im wesentlichen auf das Fehlen des Argininrestes an Position 322 zurückzuführen und nicht etwa die Folge einer Störung der korrekten Struktur des aktiven Zentrums des Enzyms durch die Einführung des hydrophoben Leucin-Restes.

***Interagiert die Aminosäure R322 der GgIP3K-A mit der Phosphatgruppe an Position D-4 des D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> ?***

Wie oben bereits erwähnt, sind die vicinalen äquatorialen Phosphatgruppen an den D-4 und D-5 – äquivalenten Positionen essentielle Determinanten für die Erkennung und hochaffine Bindung von Inositolphosphaten durch die IP3K. Es konnte gezeigt werden [Hillemeier, 2001], dass das D-myo-Ins(1,4)P<sub>2</sub>, welches nur eine dieser beiden Phosphatgruppen besitzt,

zwar von der GgIP3K-A zu D-myo-Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> metabolisiert wurde; die Umsatzgeschwindigkeit war jedoch gegenüber dem für die Phosphorylierung von D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> gemessenen Wert drastisch auf 5,9 mU/mg bei einer Substratkonzentration von 25 µM reduziert. Fehlt also die Interaktion einer der vicinalen äquatorialen Phosphatgruppen an den Positionen D-4 und D-5 mit dem Enzym, so ist die hochaffine Bindung und korrekte Positionierung des Substrats offensichtlich nicht mehr möglich.

Die für die GgIP3K-A-Mutante R322L erhaltenen enzymatischen Parameter und die STD-NMR-Daten legen somit die Hypothese einer Einbindung des Argininrestes an Position 322 in die Interaktion mit einer der (oder auch beiden) Phosphatgruppen an den Positionen D-4 und D-5 des D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> nahe. Beachtenswert ist in diesem Kontext auch die bereits im Abschnitt 4.3 diskutierte, im Sequenzumfeld des R322 bestehende schwache Sequenzähnlichkeit zu den Phosphatidylinositol 3-Kinasen. Der dem R322 entsprechende Aminosäurerest der PI3K (R947 in SsPI3K $\gamma$ ) ist essentiell für die Funktion der Kinase [Dhand et al., 1994] und interagiert gemäß den Modelling-Studien von [Walker et al., 1999] mit der Phosphatgruppe an Position D-4 des D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, welches der hydrophilen Kopfgruppe des PI3K-Substrats Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat entspricht.

Abbildung 4.26 illustriert einen möglichen Erklärungsansatz für die beobachteten Veränderungen der aus den STD-NMR-Messungen für die Mutante R322L abgeleiteten Parameter gegenüber den bei der Interaktion mit dem wt-Protein bzw. der Mutante R276L erhaltenen Werten: Unter der Annahme, dass R322 tatsächlich mit der äquatorialen Phosphatgruppe an Position D-4 des D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> interagiert, fällt bei Vorliegen der Mutation R322L eine die Positionierung des Substrats wesentlich bestimmende Interaktion weg (angedeutet durch den roten Pfeil in Abb. 4.26). In Abwesenheit der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen der bei physiologischem pH dianionischen Phosphatgruppe [Yoshimura et al., 1999; White et al., 1991] und der positive Ladung tragenden Guanidinogruppe des Arginins wären somit unter Umständen auch von der beim wt-Enzym vorliegenden Substratorientierung abweichende Positionierungen denkbar, welche zumindest energetisch günstige elektrostatische Interaktionen von Aminosäureresten des aktiven Zentrums des Proteins mit den Phosphatgruppen des Inositolphosphats ermöglichen. Eine dieser eventuell möglichen Orientierungen wurde in Abbildung 4.26 (rechte Spalte) dargestellt.

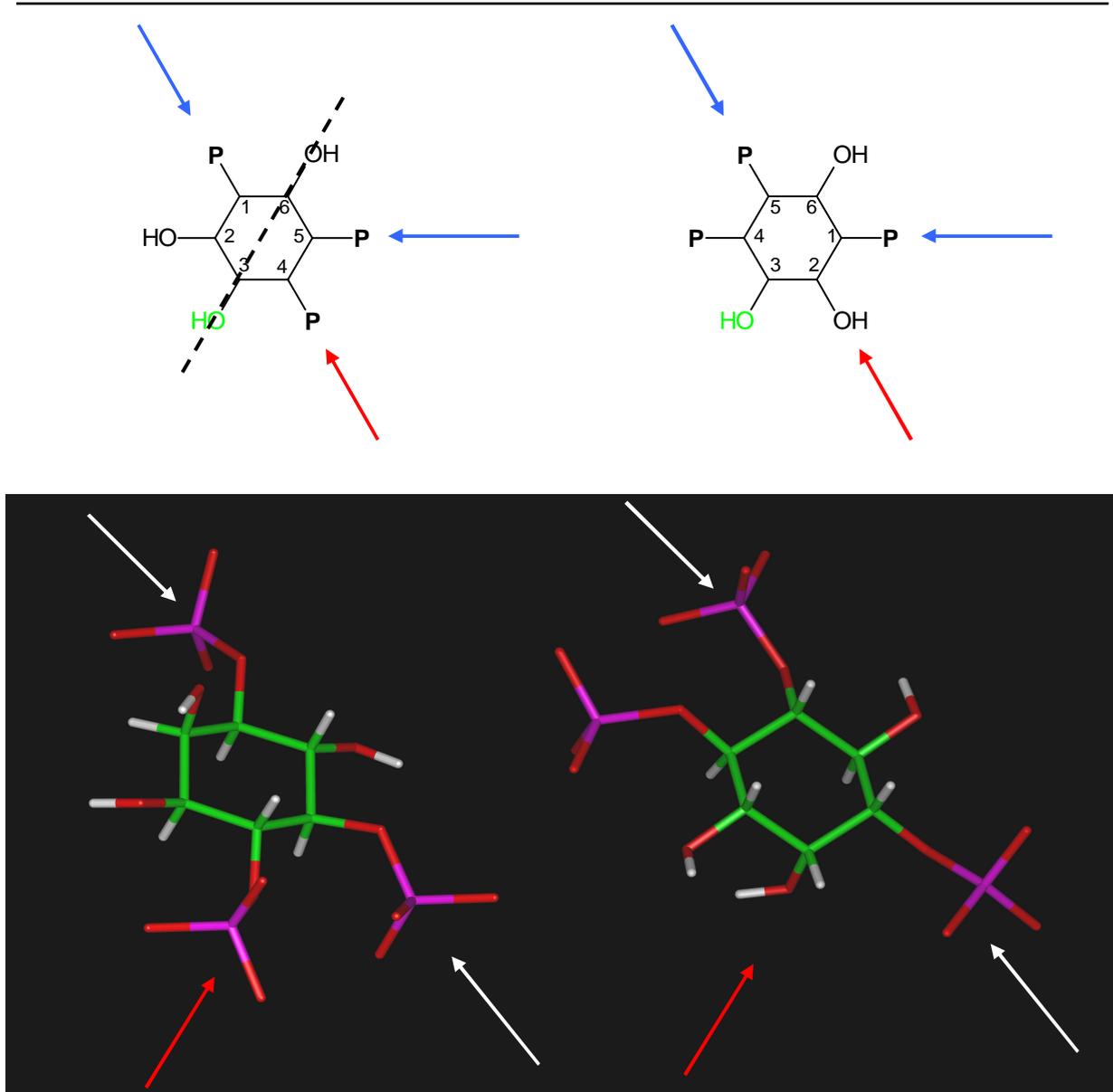


Abbildung 4.26: Schematische Darstellung einer potentiell möglichen Fehlpositionierung des Substrats  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  im aktiven Zentrum der GgIP3K-A-Mutante R322L. Unter der Annahme, dass die Aminosäure R322 beim wt-Enzym mit der Phosphatgruppe an Position D-4 interagiert, ist bei einer Mutation des Arginins zu Leucin die korrekte Positionierung des Phosphatclusters an den Positionen D-4 und D-5 (dargestellt in der linken Spalte) nicht mehr gewährleistet. In der rechten Spalte wurde eine daraus resultierende, potentiell mögliche veränderte Orientierung des Inositolphosphats schematisch dargestellt. Die rechts dargestellte Position ergibt sich durch Drehung der links dargestellten Struktur um  $180^\circ$  um die gestrichelt eingezeichnete Achse. Pfeile symbolisieren ionische Interaktionen zwischen dem aktiven Zentrum der IP3K und dem den Phosphatgruppen des  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ; der rote Pfeil stellt in der linken Spalte die postulierte Interaktion der Aminosäure R322 mit der Phosphatgruppe an D-4 dar.

Sollte diese Orientierung unter den in der Bindungstasche gegebenen sterischen Limitierungen möglich sein, gelangt so das Proton H4 an eine in etwa dem Proton H2 (bezogen auf die Bindung an das wt-Enzym) entsprechende Position. Dieses Proton besitzt sowohl beim wt-Enzym als auch bei der vermutlich das Substrat korrekt positionierenden Mutante R276L einen großen maximalen STD-Amplifikationsfaktor. In der Tat zeigt das Proton H4 bei der Interaktion von D-myo- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  mit der GgIP3K-A-Mutante R322L den höchsten

STDAF<sub>max</sub> und schnelle Sättigung. Das Proton H2 gelangt durch die hier postulierte gedrehte Position des D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> in der Bindungstasche der Mutante R322L in einen Raumbereich, welcher bei korrekter Orientierung des Inositolphosphats von der Phosphatgruppe an D-4 beansprucht werden würde. Die Bindungstasche muss also in diesem Bereich eine stark über den Raumbedarf eines Protons hinausgehende Ausdehnung besitzen; in der Folge wäre für das nun hier positionierte Proton H2 wegen eines verhältnismäßig großen Abstands zum Protein nur niedrige Werte des STD-Amplifikationsfaktors zu erwarten. In der Tat besitzt das Proton H2 bei der Interaktion des D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> mit der GgIP3K-A-Mutante R322L neben dem Proton H3 den geringsten maximalen STD-Amplifikationsfaktor; bei Normierung der Absolutwerte auf die wt-Daten zeigt das Proton H2 die bei weitem geringste Erhöhung des STDAF<sub>max</sub>.

Da auch Inositolphosphate mit sperrigen Substituenten anstelle der axialen Hydroxylgruppe an Position D-2 von der IP3K gebunden und z.T. auch umgesetzt werden können [Hirata et al., 1990], sollte auch eine bei der hier postulierten veränderten Orientierung an dieser Raumposition vorliegende äquatoriale Phosphatgruppe sterisch möglich sein.

Eine solche präferentielle „Fehlpositionierung“ des Substrates im aktiven Zentrum der Mutante könnte somit die erhaltenen STD-NMR-Daten zumindest partiell erklären. Die Resultate weiterer Untersuchungen ergänzen bzw. unterstützen dieses Modell. So zeigt die MDD-HPLC-basierte Analyse des Produkts der Mutante R322L, dass in der Tat eine Phosphorylierung des D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> an der Position D-3 zum D-myo-Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> erfolgt, nicht etwa an der Position D-6 zum D-myo-Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub>. Dadurch wird es unwahrscheinlich, dass die (gemäß den STD-NMR-Daten ja offensichtlich von der Substratpositionierung beim wt-Enzym abweichende) bevorzugte Orientierung des D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> in der Bindungstasche der in Abbildung 4.25 (rechts) dargestellten Orientierung entspricht, welche gemäß einer zum oben Gesagten ähnlichen Argumentationslinie ebenfalls mit den Resultaten der STD-NMR-Untersuchungen vereinbar wäre. Diese Orientierung geht aus der in Abbildung 4.25 (links) dargestellten Struktur durch 180°-Drehung um die grün eingezeichnete Achse hervor.

Darüberhinaus zeigten die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten kompetitiven Inhibitionsexperimente mit den Inositolphosphaten D-myo-Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> und scyllo-Ins(1,2,3,5)P<sub>4</sub> eine deutlich höhere Affinität der GgIP3K-A-Mutante R322L zu D-myo-Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> ( $K_i = 11,5 \mu\text{M}$ ) als zu scyllo-Ins(1,2,3,5)P<sub>4</sub> ( $K_i = 45 \mu\text{M}$ ) auf. Wie in Abbildung 4.27 schematisch dargestellt, könnte die äquatoriale Orientierung der Hydroxylgruppe an der D-2-äquivalenten Position des scyllo-Ins(1,2,3,5)P<sub>4</sub> im Kontext der hier postulierten Modell-

vorstellung für die Bindung des D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> (übertragen auf die Bindung der beiden untersuchten kompetitiven Inhibitoren) gegenüber der axialen Position der entsprechenden OH-Gruppe des D-myo-Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> infolge der räumlichen Nähe des Restes L322 energetisch ungünstiger sein. Dies wäre eine mögliche Erklärung für den beobachteten Unterschied der K<sub>i</sub>-Werte der beiden Inositolphosphate.

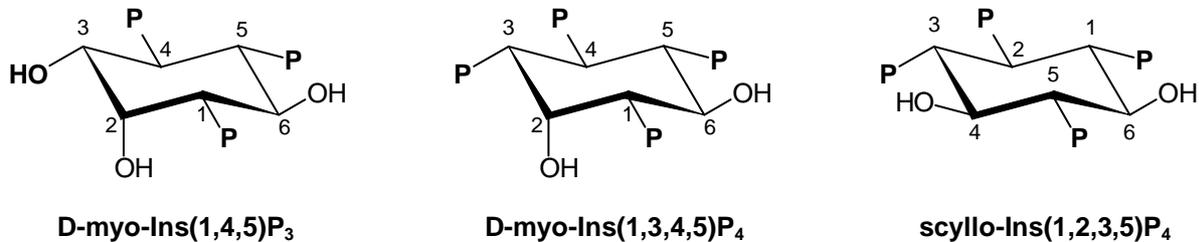


Abb. 4.27: Strukturen von D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, D-myo-Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>, scyllo- Ins(1,2,3,5)P<sub>4</sub>

### **Zusammenfassung: Charakterisierung inositolphosphatmetabolisierender Enzyme durch STD-NMR-Spektroskopie**

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten STD-NMR-Untersuchungen zeigen, dass mit Hilfe dieser Technik Informationen über die Struktur des aktiven Zentrums der IP3K gewonnen werden können. Die Resultate korrelieren dabei gut mit Erkenntnissen, welche unter Verwendung anderer Inositolphosphate und Inositolphosphatanaloga als alternative Substrate oder kompetitive Inhibitoren der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinasereaktion erhalten wurden. Problematisch ist jedoch die Tatsache, dass zumindest unter den hier für die Experimente gewählten Versuchsbedingungen die Signale der einzelnen Protonen des Inositolrings nicht alle getrennt aufgelöst werden konnten. Aus diesem Grund konnten für die Protonen H1, H5 und H6 nur gemittelte Werte der Parameter STDAF<sub>max</sub> und k<sub>sat</sub> angegeben werden; eine eindeutige Interpretation dieser Daten ist nur schwer möglich. In zukünftigen Experimenten wird geprüft werden müssen, ob durch die Variation experimenteller Parameter, insbesondere des pH-Wertes, in Kombination mit einer sorgfältigeren Aufbereitung des Inositolphosphates [Scholz et al., 1990] hier eine Verbesserung erzielt werden kann.

Von Mayer [Mayer, 2001] wurden für die betrachteten Lektin/Monosaccharid – Kombinationen zum Teil etwas deutlichere Unterschiede zwischen den maximalen STD-Amplifikationsfaktoren und den Sättigungsraten der verschiedenen einzeln auswertbaren Protonensignale

gefunden, als dies bei dem hier untersuchten, aus GgIP3K-A und ihrem Substrat D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> bestehenden System beobachtet wurde. Die Ursache hierfür ist vermutlich darin zu sehen, dass die Substrat-Bindungsdomänen der Lektine in der Regel auf der Proteinoberfläche lokalisiert sind, während enzymgebundene Substrate von Kinasen fast immer durch induced-fit-Mechanismen in eine Position gelangen, in der sie zum größten Teil von ihrem Rezeptorprotein umgeben sind. Während es somit bei der Interaktion eines Kohlenhydrats mit einem Lektin auch bei einem Monosaccharid durchaus Gruppen geben kann, die sehr wenig oder keinen Kontakt mit dem Protein aufweisen, ist dies bei der Interaktion eines Inositolphosphates mit einer Inositolphosphatkinase eher unwahrscheinlich. Die Abbildung 4.28 illustriert diese beiden unterschiedlichen Arten einer Protein/Ligand-Interaktion anhand der PDB-Strukturen 1CIW (Erdnußlektin im Komplex mit N-Acetyllactosamin, [Ravishankar et al., 1999]) und 1HKC (Hexokinase im Komplex mit Glucose, [Aleshin et al., 1998]).

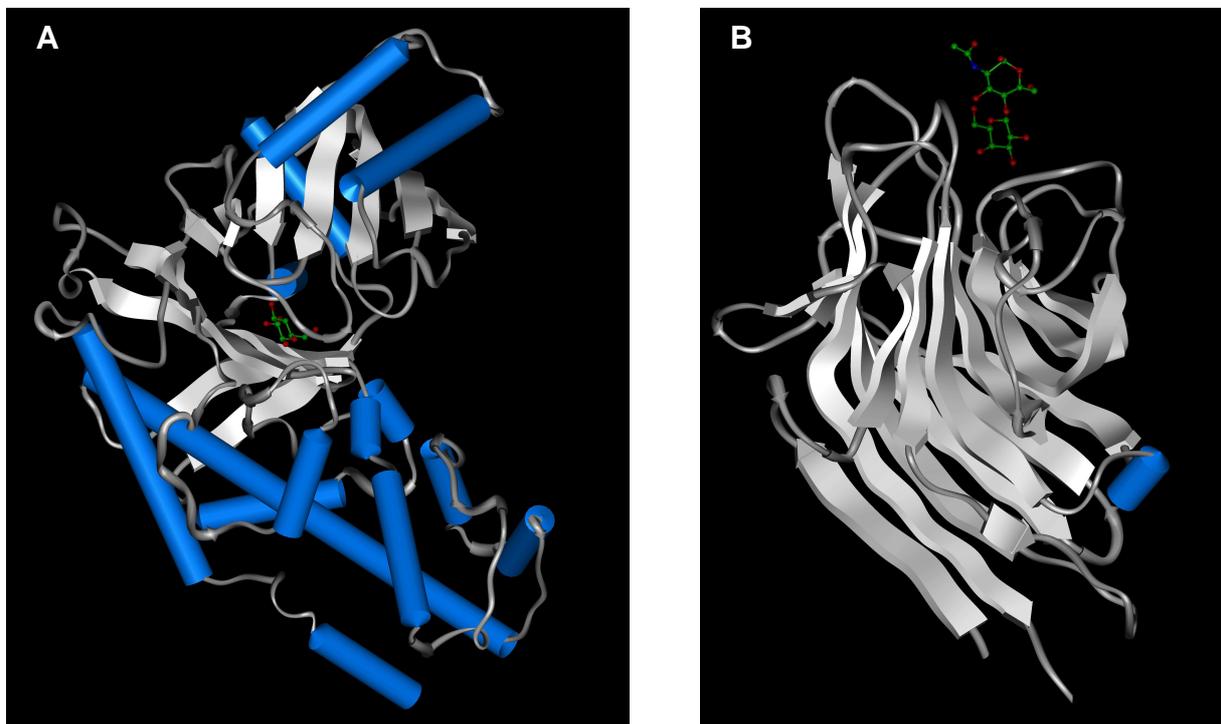


Abbildung 4.28: Struktur der Hexokinase im Komplex mit Glucose (A, PDB: 1HKC) im Vergleich mit der Struktur des Erdnußlektins mit N-Acetyllactosamin (B; PDB: 1CIW)

Eine genauere Betrachtung der Struktur des Hexokinase/Glucose-Komplexes zeigt, dass die gebundene Glucose fast komplett von der Kinase umschlossen wird, lediglich die zu phosphorylierende 6-Hydroxymethylgruppe liegt frei. Diese Tatsache korreliert mit der im Rahmen dieser Arbeit gemachten Beobachtung eines niedrigen, erst bei langen Sättigungszeiten erreichten maximalen STD-Amplifikationsfaktors für das Proton H3 des D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> bei der Interaktion des Inositolphosphats mit der die Phosphorylierung der D-3-Hydroxylgruppe katalysierenden GgIP3K-A.

Die STD-NMR-spektroskopische Analyse der Interaktion des D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> mit den GgIP3K-Mutanten R276L und R322L erbrachte Ergebnisse, die ebenfalls zu den aus den enzymatischen Daten dieser Enzyme ableitbaren Schlussfolgerungen passen und die Aufstellung erster Hypothesen über die Funktion der mutierten Aminosäurereste bei der Positionierung des Substrats D-myo-Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> zulassen. Saturation Transfer Difference NMR-Messungen scheinen somit geeignet zu sein, die durch Mutationen hervorgerufenen veränderten Ligandenbindungseigenschaften eines Inositolphosphate metabolisierenden Enzyms auf molekularer Ebene zu analysieren; sie stellen somit eine sinnvolle Ergänzung zur enzymkinetischen Charakterisierung der mutierten Proteine dar. Durch die Kombination von STD-NMR-Daten, MDD-HPLC-gestützter Produktanalytik (auch unter Verwendung alternativer Substrate) und enzymkinetischen Untersuchungen können grundlegende Eigenschaften der aktiven Zentren inositolphosphatmetabolisierender Enzyme beschrieben und charakterisiert werden.

Durch weitere STD-NMR-Studien kann in zukünftigen Experimenten der molekulare Mechanismus der Interaktion zwischen den Mitgliedern der PDKG-Kinase-Familie (Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinasen, Inositolhexakisphosphatkinasen, Inositolpolyphosphatmultikinasen) und den von diesen Kinasen präferentiell metabolisierten Inositolphosphaten weiter analysiert werden. Keine der Kinasen wurde bisher strukturell aufgeklärt; eine Lösung der Struktur der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-Kinase durch Kristallographie oder NMR-Spektroskopie ist, insbesondere durch die dann gegebene Möglichkeit zu darauf aufbauenden Modellierung- und Docking-Studien, wesentliche Voraussetzung für die Verifikation (oder Widerlegung) der hier dargestellten, aus enzymkinetischen und STD-NMR-Untersuchungen abgeleiteten Hypothesen.

## 4.5 Funktionelle Motive der PDKG-Kinase-Familie als Bestandteil der intrazellulären Bereiche des Ionenkanals TrpC1: Inositolphosphate als Calcium-Influx-Regulatoren ?

### *Store-operated calcium (SOC) influx und TRP-Kanäle*

Die Regulation der intrazellulären Calciumionenkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  erfolgt durch komplexe Signaltransduktionskaskaden. So wird die Aktivität intrazellulärer, in der Membran calcium-speichernder Zellkompartimente lokalisierter Ionenkanäle (z.B.  $Ins(1,4,5)P_3$  – Rezeptor) durch ihre jeweiligen Agonisten und weitere akzessorische Signale wie Phosphorylierungen moduliert. Neben der so vermittelten Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speicherkompartimenten spielt aber auch der Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum eine essentielle Rolle für den koordinierten Ablauf calcium-medierter Signaltransduktionsprozesse [Review: Berridge, 1993]. Ein in nicht-erregbaren Zellen häufig beobachteter Mechanismus des Calciumeinstroms aus dem Extrazellulärraum ist der speicherregulierte („store-operated“) Calciuminflux; dabei führt die durch  $Ins(1,4,5)P_3$  oder andere calcium-freisetzende Signalmoleküle herbeigeführte Depletion der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speicher zu einer Öffnung von Calciumkanälen in der Plasmamembran [Review: Putney et al., 2001; Dutta, 2000]. Bisher konnte der genaue molekulare Mechanismus der Kopplung zwischen Speicherdepletion und Kanalaktivierung jedoch nicht aufgeklärt werden, diskutiert werden unter anderem die Möglichkeiten einer direkten Interaktion des  $Ins(1,4,5)P_3$  – Rezeptors mit den den Calciumeinstrom vermittelnden Kanälen („conformational coupling hypothesis“, Review: [Putney et al., 2001]) oder der Existenz eines, nach Depletion der Speicher generierten löslichen, die Kanäle direkt oder indirekt aktivierenden Faktors („calcium influx factor“ = CIF; [Randriamampita et al., 1993]; [Csutora et al., 1999]; [Trepakova et al., 2000]). Auch die Identität der SOCs (store-operated channels) ist noch Gegenstand der Forschung, im Fokus steht hier die Familie der TRP (transient receptor potential) – Kanäle [Review: Clapham et al., 2001].

Die Proteinfamilie der TRP-Kanäle besteht aus drei Unterfamilien (STRPC = short TRPC, OTRPC = osm-9-like TRPC und LTRPC = long TRPC; [Review: Harteneck et al., 2000]). Abbildung 4.29 zeigt die putative Topologie einer sechs Transmembranhelizes beinhaltenden Kanaluntereinheit; in Analogie zu den spannungsgesteuerten Calciumkanälen wird eine tetramere Struktur des funktionalen Kanals postuliert. Ein Vertreter der Unterfamilie STRPC ist der Kanal TrpC1, welcher 1995 unabhängig von zwei Arbeitsgruppen kloniert werden konnte ([Wes et al., 1995]; [Zhu et al., 1995]). Von Sakura und Ashcroft wurde 1997 die Existenz von 4 Splicevarianten des MmTrpC1 demonstriert ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), nur die Varianten  $\alpha$  und  $\beta$  wurden auch im humanen System bestätigt. Der Kanal zeigt nahezu ubiquitäre Expression [Clapham et al., 2001], interagiert mit anderen Untereinheiten der STRPC-Familie sowohl *in*

*vitro* [Lintschinger et al., 2000] als auch in *vivo* [Strubing et al., 2001] und wird durch die Depletion intrazellulärer Speicher aktiviert [Zitt et al., 1996]. Transiente Expression einer TrpC1 antisense RNA in stabil TrpC3 antisense-RNA exprimierenden HEK-293-Zellen resultierte in einer partiellen Inhibition des speicherregulierten Calciumeinstroms [Wu et al., 2000]. Der in lipid raft – Domänen [Simons et al., 1997] der Plasmamembran lokalisierte Kanal [Lockwich et al. 2000] bindet reversibel an den Inositol 1,4,5-trisphosphat-Rezeptor 2; diese, von der intakten Organisation des Cytoskeletts abhängige Interaktion ist induzierbar durch die Entleerung intrazellulärer Calciumspeicher und wird nach Auffüllung der Speicher wieder gelöst [Rosado et al., 2001].

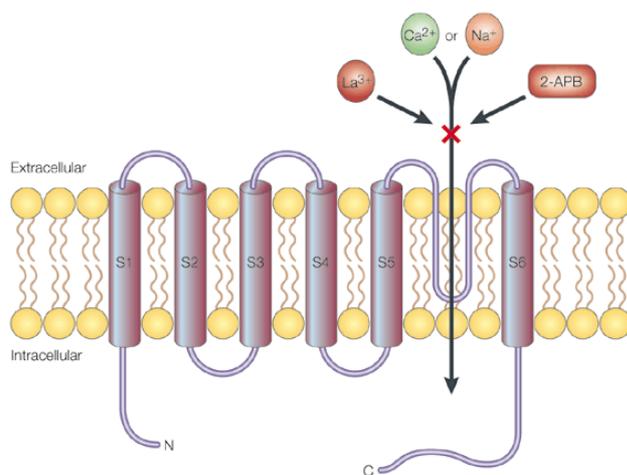


Abbildung 4.29: Putative Transmembrantopologie von Ionenkanälen der TRP-Familie (aus [Clapham et al., 2001]). Dargestellt wurde neben den sechs Transmembranhelizes auch die porenbildende Region zwischen den Helices S5 und S6. Viele der TRP-Kanäle werden durch Lanthanionen (La<sup>3+</sup>) und 2-Aminodiethylidphenylborat (2-APB) inhibiert.

### **Homologien zwischen funktionellen Bereichen der *Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3 – Kinasen* und *TrpC1***

Um weitere Proteine mit IP3K-ähnlichen Inositolphosphat-Bindungseigenschaften zu finden, wurde ausgehend von den für die Funktion der Kinase essentiellen Sequenzmotiven (L-G-F-R – Motiv (Abb. 4.8), DFG-Motiv (Abb. 4.12); IP3R-Homologie (Abb. 4.3); PDKG-Motiv (Abb. 4.7)) eine Pattern-Search der SWISSPROT-Datenbank durchgeführt ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_patinprot.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_patinprot.html)). Dabei zeigte sich, dass einzelne Sequenzabschnitte des speicherregulierten Calciumkanals TrpC1 deutliche Homologie zur Primärstruktur der katalytischen Domäne der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen, insbesondere der Isoform A, aufweisen. Im Folgenden sind zunächst die einzelnen Homologiebereiche in Form von lokalen Alignments dargestellt; die Lokalisation der betreffenden Bereiche auf Ebene der Primärstruktur des TrpC1 und bezüglich der putativen Transmembrantopologie des Kanals wird im letzten Abschnitt diskutiert.

### **Zwei Ankyrinrepeats im extremen N-Terminus des HsTrpC1 zeigen Homologie zu Bereichen der katalytischen Domäne der HsIP3K-A**

Der extreme N-Terminus wird bei allen Kanälen der STRPC-Familie von drei hochkonservierten Ankyrinrepeats gebildet, welche essentiell für die Funktion der Kanäle sind [Friedrich, 2001]. Ankyrinrepeats wurden bisher in über 400 verschiedenen Proteinen identifiziert, in denen jeweils zwischen zwei und mehr als zwanzig Kopien des Repeats vorliegen [Sedgwick und Smerdon, 1999]. Sie vermitteln vielfältige Protein-Protein-Interaktionen; beschrieben wurden unter anderem Interaktionen mit Cytoskelett-assoziierten Proteinen [Peng et al., 2000] sowie mit dem Inositol 1,4,5-trisphosphat-Rezeptor [Bourguignon et al., 1995].

Die ersten beiden Ankyrinrepeats des humanen TrpC1 [Wes et al., 1995] zeigen Homologie zu Bereichen der katalytischen Domäne HsIP3K-A; die Sequenzähnlichkeit zu den Isoformen B und C ist deutlich geringer ausgeprägt.

#### **Ankyrinrepeat 1**

HsTrpC_1	46	LNEKLFLLACDKGDYVMVKKILEENSSGDLN	76
HsIP3K_A	202	GTSGLILKRCSEPERYCLARLMADALRGCVF	232
HsTrpC_1_j		--HHHHHHHHHH--HHHHHHHHH-----	
HsIP3K_A_j		-----EEEE-----HHHHHH-----	

#### **Ankyrinrepeat 2**

HsTrpC_1	87	AVTITIEENLDILQLLLDYGC	108
HsIP3K_A	235	HGVVERDGE SYLQLQLLDGFD	256
HsTrpC_1_j		HHHHHHH--HHHHHHHHH---	
HsIP3K_A_j		--EE-----HHHHHHHHHH---	

Abbildung 4.30: Lokales Alignment der Ankyrinrepeats 1 und 2 des HsTrpC1 mit Sequenzbereichen der HsIP3K-A. Hervorgehoben wurden Reste, die in beiden Sequenzen identisch (schwarz hinterlegt) bzw. konservativ ersetzt (dunkelgrau bzw. hellgrau hinterlegt) sind. Die Sekundärstrukturvorhersagen (j) wurden mittels Jpred (<http://jura.ebi.ac.uk:8888/>) erstellt.

Es ist nicht bekannt, ob diese Bereiche der IP3K-A in Protein-Protein-Interaktionen involviert sind. Zwar co-lokalisiert die Isoform A in der Tat mit Strukturen des Cytoskeletts; [Schell et al., 2001] konnten jedoch zeigen, dass für diese Lokalisation ein kurzes Fragment des extremen N-Terminus dieser Kinase (Aminosäuren 1 – 66) nicht nur notwendig sondern auch hinreichend ist. Durch *in vitro* Experimente wurde die direkte Interaktion dieses Fragmentes mit F-Aktin demonstriert [Schell et al., 2001].

---

**Das PDKG-Motiv ist zwischen der HsIP3K-A und HsTrpC1 nur schwach konserviert**

Das zwischen den Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen, den Inositolhexakisphosphatkinasen und den Inositolpolyphosphatmultikinasen hochkonservierte PDKG-Motiv liegt in HsTrpC1 nicht in der bekannten Form (Consensus P-X-[VI]-[ML]-D-X-K-[MI]-G) vor. Dennoch existiert ein Sequenzabschnitt, in dem gerade die höchstkonserviertesten Reste dieses Motivs in der korrekten Abfolge, jedoch mit gegenüber den Inositolphosphatkinasen veränderten Abständen auftreten. Abbildung 4.31 zeigt ein lokales Alignment der entsprechenden Sequenzabschnitte.

```

HsTrpC_1      254      HTSSDEP--LD-KRG----LLEERMN      272
HsIP3K_A      252      LDGFDGPCVLDCKMGVRTYLEEELTK      277

HsTrpC_1_j    -----
HsIP3K_A_j    HH-----EEE-----HHHHHH

```

Abbildung 4.31: Lokales Alignment des PDKG-Motivs der HsIP3K-A mit einem Sequenzbereich des HsTrpC1. Durch schwarze Hinterlegung hervorgehoben wurden zwischen beiden Sequenzen identische Reste. HsTrpC\_1\_j, HsIP3K\_A\_j: entsprechende Ausschnitte der jeweiligen jpred-Sekundärstrukturvorhersagen.

Aufgrund der Notwendigkeit der Einführung dreier Gaps von jeweils zwei, einer bzw. vier Aminosäuren Länge auf einem kurzen Sequenzbereich scheint die Signifikanz dieser Beobachtung fraglich zu sein. Zu beachten ist dabei jedoch, dass das PDKG-Motiv der Vertebraten-Inositolphosphatkinasen in entsprechenden Proteinen aus Nematoden und Pflanzen zwar auch deutlich verändert, aber dennoch offensichtlich funktional vorliegt. So weist zum Beispiel das PDKG-Motiv der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase aus *Caenorhabditis elegans* (... HDPTKTAIM**DIKIG**TRT... ; gi:7494517) einen drei Aminosäuren umfassenden Einschub auf; der entsprechende Sequenzbereich einer putativen Inositolhexakisphosphatkinase aus *Arabidopsis thaliana* (... KPGPLVDD**DKGR**FF... ; gi:7576175) zeigt zwei Deletionen. Eine größere evolutionäre Distanz zwischen Proteinen der PDKG-Familie kann somit durchaus mit Veränderungen des zwischen den Vertebraten-Enzymen hochkonservierten PDKG-Consensusmotivs korreliert sein.

**Der zur Prototyp -  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Bindungsdomäne des IP3R homologe Bereich der IP3K zeigt deutlich Übereinstimmung mit einem Sequenzabschnitt des HsTrpC1**

Wie im Abschnitt 4.1 ausgeführt, zeigt ein Teil der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten inositolphosphatbindenden core-Domäne der IP3K Homologie zu in die Ligandenbindung involvierten Bereichen des IP3R [Yoshikawa et al., 1996]. Da der entsprechende Sequenzbereich des MmIP3R-1 bereits für sich alleine zur niedrigaffinen Bindung von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  in der Lage war und durch das Hinzutreten einer per se nicht inositolphosphatbindenden Domäne ein hochaffiner  $\text{IP}_3$ -Rezeptor generiert werden konnte, wurde dieser Sequenzabschnitt als „Prototyp  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Bindungsdomäne“ bezeichnet [Yoshikawa et al., 1999a, b]. Das lokale Alignment in Abbildung 4.32 zeigt deutliche Übereinstimmungen zwischen den diesen Abschnitt beinhaltenden Sequenzen der IP3K-Isoformen A, B, und C, des IP3R-1 und dem dargestellten Sequenzbereich des HsTrpC1.

HsTrpC_1	301	WFGQMSGY-RRKPTC-KKIMTVLTVGIFW	327
HsIP3K_B	752	LEEELTKA-RKKPSL-RKDMYQKMI EVDP	778
HsIP3K_A	271	LEEELTKA-RERPKL-RKDMYKKMLAVDP	297
HsIP3K_C	496	LEEELVKA-RERP RP-RKDMYEKMWAVDP	522
HsIP3R_1	495	LEVVFSPKPNRERQKLMREQNILKQIFKLL	523
		● ● ● ●	
HsTrpC_1_j		HH----- ---HHH HHHHHHHHHHHHHH	
HsIP3K_A_j		-HHHHHHHHH----- -----EE-----	
HsIP3R_1_j		HHHHH---HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH--	

Abbildung 4.32: Lokales Alignment eines Abschnittes der inositolphosphatbindenden core-Domäne der IP3K, eines Teils der Prototyp  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Bindungsdomäne des IP3R sowie eines Sequenzabschnittes des HsTrpC1. Reste, welche identisch in HsTrpC1 und mindestens einer IP3K-Isoform auftreten, wurden schwarz hinterlegt; konservative Ersetzungen wurden durch dunkelgraue Hinterlegung deutlich gemacht; rote Punkte: essentielle Reste für Bindung von  $\text{IP}_3$  durch den IP3R [Yoshikawa et al., 1996]; Sekundärstrukturvorhersagen: Jpred

Die Existenz eines zur Prototyp –  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  – Bindungsdomäne des IP3R homologen Bereichs in der Aminosäuresequenz des TrpC1 ist ein starker Hinweis auf eine eventuelle Befähigung des Kanals zur Inositolphosphatbindung. Auffällig ist, dass trotz einer höheren Homologie auf Ebene der Aminosäuresequenz zwischen HsTrpC1 und IP3K die vorhergesagte Sekundärstruktur des HsTrpC1-Abschnittes besser mit der vorhergesagten Struktur des IP3R korreliert. Mutagenesestudien von [Yoshikawa et al., 1996] demonstrierten die Bedeutung von vier in diesem Sequenzbereich lokalisierten basischen Resten für die Inositolphosphatbindung durch den IP3R (vgl. Abb. 4.3); drei dieser Positionen sind auch in der homologen Sequenz des HsTrpC1 mit basischen Resten belegt. Allerdings ist an zwei Positionen der im IP3R vorliegende Arginrest durch einen Lysinrest ersetzt; diese Substitution führte bei einem der beiden Reste des IP3R (R511) zu einer deutlich verminderten Fähigkeit zur Inositolphosphatbindung [Yoshikawa et al., 1996]. Gleiches wurde im Rahmen der vorliegenden

Arbeit an der GgIP3K-A beobachtet; auch hier führte die Substitution R276K ebenfalls zu einem Protein mit deutlich verminderter Affinität für Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>.

### **Das [LI]-G-[FV]-R-Motiv der Inositolphosphatkinasen ist in HsTrpC1 konserviert**

In Abschnitt 4.2 wurde die Bedeutung des in Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen und Inositolhexakisphosphatkinasen stark konservierten Motivs S - [STA]<sub>3</sub> - X - [LI] - G - [FV] - R - [IV] - X - G für die Inositolphosphatbindungseigenschaften dieser Proteine diskutiert. Die Inositolpolyphosphatmultikinase zeigte nur eine partielle, schwache Konservierung dieses Sequenzbereichs; insbesondere ist in diesem Protein der für die Funktion der IP3K essentielle Argininrest (R331 in der HsIP3K-A) durch einen hydrophoben Leucinrest substituiert. Die Abbildung 4.33 zeigt, dass das über alle Vertebraten-IP3K strikt konservierte Teilmotiv L-G-F-R auch in der Sequenz des HsTrpC1 vorkommt; allerdings in einem deutlich von den IP3K verschiedenen Sequenzumfeld. Auch die Sekundärstrukturvorhersagen korrelieren hier nicht.

HsTrpC_1	740	EIRDLL <b>LG</b> FRTSKYAMF	755
HsIP3K_A	323	SSSTTL <b>LG</b> FRIEGIKKA	338
HsTrpC_1_j		HHHHHH-----EEEE	
HsIP3K_A_j		-----EEHHHHH-	

Abbildung 4.33: Lokales Alignment im Bereich des zwischen HsIP3K-A und HsTrpC1 konservierten L-G-F-R-Motivs

### **Der Sequenzbereich zwischen der C-terminalen Begrenzung der inositolphosphatbindenden core-Domäne der IP3K und dem SSSL - Motiv ist konserviert zwischen HsIP3K-A und HsTrpC1**

Wie in Abschnitt 4.2. dargelegt, zeigt der C-terminal an die inositolphosphatbindende core-Domäne anschließende Sequenzbereich in den Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen verhältnismäßig große Variabilität zwischen den verschiedenen Isoformen, während der Bereich in den Inositolhexakisphosphatkinasen stärker konserviert ist. Analyse der Primärstruktur des HsTrpC1 zeigte eine deutliche Sequenzhomologie zu dem entsprechenden Abschnitt der IP3K-Isoform A; für beide Proteine wird von dem Programm Jpred in diesem Bereich das Vorliegen einer  $\alpha$ -helikalen Struktur vorhergesagt (Abb. 4.34).

HsTrpC_1	409	WYEGLED <b>DF</b> LEESRNQLSFVMNSLYL <b>ATF</b> ALK	439
HsIP3K_A	362	FVQGD <b>EE</b> VLRRYLNRLQQ <b>IRDT</b> LEV <b>SE</b> FFRR	392
HsTrpC_1_j		HH---HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	
HsIP3K_A_j		-----HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH---HHH---	

Abbildung 4.34: Lokales Alignment zwischen einem Teilbereich der HsIP3K-A mit bisher unbekannter Funktion und einem homologen Sequenzabschnitt des HsTrpC1. In beiden Sequenzen identische Reste wurden schwarz hinterlegt; konservative Ersetzungen wurden durch dunkelgrau Unterlegung deutlich gemacht. Sekundärstrukturvorhersagen: Jpred

Eine helical-wheel-Projektion der entsprechenden Sequenzabschnitte der HsIP3K-A und des TrpC1 macht eine weitere Gemeinsamkeit der verglichenen Bereiche deutlich: unter der Annahme des Zutreffens der Sekundärstrukturvorhersagen liegt in beiden Fällen eine amphipatische Helix vor.

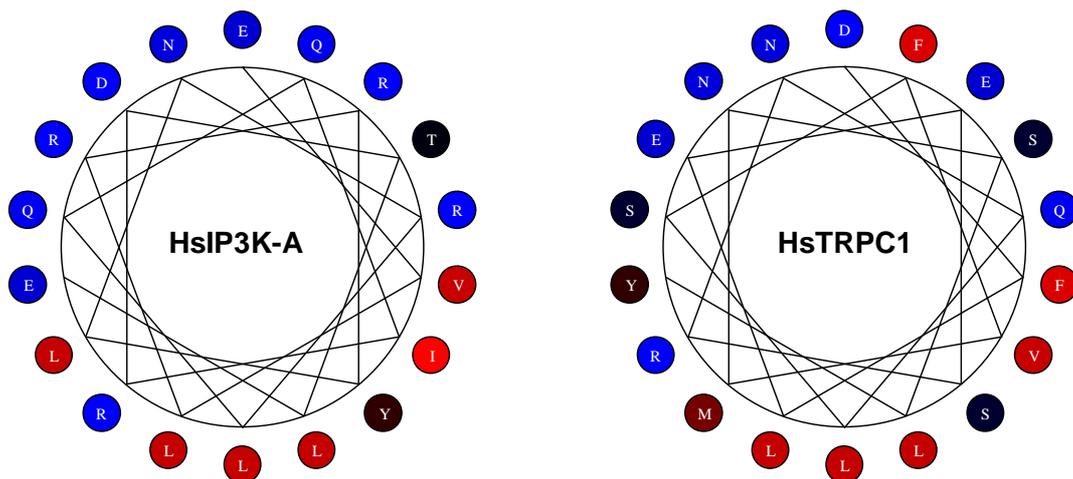


Abbildung 4.35: Helical-wheel-Diagramme der in Abbildung 4.34 dargestellten, vermutlich  $\alpha$ -helikale Struktur zeigenden Sequenzbereiche der HsIP3K-A (Aminosäuren 366 – 384) und des HsTrpC1 (Aminosäuren 414 – 432); die Abbildung wurde mit dem Programm BioEdit erstellt.

### **Das SSSL-Motiv und das DFG-Motiv sind zwischen HsIP3K-A und HsTrpC1 konserviert**

Die essentielle Bedeutung des zwischen den Inositolphosphatkinasen der PDKG-Familie und den Proteinkinasen konservierten DF[GA]-Motivs für die Funktion der genannten Enzyme wurde ausführlich in Abschnitt 4.3 diskutiert. Von Saiardi [Saiardi et al., 2001b] wurde gezeigt, dass der Austausch des zweiten Serinrestes des SSSL-Motivs der Inositolhexakisphosphatkinase Isoform 3 gegen einen Alaninrest zu einer Inaktivierung des Enzyms führt;

auch dieses Motiv erfüllt somit wichtige, den katalytischen Prozess beeinflussende Aufgaben. In der Sequenz des HsTrpC1 werde beide Motive ebenfalls gefunden; der Abstand zwischen den Motiven entspricht in etwa ihrer Distanz in den Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen (siehe Abbildung 4.36).

```

HsTrpC_1      483  YTTSSILGPL--QISMGQMLQDFGKFL      507
HsIP3K_A     395  VIGSSLLFVHDHCHRAGVWLIIDFGKTT     421

HsTrpC_1_j   -----  HHHHHHHHHHHHHH--
HsIP3K_A_j   EE--EEEEEE-----EEEE-----

```

Abbildung 4.36: Lokales Alignment der Sequenzen der HsIP3K-A und des HsTrpC1 im Bereich der SS[L]L/DFG-Motive.

Ein Vergleich mit der Primärstruktur der CelP3K (gi:7494517) macht deutlich, dass der Austausch des ersten Leucinrestes des SSSL-Motivs gegen einen Isoleucinrest vermutlich keine gravierenden Auswirkungen auf die katalytische Aktivität von Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen hat: auch dort findet man statt SSSL das leicht abgewandelte Motiv SSIL. Allerdings weist die Sekundärstrukturvorhersage für den entsprechenden Sequenzbereich des TrpC1 nicht auf die auch für die Inositolphosphatkinasen vorhergesagte, in den Proteinkinasen tatsächlich angenommene, zwei dem DFG-Motiv vorangehende kurze  $\beta$ -Stränge enthaltende Faltung hin.

### ***Die Transmembrantopologie des TrpC1 korreliert mit einer möglichen Funktion als Inositolphosphatrezeptor***

Alle in den vorhergehenden Abschnitten diskutierten Sequenzbereiche des HsTrpC1 liegen gemäß der putativen Transmembrantopologie des Kanals [Wes et al., 1995] entweder im Bereich des intrazellulären N-Terminus (Ankyrin-repeats, Homologien zu PDKG-Motiv und IP3R-Homologie), im intrazellulären Loop zwischen den Transmembranhelizes 2 und 3 (amphipathische Helix; übergehend in Transmembranhelix 3), im intrazellulären Bereich zwischen den Transmembranhelizes 4 und 5 (SSIL-Motiv, DFG-Motiv; übergehend in Transmembranhelix 5) sowie im ebenfalls intrazellulär gelegenen extremen C-Terminus des Kanals. Die zugrundegelegte putative Transmembrantopologie des HsTrpC1 widerspricht somit nicht der Vorstellung einer durch ein Zusammentreten der einzelnen Homologiebereiche gebildeten, intrazellulären Inositolphosphatrezeptordomäne in HsTrpC1; Experimente zur Prüfung dieser Hypothese sind in Vorbereitung.

## 5 Zusammenfassung / Summary

### Zusammenfassung

Ausgehend von dem intrazellulär nach Phospholipase C – Aktivierung gebildeten second messenger Inositol 1,4,5-trisphosphat ( $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ) kann durch die katalytischen Aktivitäten einer durch das Consensus-Motiv **P-X-[VI]-[ML]-D-X-K-[MI]-G** definierten Superfamilie von Inositolphosphatkinasen eine Vielzahl weiterer, teilweise hochphosphorylierter Inositolphosphate synthetisiert werden. Die oben genannte Inositolphosphatkinase-Superfamilie umfasst derzeit drei Klassen (Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen ([Takazawa et al., 1990c]; [Dewaste et al., 2000], [Dewaste et al., 2002]), Inositolhexakisphosphatkinasen ([Saiardi et al., 1999], [Saiardi et al., 2001b]) und Inositolpolyphosphatmultikinasen [Saiardi et al., 2001a]). Die von diesen Enzymen gebildeten Inositolphosphate wirken regulatorisch auf eine Vielzahl zellulärer Vorgänge wie die Generierung intrazellulärer Calciumsignale, den Transport von Vesikeln, den mRNA-Export aus dem Zellkern und die DNA-Rekombination. Darüberhinaus werden auch andere Signaltransduktionswege (wie der ras-Pathway) durch die Interaktion von Inositolphosphaten mit Proteinen, welche in diese Prozesse involviert sind, beeinflusst (Review: [Irvine und Schell, 2001]).

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch Untersuchungen an einer Isoform der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Sequenzbereiche zu identifizieren, die für die hochaffine und – selektive Bindung des Substrates  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  essentiell sind. Hierzu wurde zunächst ein katalytisch aktives Fragment der GgIP3K-A aus Hühnererythrozyten (CAA09965, [Bertsch et al., 1999]) gezielt mutagenisiert; die sich in der Regel nur an einer Aminosäureposition von dem entsprechenden Fragment des Wildtyp-Enzyms unterscheidenden mutierten Proteine wurden enzymkinetisch charakterisiert. Die Mutagenese erfolgte dabei auf Ebene der in einen prokaryotischen Expressionsvektor einklonierten cDNA durch die Anwendung spezieller PCR-Techniken ([Picard et al., 1994]; QuikChange (Stratagene)). Die rekombinanten in *E.coli* BL21(DE3) exprimierten Proteine wurden über mehrere Chromatographieschritte (P11-Phosphocellulose, Calmodulin-Sepharose bzw. StrepTactin-Sepharose) aus der löslichen Fraktion des Bakterienlysats aufgereinigt; die enzymkinetische Charakterisierung beinhaltete die Bestimmung der apparenten  $K_m$ -Werte für  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  und ATP sowie der maximalen Umsatzgeschwindigkeiten und wurde unter Anwendung eines gekoppelten enzymatisch-optischen Assays vorgenommen. Bei fünf Mutanten (R276L, R276K, K303Q, R322L, R322K) wurde ein signifikant erhöhter apparter  $K_m$ -Wert für  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  festgestellt. Während die maximalen Umsatzgeschwindigkeiten der Mutanten R276L und R276K mit der Aktivität des Wildtyp-Enzyms vergleichbar waren, zeigten die Mutanten K303Q, R322K und R322L deutlich verringerte maximale Umsatzgeschwindigkeiten. Diese Resultate korrelieren gut mit den Ergebnissen einer von Prof. Mayr und W. Fanick am Institut für Medizinische Biochemie und Moleku-

larbiologie (UKE Hamburg) durchgeführten limitierten tryptischen Proteolyse rekombinanter GgIP3K: hier zeigte sich, dass ein 35 Aminosäuren langer Sequenzbereich durch die Anwesenheit des Substrates  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  vor dem Angriff der Protease geschützt werden konnte [Bertsch et al., 2000]. Die Aminosäurereste R276 und K303 liegen im Bereich des durch  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  vor dem Angriff der Protease geschützten Bereiches, der Rest R322 befindet sich in dessen direktem Sequenzumfeld. Letzteres gilt auch für den Aminosäurerest K255, dessen Bedeutung für die Inositolphosphatbindung bereits von [Togashi et al., 1997] beschrieben wurde. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dieses Resultat noch einmal bestätigt: für die Mutanten K255A und K255N konnte keine  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinase-Aktivität detektiert werden.

Um genauere Information über die Bedeutung der oben genannten Aminosäurereste R276 und R322 für die Bindung des Substrats  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  zu erhalten, wurden zum einen weiterführende enzymkinetische Messungen an entsprechend mutierten Enzymen (Mutanten R276L und R322L) vorgenommen, zum anderen wurde die Interaktion des  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  mit dem entsprechenden Wildtyp-Enzym sowie den Mutanten R276L und R322L durch Saturation Transfer Difference (STD) - NMR – Messungen [Mayer und Meyer, 1999] untersucht. Bei konstant gehaltener Konzentration rekombinanter GgIP3K-A wurde der Ligand  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  zutitriert; gemessen wurde jeweils die Abhängigkeit der vom vorgesättigten Protein auf die Protonen des Inositolrings übertragenen Sättigung von der Vorsättigungszeit  $t_{\text{sat}}$ . Der Vergleich der für das Wildtyp-Enzym erhaltenen Daten mit den Messergebnissen für die Mutanten R276L und R322L spiegelt zum einen die verringerte Affinität der Mutanten zu dem Substrat  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  wider, zum anderen können aber auch Schlüsse über die Positionierung des Substrats im aktiven Zentrum des Enzyms abgeleitet werden. So ist die Bindung des Inositolphosphats an die Mutante R276L zwar weniger affin als bei der Interaktion mit dem Wildtyp-Protein, die Positionierung des Substrats in der Bindungstasche scheint jedoch im Wesentlichen der auch beim Wildtyp-Enzym vorliegenden Situation zu entsprechen. Dies gilt nicht für die Mutante R322L; hier führt die Mutation offenbar neben einer Affinitätsniedrigung auch zu einer Fehlpositionierung des Substrats in der Bindungstasche. Diese Beobachtungen korrelieren mit den oben bereits genannten Resultaten der enzymkinetischen Charakterisierung der Mutanten: beide Mutanten zeigen eine signifikant gegenüber dem Wildtyp-Enzym verringerte Affinität zu ihrem Substrat  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ; während jedoch die maximale Umsatzgeschwindigkeit der Mutante R276L nicht signifikant niedriger ist als der entsprechende Parameter des Wildtyp-Enzyms erfolgt die Phosphorylierung des Inositolphosphats durch die Mutante R322L auch unter Substratsättigungsbedingungen mit einer drastisch verringerten Umsatzgeschwindigkeit.

Im Rahmen der enzymkinetischen Charakterisierung gezielt mutierter rekombinanter IP3K wurden einige weitere, nicht nur die Bindung der Substrate, sondern auch regulatorische Me-

chanismen betreffende Beobachtungen gemacht. So konnten einige offenbar in die Bindung des Substrates ATP involvierte Aminosäurereste identifiziert werden; eine Mutante (K176L) zeigte eine deutlich verringerte Aktivierbarkeit durch den  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-Komplex. Aspekte der Isoform-spezifischen Regulation der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinaseaktivität durch CaMKII – bzw. PKC – katalysierte Phosphorylierung im Bereich der in dieser Arbeit durch die Resultate der gezielte Mutagenese definierten Inositolphosphatbindungsdomäne ([Communi et al., 1997], [Communi et al., 1999]) wurden ebenfalls durch die enzymkinetische Charakterisierung geeigneter Mutanten (GgIP3K-A-T302D und HsIP3K-B-S764D) sowie durch *in vitro* – Phosphorylierungsassays untersucht.

Die in dieser Arbeit durch die Untersuchung der Inositolphosphatbindungsdomäne der GgIP3K-A gewonnenen Erkenntnisse lassen sich nicht nur auf weitere Isoformen der Inositol (1,4,5)-trisphosphat 3-Kinase übertragen, vielmehr können über Homologiebetrachtungen auch Hypothesen über in anderen Mitgliedern der Inositolphosphatkinasesuperfamilie (Inositolhexakisphosphatkinasen und Inositolpolyphosphatmultikinasen) verwirklichte Strategien zur hochaffinen und selektiven Bindung ihrer jeweiligen Substrate abgeleitet werden.

## Summary

The second messenger inositol 1,4,5-trisphosphate is produced in the cell upon activation of phospholipase C isoforms. It can be metabolized to a variety of higher phosphorylated inositol phosphates by the catalytic activities of the members of an inositol phosphate kinase superfamily displaying the consensus-motif **P-X-[VI]-[ML]-D-X-K-[MI]-G**. At present, this superfamily comprises three different classes of enzymes (inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinases ([Takazawa et al., 1990c]; [Dewaste et al., 2000], [Dewaste et al., 2002]), inositolhexakisphosphate kinases ([Saiardi et al., 1999], [Saiardi et al., 2001b]) and inositolpolyphosphate multikinases [Saiardi et al., 2001a]). The inositol phosphates synthesized by these enzymes fulfill regulatory roles in a multitude of cellular processes like the generation of intracellular calcium signals, vesicular transport, mRNA export from the nucleus and DNA recombination. In addition, other signal transduction pathways like the ras pathway are influenced by the interaction of inositol phosphates with proteins involved in the regulation of these processes (Review: [Irvine and Schell, 2001]).

One goal of this work was to identify the sequence segments being essential for high affinity/high selectivity binding of the substrate  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  by investigating one particular inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase isoform. Thus, site directed mutagenesis of a catalytically active fragment of GgIP3K-A from chicken erythrocytes (CAA09965, [Bertsch et al., 1999]) was performed and the mutated proteins differing in most cases only in one amino acid position from the respective fragment of the wildtype-enzyme were characterised by enzyme kinetics studies. Site directed mutagenesis was performed at the cDNA-level using PCR techniques ([Picard et al., 1994; QuikChange(Stratagene)). The recombinant proteins were expressed in *E.coli* BL21(DE3) and purified by a combination of several chromatographic steps (P11 phosphocellulose, calmodulin-sepharose respectively StrepTactin sepharose) from the soluble fraction of the bacterial lysate. The enzymatic characterisation comprised the determination of apparent  $K_m$ -values for the substrates  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  and ATP as well as the specific  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-kinase activities of the recombinant proteins and was carried out using a coupled enzymatic optical test.

In five mutants (R276L, R276K, K303Q, R322L, R322K) a significantly increased apparent  $K_m$ -value for  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  was detected. While the specific activities of the mutants R276L and R276K were comparable with the specific activity of the wildtype-enzyme, the specific activities of the mutants K303Q, R322K und R322L turned out to be significantly decreased. These results are in good agreement with experiments performed by Prof. Mayr and W. Farnick at the institute for medical biochemistry and molecular biology (UKE Hamburg). In these experiments, the presence of  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  was shown to protect a 35 amino acid fragment of GgIP3K-A against limited tryptic digest [Bertsch et al., 2000]. In fact, the amino acid residues

R276 and K303 are localised within this protected region; the residue R322 can be found in its direct proximity. The latter is also true for the amino acid K255 that was previously identified by [Togashi et al., 1997] as an important residue involved in inositol phosphate binding. This result was also confirmed within the scope of this thesis: for the mutants K255A and K255N no Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-kinase-activity could be detected.

To characterize the function of the amino acid residues R276 and R322 in inositol phosphate binding in more detail, on the one hand further enzymatical measurements of appropriate mutants (R276L, R322L) were carried out. On the other hand, the interaction of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> with the wildtype-enzyme as well as with the mutants R276L and R322L was investigated by Saturation Transfer Difference (STD) – NMR measurements [Mayer and Meyer, 1999]. At a constant concentration of recombinant GgIP3K-A the ligand Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> was titrated; in each case, the dependency of the saturation transferred from the presaturated protein to the protons of the inositol ring from the presaturation time  $t_{\text{sat}}$  was analyzed. Comparison of the data generated using the wildtype-enzyme with the results for the mutants R276L and R322L displays on the one hand the decreased affinity of the mutants towards the substrate inositol 1,4,5-trisphosphate, on the other hand, conclusions concerning the positioning of the substrate in the enzyme's active center can be drawn. Thus, though the mutant R276L binds the inositol phosphates with decreased affinity in comparison to the wildtype protein, the positioning of the substrates seems to be essentially identical to the situation found in the wildtype enzyme. For the mutant R322L, the situation is different: here, the mutation results not only in a decreased substrate affinity but also in an apparent mispositioning of the substrate in the binding pocket. These observations correspond with the results of the enzymatic characterisation of the mutants mentioned above: for both mutants, a significantly decreased affinity towards the substrate Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> was detected. But while the specific activity of the mutant R276L was not significantly lower than the respective parameter of the wildtype-enzyme, the mutant R322L catalyzed the phosphorylation of the inositol phosphate also at high substrate concentrations only at a drastically decreased specific activity.

In the scope of the enzymatic characterisation of site-directed IP3K-mutants some further observations were made not only concerning substrate binding, but also regulatory mechanisms of IP3K. Thus, some amino acid residues apparently involved in ATP binding could be identified; one mutant (K176L) displayed a decreased Ca<sup>2+</sup>/CaM - mediated activation. Aspects of isoform-specific regulation of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-kinase activity by CaMKII – respectively PKC – mediated phosphorylation ([Communi et al., 1997], [Communi et al., 1999]) in the inositol phosphate binding core domain defined in this work were also analyzed by enzymatic characterisation of suited mutants (GgIP3K-A-T302D und HsIP3K-B-S764D) and *in vitro* phosphorylation assays.

The results obtained in this work for of the inositol phosphate binding domain of GgIP3K-A can not only be transferred to other isoforms of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase; furthermore, hypotheses concerning the strategies for selective high affinity binding of inositol phosphates to other members of the inositol phosphate kinase superfamily (inositolhexakisphosphate kinases and inositolpolyphosphate multikinases) can be derived by sequence based homology considerations.

---

## 6 Literatur

- Ackermann K.E., Gish B.G., Honchar M.P., Sherman W.R. (1987)  
Evidence that inositol 1-phosphate in brain of lithium-treated rats results mainly from phosphatidylinositol metabolism  
*Biochem. J.* 242, 517 - 524
- Akasaka K. (1979)  
Intermolecular spin diffusion as a method for studying macromolecule ligand interactions  
*J. Magn. Res.* 36, 134 -140
- Aleshin A. E., Zeng C., Bartunik H. D., Fromm H. J., Honzatko R. B. (1998)  
Regulation of hexokinase I: crystal structure of recombinant human brain hexokinase complexed with glucose and phosphate  
*J. Mol. Biol.* 282, 345 - 357
- Ali N., Duden R., Bembenek M.E., Shears S.B. (1995)  
The interaction of coatamer with inositol polyphosphates is conserved in *Saccharomyces cerevisiae*  
*Biochem. J.* 310(1), 279 – 284
- Baba H., Fuss B., Urano J., Pouillet P., Watson J.B., Tamanoi F., Macklin W.B. (1995)  
GapIII, a new brain-enriched member of the GTPase-activating protein family  
*J. Neurosci. Res.* 41, 846 - 858
- Balla T., Sim S.S., Baukal A.J., Rhee S.G., Catt K.J. (1994)  
Inositol polyphosphates are not increased by overexpression of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-kinase but show cell-cycle dependent changes in growth factor-stimulated fibroblasts  
*Mol. Biol. Cell* 5, 17-27
- Bansal V.S., Inhorn R.C., Majerus P.W. (1987)  
The metabolism of inositol 1,3,4-trisphosphate to inositol 1,3-bisphosphate  
*J. Biol. Chem.* 262, 9444 - 9447
- Bansal V.S., Caldwell K.K., Majerus P.W. (1990)  
The isolation and characterization of inositol polyphosphate 4-phosphatase  
*J. Biol. Chem.* 265, 1806 - 1811
- Barker C.J., Wright J., Kirk C.J., Michell R.H. (1995)  
Inositol 1,2,3-trisphosphate is a product of InsP<sub>6</sub> dephosphorylation in WRK-1 rat mammary epithelial cells and exhibits transient concentration changes during the cell cycle  
*Biochem. Soc. Trans.* 23, 169S
- Barnes J.A., Gomes A.V. (1995)  
PEST sequences in calmodulin-binding proteins  
*Mol. Cell. Biochem.* 149 - 150, 17-27
- Beck K.A., Keen J.H. (1991)  
Interaction of phosphoinositide cycle intermediates with the plasma-membrane-associated clathrin assembly protein AP-2  
*J. Biol. Chem.* 266, 4442 – 4447
- Bernstein G.G., Blank J.L., Jhon D., Exton J.H., Rhee S.G., Ross E.M. (1992)  
Phospholipase C-β1 is a GTPase-activating protein for G<sub>q/11</sub>, its physiological regulator  
*Cell* 70, 411 – 418
- Berridge M.J., Irvine R.F. (1984)  
Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction  
*Nature* 312, 315 - 321

- Berridge M.J., (1993)  
Inositol trisphosphate and calcium signalling  
*Nature* 361, 315 – 325
- Berridge M.J. (1997)  
The AM and FM of calcium signalling  
*Nature* 386, 759 - 760
- Bertsch U., Haefs M., Möller M., Deschermeier C., Fanick W., Kitzerow A., Ozaki S., Meyer H.E., Mayr G.W. (1999)  
A novel A-isoform-like inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase from chicken erythrocytes exhibits alternative splicing and conservation of intron positions between vertebrates and invertebrates  
*Gene* 228, 61 – 71
- Bertsch U., Deschermeier C., Fanick W., Girkontaite I., Hillemeier K., Johnen H., Weglohner W., Emmrich F., Mayr G.W. (2000)  
The second messenger binding site of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase is centered in the catalytic domain and related to the inositol trisphosphate receptor site  
*J. Biol. Chem.* 275, 1557 - 1564
- Bottomley J.R., Reynolds J.S., Lockyer P.J., Cullen P.J. (1998)  
Structural and functional analysis of the putative inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptors GAP1(IP4BP) and GAP1(m)  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250, 143 –149
- Bottomley M.J., Salim K., Panayotou G. (1999)  
Phospholipid-binding protein domains  
*Biochem. Biophys. Acta* 1436, 165 – 183
- Bourguignon L.Y., Jin H. (1995)  
Identification of the ankyrin-binding domain of the mouse T-lymphoma cell inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) receptor and its role in the regulation of IP<sub>3</sub>-mediated internal Ca<sup>2+</sup> release  
*J. Biol. Chem.* 270, 7257 - 7260
- Caffrey J.J., Hidaka K., Matsuda M., Hirata M., Shears S.B. (1999)  
The human and rat forms of multiple inositol polyphosphate phosphatase: functional homology with a histidine acid phosphatase up-regulated during endochondral ossification  
*FEBS Lett* 442, 99 - 104
- Caffrey J.J., Darden T., Wenk M.R., Shears S.B. (2001)  
Expanding coincident signaling by PTEN through its inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 3-phosphatase activity  
*FEBS Lett* 499, 6 - 10
- Cahalan M.D. (2001)  
Cell biology: Channels as enzymes  
*Nature* 411, 542 - 543
- Caroni P. (2001)  
New EMBO members' review: actin cytoskeleton regulation through modulation of PI(4,5)P(2) rafts  
*EMBO J.* 20, 4332 - 4336
- Chaudhary A., Gu Q.M., Thum O., Profit A.A., Qi Y., Jeyakumar L., Fleischer S., Prestwich G.D. (1998)  
Specific interaction of Golgi coatomer protein alpha-COP with phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate  
*J. Biol. Chem.* 272, 8344 – 8350

- Chi H., Yang X., Kingsley P.D., O'Keefe R.J., Puzas J.E., Rosier R.N., Shears S.B., Reynolds P.R. (2000)  
Targeted deletion of Minpp1 provides new insight into the activity of multiple inositol polyphosphate phosphatase in vivo  
*Mol. Cell. Biol.* 20, 6496 - 6507
- Choi K.Y., Kim H.K., Lee S.Y., Moon K.H., Sim S.S., Kim J.W., Chung H.K., Rhee S.G. (1990)  
Molecular cloning and expression of a complementary DNA for inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase  
*Science* 248, 64 – 66
- Clapham D.E., Runnels L.W., Strübing C. (2001)  
The TRP ion channel family  
*Nature Reviews Neuroscience* 2, 387 – 396
- Communi D., Takazawa K., Erneux C. (1993)  
Lys-197 and Asp-414 are critical residues for binding of ATP/Mg<sup>2+</sup> by rat brain inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase  
*Biochem. J.* 291, 811 - 816
- Communi D., Vanweyenberg V., Erneux C. (1994)  
Purification and biochemical properties of a high-molecular-mass inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase isoenzyme in human platelets  
*Biochem. J.* 298, 669 – 673
- Communi D., Lecocq R., Vanweyenberg V., Erneux C. (1995)  
Active site labelling of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase A by phenylglyoxal  
*Biochem. J.* 310, 109 – 115
- Communi D., Vanweyenberg V., Erneux C. (1997)  
D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase A is activated by receptor activation through a calcium:calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation mechanism  
*EMBO J.* 16, 1943 - 1952
- Communi D., Dewaste V., Erneux C. (1999)  
Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C-mediated phosphorylation and activation of D-myo-inositol 1,4, 5-trisphosphate 3-kinase B in astrocytes  
*J. Biol. Chem.* 274, 14734 - 14742
- Cozier G.E., Sessions R., Bottomley J.R., Reynolds S.R., Cullen P.J. (2000a)  
Molecular modelling and site-directed mutagenesis of the inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate-binding pleckstrin homology domain from the Ras GTPase-activating protein GAP1IP4BP  
*Biochem. J.* 349, 333 – 342
- Cozier G.E., Lockyer P.J., Reynolds J.S., Kupzig S., Bottomley J.R., Millard T.H., Banting G., Cullen P.J. (2000b)  
GAP1IP4BP contains a novel group I pleckstrin homology domain that directs constitutive plasma membrane association  
*J. Biol. Chem.* 275, 28261 - 28268
- Csutora P., Su Z., Kim H.Y., Bugrim A., Cunningham K.W., Nuccitelli R., Keizer J.E., Hanley M.R., Blalock J.E., Marchase R.B. (1999)  
Calcium influx factor is synthesized by yeast and mammalian cells depleted of organellar calcium stores  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96,121- 126
- Cullen P.J., Hsuan J.J., Truong O., Letcher A.J., Jackson T.R., Dawson A.P., Irvine R.F. (1995a)  
Identification of a specific Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>-binding protein as a member of the GAP1 family  
*Nature* 376, 527 – 530

- Cullen P.J., Chung S.K., Chang Y.T., Dawson A.P., Irvine R.F. (1995b)  
Specificity of the purified inositol (1,3,4,5) tetrakisphosphate-binding protein from porcine platelets  
*FEBS Lett.* 358, 240 – 242
- Cullen P.J., Hsuan J.J., Truong O., Letcher A.J., Jackson T.R., Dawson A.P., Irvine R.F. (1995c)  
Identification of a specific Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>-binding protein as a member of the GAP1 family  
*Nature* 376, 527 – 530
- Cullen P.J., Loomis-Husselbee J., Dawson A.P., Irvine R.F. (1997)  
Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate and Ca<sup>2+</sup> homeostasis: the role of GAP1IP4BP  
*Biochem. Soc. Trans.* 25, 991 - 996
- Cullen P.J. (1998)  
Bridging the GAP in inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate signalling  
*Biochimica et Biophysica Acta* 1436, 35 – 47
- Da Silva C.P., Emmrich F., Guse A.H. (1994)  
Adriamycin inhibits inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase activity in vitro and blocks formation of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate in stimulated Jurkat T-lymphocytes. Does inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate play a role in Ca<sup>2+</sup>-entry ?  
*J. Biol. Chem.* 269, 12521 – 12526
- Dewaste V., Pouillon V., Moreau C., Shears S., Takazawa K., Erneux C. (2000)  
Cloning and expression of a cDNA encoding human inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C  
*Biochem. J.* 352, 343 – 351
- Dewaste V., Roymans D., Moreau C., Erneux C. (2002)  
Cloning and expression of a full-length cDNA encoding human inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 400 - 405
- Dhand R., Hiles I., Panayotou G., Roche S., Fry M.J., Gout I., Totty N.F., Truong O., Vicendo P., Yonezawa K., Kasuga M., Courtneidge S.A., Waterfield M.D. (1994)  
PI 3-kinase is a dual specificity enzyme: autoregulation by an intrinsic protein-serine kinase activity  
*EMBO J.* 13, 522 - 533
- D`Santos C.S., Communi D., Ludgate M., Vanweyenberg V., Takazawa K., Erneux C. (1993)  
Identification of high molecular weight forms of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase in rat thymus and human lymphocytes  
*Cell. Signal.* 6, 335 – 344
- Dubois E., Dewaste V., Erneux C., Messenguy F. (2000)  
Inositol polyphosphate kinase activity of Arg82/ArgR111 is not required for the regulation of the arginine metabolism in yeast  
*FEBS Lett.* 486, 300 – 304
- Dutta D. (2000)  
Mechanism of store-operated calcium entry  
*J. Biosci.* 25, 397 - 404
- El Bakkoury M., Dubois E., Messenguy F. (2000)  
Recruitment of the yeast MADS-box proteins, ArgR1 and Mcm1 by the pleiotropic factor ArgR111 is required for their stability  
*Mol. Microbiol.* 35, 15 – 31
- Erneux C., Roeckel N., Takazawa K., Mailleux P., Vassart G., Mattei M.G. (1992)  
Localization of the genes for human inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase A (ITPKA) and B (ITPKB) to chromosome regions 15q14-q21 and 1q41-q43, respectively, by in situ hybridisation  
*Genomics* 14, 546 - 547

- Erneux C., Moreau C., Vandermeers A., Takazawa K. (1993)  
Interaction of calmodulin with a putative calmodulin-binding domain of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase. Effects of synthetic peptides and site-directed mutagenesis of Trp165  
*Eur. J. Biochem.* 214, 497 – 501
- Erneux C., Govaerts C., Communi D., Pesesse X. (1998)  
The diversity and possible functions of the inositol polyphosphate 5-phosphatases  
*Biochim. Biophys. Acta* 1436, 185-199
- Fadool D.A., Ache B.W. (1994)  
Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate-gated channels interact with inositol 1,4,5-trisphosphate-gated channels in olfactory receptor neurons  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 9, 9471 - 9473
- Feng Y., Wenthe S.R., Majerus P.W. (2001)  
Overexpression of the inositol phosphatase SopB in human 293 cells stimulates cellular chloride influx and inhibits nuclear mRNA export  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 875 - 879
- Fleischer B., Xie J., Mayrleitner M., Shears S.B., Palmer D.J., Fleischer S. (1994)  
Golgi coatomer binds, and forms K(+)-selective channels gated by, inositol polyphosphates  
*J. Biol. Chem.* 269, 17826 – 17832
- French P.J., Bunce C.M., Stephens L.R., Lord J.M., McConnell F.M., Brown G., Creba J.A., Michell R.H. (1991)  
Changes in the levels of inositol lipids and phosphates during the differentiation of HL60 promyelocytic cells towards neutrophils or monocytes  
*Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 245, 193 - 201
- Friedrich O. (2001)  
Biochemische und funktionelle Charakterisierung des potentiellen Calciumionenkanalproteins Maus Transient Receptor Potential 1 $\beta$  (mTRP1 $\beta$ )  
Dissertation Universität Bielefeld
- Furuichi T., Simon-Chazottes D., Fujino I., Yamada N., Hasegawa M., Miyawaki A., Yoshikawa S., Guenet J.L., Mikoshiba K. (1993)  
Widespread expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 gene (Insp3r1) in the mouse central nervous system  
*Receptor Channels* 1, 11 - 24
- Gaidarov I., Chen Q., Falck J.R., Reddy K.K., Keen J.H. (1996)  
A functional phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate/phosphoinositide binding domain in the clathrin adaptor AP-2 alpha subunit. Implications for the endocytic pathway.  
*J. Biol. Chem.* 271, 20922 – 20929
- Go M., Uchida T., Takazawa K., Endo T., Erneux C., Mailleux P., Onaya T. (1993)  
Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase highest levels in the dendritic spines of cerebellar Purkinje cells and hippocampal CA1 pyramidal cells. A pre- and post-embedding immunoelectron microscopic study  
*Neurosci. Lett.* 158, 135 – 138
- Grishin N.V. (1999)  
Phosphatidylinositol phosphate kinase: a link between protein kinase and glutathione synthase fold  
*J. Mol. Biol.* 291, 293 - 247
- Guse A.H., Roth E., Emmrich F. (1992)  
D-myo-inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate releases Ca<sup>2+</sup> from crude microsomes and enriched vesicular plasma membranes, but not from intracellular stores of permeabilized T-lymphocytes and monocytes  
*Biochem. J.* 288, 489 - 495

- Guse A.H., Greiner E., Emmrich F., Brand K. (1993)  
Mass changes of inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate and inositol hexakisphosphate during cell cycle progression in rat thymocytes  
*J. Biol. Chem.* 268, 7129 - 7133
- Haefs M. (1994)  
Reinigung, Charakterisierung und Klonierung der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase aus Hühnererythrozyten  
Dissertation (Fakultät für Biologie; Ruhr-Universität Bochum)
- Hagopian J.C., Kirtley M.P., Stevenson L.M., Gergis R.M., Russo A.A., Pavletich N.P., Parsons S.M., Lew J. (2001)  
Kinetic basis for activation of CDK2/cyclin A by phosphorylation  
*J. Biol. Chem.* 276, 275 - 280
- Hanahan D. (1983)  
Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids  
*J. Mol. Biol.* 166, 557 - 580
- Hanakahi L.A., Bartlet-Jones M., Chappell C., Pappin D., West S.C. (2000)  
Binding of inositol phosphate to DNA-PK and stimulation of double-strand break repair  
*Cell* 102, 721 - 729
- Hao W., Tan Z., Prasad K., Reddy K.K., Chen J., Prestwich G.D., Falck J.R., Shears S.B., Lafer E.M. (1997)  
Regulation of AP-3 function by inositides. Identification of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate as a potent ligand.  
*J. Biol. Chem.* 272, 6393 - 6398
- Harteneck C., Plant T.D., Schultz G. (2000)  
From worm to man: three subfamilies of trp channels  
*Trends Neurosci.* 23, 159 - 166
- Hawkins P.T., Poyner D.R., Jackson T.R., Letcher A.J., Lander D.A., Irvine R.F. (1993)  
Inhibition of iron-catalysed hydroxyl radical formation by inositolpolyphosphates: a possible physiological function for myo-inositolhexakisphosphate  
*Biochem. J.* 294, 929 - 934
- Hermosura M.C., Takeuchi H., Fleig A., Riley A.M., Potter B.V., Hirata M., Penner R. (2000)  
InsP4 facilitates store-operated calcium influx by inhibition of InsP3 5-phosphatase  
*Nature* 408, 735 - 740
- Higashida H., Taketo M., Takahashi H., Yokoyama S., Hashii M. (1999)  
Potential mechanism for bradykinin-activated and inositol tetrakisphosphate-dependent  $Ca^{2+}$  influx by Ras and GAP1 in fibroblast cells  
*Immunopharmacology* 45, 7 - 11
- Hillemeier K. (2001)  
Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase: Identifizierung und zelluläre Effekte pflanzlicher Hemmstoffe sowie Erstellung eines Substratselektivitätsprofils  
Dissertation; Fachbereich Chemie, Universität Hamburg
- Hilton J.M., Plomann M., Ritter B., Modregger J., H.N. Freeman, Falk J.R., Murali Krishna U., Tobin A.B. (2001)  
Phosphorylation of a synaptic vesicle associated protein by an inositol hexakisphosphate-regulated protein kinase  
*J. Biol. Chem.* 276, 16341 - 16347
- Hirata M., Yanaga F., Koga T., Ogasawara T., Watanabe Y., Ozaki S. (1990)  
Stereospecific recognition of inositol 1,4,5-trisphosphate analogs by the phosphatase, kinase, and binding proteins  
*J. Biol. Chem.* 265, 8404 - 8407

- Hirata M., Watanabe Y., Kanematsu T., Ozaki S., Koga T. (1995)  
D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate analogues substituted at the 3-hydroxyl group  
*Biochem. Biophys. Acta* 1244, 404 – 410
- Ho M.M., Kaetzel M.A., Armstrong D.L., Shears S.B. (2001)  
Regulation of a human chloride channel: A paradigm for integrating input from calcium, CaMKII and Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub>  
*J. Biol. Chem.* 276, 18673 - 18680
- Hogan S.P., Foster P.S., Hansbro P.M., Ozaki S., Denborough M.A. (1994)  
Detection and partial purification of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase from porcine skeletal muscle  
*Cell. Signal.* 6, 233 - 243
- Ibata K., Fukuda M., Mikoshiba K. (1998)  
Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate binding activities of neuronal and non-neuronal synaptotagmins. Identification of conserved amino acid substitutions that abolish inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate binding to synaptotagmins III, V, and X.  
*J. Biol. Chem.* 273, 12267 – 12273
- Inhorn R.C., Majerus P.W. (1987a)  
Inositol polyphosphate 1-phosphatase from calf brain. Purification and inhibition by Li<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and Mn<sup>2+</sup>.  
*J. Biol. Chem.* 262, 15946 - 15952
- Inhorn R.C., Bansal V.S., Majerus P.W. (1987b)  
Pathway for inositol 1,3,4-trisphosphate and 1,4-bisphosphate metabolism  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 84, 2170 - 2174
- Inhorn R.C., Majerus P.W. (1988)  
Properties of inositol polyphosphate 1-phosphatase  
*J. Biol. Chem.* 263, 14559 - 14565
- Irvine R.F., McNulty T.J., Schell M.J. (1999)  
Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate as a second messenger – a special role in neurons ?  
*Chem. Phys. Lipids* 98, 49 – 57
- Irvine R.F., Schell M.J. (2001)  
Back in the water: the return of the inositol phosphates  
*Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 327 - 338
- Ismailov I.I., Fuller C.M., Berdiev B.K., Shlyonsky V.G., Benos D.J., Barrett K.E. (1996)  
A biologic function for an "orphan" messenger: D-myo-inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate selectively blocks epithelial calcium-activated chloride channels  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93, 10505 - 10509
- Itoh T., Koshiba S., Kigawa T., Kikuchi A., Yokoyama S., Takenawa T. (2001)  
Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis  
*Science* 291, 1047 - 1051
- Ives E.B., Nichols J., Wente S.R., York J.D. (2000)  
Biochemical and functional characterization of inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinases  
*J. Biol. Chem.* 275, 36575 - 36583
- Johanson R.A., Hansen C.A., Williamson J.R. (1988)  
Purification of D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase from rat brain  
*J. Biol. Chem.* 263, 7465 – 7471
- Johnson L.N., Lowe E.D., Noble M.E.M., Owen D.J. (1998)  
The structural basis for substrate recognition and control by protein kinases  
*FEBS Lett.* 430, 1-11

- Jun K., Choi G., Yang S.G., Choi K.Y., Kim H., Chan G.C., Storm D.R., Albert C., Mayr G.W., Lee C.J., Shin H.S. (1998)  
Enhanced hippocampal CA1 LTP but normal spatial learning in inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase(a)-deficient mice  
*Learn. Mem.* 5, 317 – 330
- Kavran J.M., Klein D.E., Lee A., Falasca M., Isakoff S.J., Skolnik E.Y., Lemmon M.A. (1998)  
Specificity and promiscuity in phosphoinositide binding by pleckstrin homology domains  
*J. Biol. Chem.* 273, 30497 – 30508
- Kawasaki H., Kawashima S. (1996)  
Regulation of the calpain-calpastatin system by membranes  
*Mol. Membr. Biol.* 13, 217 - 224
- Klein J., Meinecke R., Mayer M., Meyer B. (1999)  
Detecting binding affinity to immobilized receptor proteins in compound libraries by HR-MAS STD-NMR  
*J. Am. Chem. Soc.* 121, 5336 - 5337
- Laemmli, U.K. (1970)  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4  
*Nature* 227, 680–685
- Larsson O., Barker C.J., Sjöholm A., Carlqvist H., Michell R.H., Bertorello A., Nilsson T., Honkanen R.E., Mayr G.W., Zwiller J., Berggren P.O. (1997)  
Inhibition of phosphatases and increased Ca<sup>2+</sup> channel activity by inositol hexakisphosphate  
*Science*, 278, 471 - 474
- Lee S.Y., Sim S.S., Kim J.W., Moon K.H., Kim J.H., Rhee S.G. (1990)  
Purification and properties of D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase from rat brain. Susceptibility to calpain.  
*J. Biol. Chem.* 265, 9434 – 9440
- Lemmon M.A., Ferguson K.M. (2000)  
Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains  
*Biochem. J.* 350, 1 - 18
- Li S., Satoh H., Watanabe T., Nakamura S., Hattori S. (1996)  
cDNA cloning and chromosomal mapping of a novel human GAP (GAP1M), a GTPase-activating protein of Ras  
*Genomics* 35, 625-627
- Lietzke S.E., Bose S., Cronin T., Klarlund J., Chawla A., Czech M.P., Lambright D.G. (2000)  
Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains  
*Mol. Cell.* 6, 385 – 394
- Lin A.N., Barnes S., Wallace R.W. (1990)  
Phosphorylation by protein kinase C inactivates an inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase purified from human platelets  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170, 1371 - 1376
- Lin A.N., Wallace R.W., Barnes S. (1993)  
Purification and properties of a human platelet inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase  
*Arch. Biochem. Biophys.* 303, 412 – 420
- Lintschinger B., Balzer-Geldsetzer M., Baskaran T., Graier W.F., Romanin C., Zhu M.X., Groschner K. (2000)  
Coassembly of trp1 and trp3 proteins generates diacylglycerol- and Ca<sup>2+</sup>-sensitive cation channels  
*J. Biol. Chem.* 275, 27799 - 27805

- Llinas R., Sugimori M., Lang E.J., Morita M., Fukuda M., Niinobe M., Mikoshiba K. (1994)  
The inositol high-polyphosphate series blocks synaptic transmission by preventing vesicular fusion: a squid giant synapse study  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12990 - 12993
- Lockwich T.P., Liu X., Singh B.B., Jadowicz J., Weiland S., Ambudkar I.S. (2000)  
Assembly of trp1 in a signaling complex associated with caveolin-scaffolding lipid raft domains  
*J. Biol. Chem.* 275, 11934 - 11942
- Lockyer P.J., Bottomley J.R., Reynolds J.S., McNulty T.J., Venkateswarlu K., Potter B.V., Dempsey C.E., Cullen P.J. (1997)  
Distinct subcellular localisations of the putative inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptors GAP1IP4BP and GAP1m result from the GAP1IP4BP PH domain directing plasma membrane targeting  
*Curr. Biol.* 7, 1007 - 1010
- Loomis-Husselbee J.W., Walker C.D., Bottomley J.R., Cullen P.J., Irvine R.F., Dawson A.P. (1998)  
Modulation of Ins(2,4,5)P<sub>3</sub>-stimulated Ca<sup>2+</sup> mobilization by Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>: enhancement by activated G-proteins, and evidence for the involvement of a GAP1 protein, a putative Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> receptor  
*Biochem. J.* 331, 947 - 952
- Lowe E.D., Noble M.E., Skamnaki V.T., Oikonomakos N.G., Owen D.J., Johnson L.N. (1997)  
The crystal structure of a phosphorylase kinase peptide substrate complex: kinase substrate recognition  
*EMBO J.* 16, 6646 - 6658
- Lu X., Fein A., Feinstein M.B., O'Rourke F.A. (1999)  
Antisense knock out of the inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptor GAP1(IP4BP) in the human erythroleukemia cell line leads to the appearance of intermediate conductance K(Ca) channels that hyperpolarize the membrane and enhance calcium influx  
*J. Gen. Physiol.* 113, 81 - 96
- Lückhoff A., Clapham D.E. (1992)  
Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates an endothelial Ca<sup>2+</sup>-permeable channel  
*Nature* 355, 356 - 358
- Luo H.R., Saiardi A., Nagata E., Ye K., Yu H., Jung T.S., Luo X., Jain S., Sawa A., Snyder S.H. (2001)  
GRAB: a physiologic guanine nucleotide exchange factor for Rab3A, which interacts with inositol hexakisphosphate kinase  
*Neuron* 31, 439 - 451
- Luo H.R., Saiardi A., Yu H., Nagata E., Ye K., Snyder S.H. (2002)  
Inositol pyrophosphates are required for DNA hyperrecombination in protein kinase c1 mutant yeast  
*Biochemistry* 41, 2509 - 2515
- Ma Y., Lieber M.R. (2002)  
Binding of Inositol Hexakisphosphate (IP6) to Ku But Not to DNA-PKcs  
*J. Biol. Chem.* 277, 10756 - 10759
- Maaheimo H., Kosma P., Brade L., Brade H., Peters T. (2000)  
Mapping the binding of synthetic disaccharides representing epitopes of chlamydial lipopolysaccharide to antibodies with NMR  
*Biochemistry* 39, 12778 - 12788
- Maeda N., Niinobe M., Mikoshiba K. (1990)  
A cerebellar Purkinje cell marker P400 protein is an inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3) receptor protein. Purification and characterization of InsP3 receptor complex.  
*EMBO J.* 9, 61-67

- Mailleux P., Takazawa K., Erneux C., Vanderhaeghen J.J. (1991)  
Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase distribution in the rat brain. High levels in the hippocampal CA1 pyramidal and cerebellar Purkinje cells suggest its involvement in some memory processes  
*Brain Res.* 539, 203 – 210
- Mailleux P., Takazawa K., Erneux C., Vanderhaeghen J.J. (1992)  
Comparison of neuronal inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase and receptor mRNA distributions in the adult rat brain using in situ hybridization biochemistry  
*Neuroscience* 49, 577 – 590; *Neurosci. Lett.* 137, 69 – 71
- Mailleux P., Takazawa K., Erneux C., Vanderhaeghen J.J. (1993)  
Distribution of the neurons containing inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase and its messenger RNA in the developing rat brain  
*J. Comp. Neurol.* 327, 618 – 629
- Mayer M., Meyer B. (1999)  
Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy  
*Angew. Chem. Int. Ed.* 111, 1902 - 1906
- Mayer M. (2001)  
STD-NMR-Spektroskopie: Eine neue Methode zur Identifizierung und Charakterisierung von Ligand-Rezeptor-Interaktionen  
Dissertation; Fachbereich Chemie, Universität Hamburg
- Mayr G.W. (1990)  
Mass determination of inositol phosphates by High-Performance Liquid Chromatography with postcolumn complexometry (Metal-Dye Detection)  
*Methods in Inositide Research*, edited by R.F. Irvine, Raven Press, Ltd., New York
- Mehrotra B., Elliott J.T., Chen J., Olzewski J.D., Profit A.A., Chaudhary A., Fukuda M., Mikoshiba K., Prestwich G.D. (1997)  
Selective photoaffinity labeling of the inositol polyphosphate binding C2B domains of synaptotagmins  
*J. Biol. Chem.* 272, 4237 – 4244
- Mehrotra B., Myszka D.G., Prestwich G.D. (2000)  
Binding kinetics and ligand specificity for the interactions of the C2B domain of synaptotagmin II with inositol polyphosphates and phosphoinositides  
*Biochemistry* 39, 9679 – 9686
- Meinecke R., Meyer B. (2001)  
Determination of the binding specificity of an integral membrane protein by saturation transfer difference NMR: RGD peptide ligands binding to integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3  
*J. Med. Chem.* 44, 3059 - 3065
- Mignery G.A., Sudhof T.C. (1990)  
The ligand binding site and transduction mechanism in the inositol 1,4,5 triphosphate receptor  
*EMBO J.* 9, 3893-3898
- Mikoshiba K. (1997)  
The InsP3 receptor and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signalling  
*Current Opinion in Neurobiology* 7, 339-345
- Mikoshiba K., Fukuda M., Iyata K., Kabayama H., Mizutani A. (1999)  
Role of synaptotagmin, a  $\text{Ca}^{2+}$  and inositol phosphate binding protein, in neurotransmitter release and neurite outgrowth  
*Chem. Phys. Lipids* 98, 59 - 67
- Miyawaki A., Furuichi T., Ryou Y., Yoshikawa S., Nakagawa T., Saitoh T., Mikoshiba K. (1991)  
Structure-function relationships of the mouse inositol 1,4,5-trisphosphate receptor  
*Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 4911-4915

- Mizutani A., Fukuda M., Niinobe M., Mikoshiba K. (1997)  
Regulation of AP-2-synaptotagmin interaction by inositol high polyphosphates  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240, 128 – 131
- Mochida S., Fukuda M., Niinobe M., Kobayashi H., Mikoshiba K. (1997)  
Roles of synaptotagmin C2 domains in neurotransmitter secretion and inositol high-polyphosphate binding at mammalian cholinergic synapses  
*Neuroscience* 77, 937 – 943
- Moran M.F., Koch C.A., Sadowski I., Pawson T. (1988)  
Mutational analysis of a phosphotransfer motif essential for v-fps tyrosine kinase activity  
*Oncogene* 3, 665 - 672
- Morris A.J., Murray K.J., England P.J., Downes C.P., Michell R.H. (1988)  
Partial purification and some properties of rat brain inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase  
*Biochem. J.* 251, 157 – 163
- Morrison B.H., Bauer J.A., Kalvakolanu D.V., Lindner D.J. (2001)  
Inositol hexakisphosphate kinase 2 mediates growth suppressive and apoptotic effects of interferon-beta in ovarian carcinoma cells  
*J. Biol. Chem.* 276, 24965 - 24970
- Morrison B.H., Bauer J.A., Hu J., Grane R.W., Ozdemir A.M., Chawla-Sarkar M., Gong B., Almasan A., Kalvakolanu D.V., Lindner D.J. (2002)  
Inositol hexakisphosphate kinase 2 sensitizes ovarian carcinoma cells to multiple cancer therapeutics  
*Oncogene* 21, 1882 - 1889
- Mourey R.J., Estevez V.A., Marecek J.F., Barrow R.K., Prestwich G.D., Snyder S.H. (1993)  
Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: labeling the inositol 1,4,5-trisphosphate binding site with photoaffinity ligands  
*Biochemistry* 32, 1719 - 1726
- Natsume T., Hirota J., Yoshikawa F., Furuichi T., Mikoshiba K. (1999)  
Real time analysis of interaction between inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type I and its ligand  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260, 527 - 533
- Newton C.L., Mignery G.A., Sudhof T.C. (1994)  
Co-expression in vertebrate tissues and cell lines of multiple inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP<sub>3</sub>) receptors with distinct affinities for InsP<sub>3</sub>  
*J. Biol. Chem.* 269, 28613-28619
- Nilius B., Prenen J., Voets T., Eggermont J., Bruzik K.S., Shears S.B., Droogmans G. (1998)  
Inhibition by inositol tetrakisphosphates of calcium- and volume-activated Cl<sup>-</sup> currents in macrovascular endothelial cells  
*Pflugers Arch.*, 435, 637 - 644
- Norris F.A., Ungewickell E., Majerus P.W. (1995)  
Inositol hexakisphosphate binds to clathrin assembly protein 3 (AP-3/AP180) and inhibits clathrin cage assembly in vitro  
*J. Biol. Chem.* 270, 214 – 217
- Odom A.R., Stahlberg A., Wenthe S.R., York J.D. (2000)  
A role for nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate kinase in transcriptional control  
*Science* 287, 2026 – 2029
- O'Neil K.T., DeGrado W.F. (1990)  
How calmodulin binds its targets: sequence independent recognition of amphiphilic alpha-helices  
*Trends Biochem. Sci.* 15, 59 – 64

- Ornstein, L. (1964)  
Disc electrophoresis-I: Background and theory  
*Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 321–349
- O'Rourke F., Matthews E., Feinstein M.B. (1996)  
Isolation of InsP<sub>4</sub> and InsP<sub>6</sub> binding proteins from human platelets: InsP<sub>4</sub> promotes Ca<sup>2+</sup> efflux from inside-out plasma membrane vesicles containing 104 kDa GAP1IP4BP protein  
*Biochem. J.* 315, 1027 – 1034
- Peng Y.F., Mandai K., Sakisaka T., Okabe N., Yamamoto Y., Yokoyama S., Mizoguchi A., Shiozaki H., Monden M., Takai Y. (2000)  
Ankyrcorbin: a novel actin cytoskeleton-associated protein  
*Genes Cells* 5, 1001 – 1008
- Phillippy B.Q., Graf E. (1997)  
Antioxidant functions of inositol 1,2,3-trisphosphate and inositol1,2,3,6-tetrakisphosphate  
*Free Radic. Biol. Med.* 22, 939-46
- Picard V., Ersdal-Badju E., Lu A., Bock S.C. (1994)  
A rapid and efficient one-tube PCR-based mutagenesis technique using Pfu DNA polymerase  
*Nucleic Acids Res.* 22, 2587 - 2591
- Powe A.C. Jr., Strathdee D., Cutforth T., D'Souza-Correia T., Gaines P., Carlson J., Gaul U. (1999)  
In vivo functional analysis of Drosophila Gap1: involvement of Ca<sup>2+</sup> and IP4 regulation  
*Mech. Dev.* 81, 89 - 101
- Profit A.A., Chen J., Gu Q.M., Chaudhary A., Prasad K., Lafer E.M., Prestwich G.D. (1998)  
Probing the phosphoinositide binding site of the clathrin assembly protein AP-2 with photoaffinity labels  
*Arch. Biochem. Biophys.* 357, 85 – 94
- Putney J.W., Broad L.M., Braun F.-J., Lievreumont J.-P., Bird G. St. J. (2001)  
Mechanisms of capacitative calcium entry  
*Journal of Cell Science* 114, 2223 - 2229
- Randriamampita C., Tsien R.Y. (1993)  
Emptying of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores releases a novel small messenger that stimulates Ca<sup>2+</sup> influx  
*Nature* 364, 809 - 814
- Rapoport I., Miyazaki M., Boll W., Duckworth B., Cantley L.C., Shoelson S., Kirchhausen T. (1997)  
Regulatory interactions in the recognition of endocytic sorting signals by AP-2 complexes  
*EMBO J.* 16, 2240 – 2250
- Ravishankar R., Suguna K., Surolia A., Vijayan M. (1999)  
Structures of the complexes of peanut lectin with methyl-beta-galactose and N- acetyllactosamine and a comparative study of carbohydrate binding in Gal/Galnac-specific legume lectins  
*Acta Crystallogr., Sect.D* 55, 1375 - 1382
- Rebecchi M.J., Scarlata S. (1998)  
Pleckstrin homology domains: a common fold with diverse functions  
*Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27, 503 - 528
- Rechsteiner M. (1990)  
PEST sequences are signals for rapid intracellular proteolysis  
*Semin. Cell. Biol.* 1, 433 - 440
- Rosado J.A., Sage S.O. (2001)  
Activation of store-mediated calcium entry by secretion-like coupling between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type II and human transient receptor potential (hTrp1) channels in human platelets  
*Biochem. J.* 356, 191 - 198

- Runnels L.W., Yue L., Clapham D.E. (2001)  
TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities  
*Science* 291, 1043 - 1047
- Russo A.A., Jeffrey P.D., Pavletich N.P. (1996)  
Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation  
*Nat. Struct. Biol.* 3, 696 - 700
- Safrany S.T., Sawyer D., Wojcikiewicz R.J., Nahorski S.R., Potter B.V. (1990)  
Ca<sup>2+</sup>-mobilising properties of synthetic fluoro-analogues of myo-inositol 1,4,5-trisphosphate and their interaction with myo-inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase and 5-phosphatase  
*FEBS Lett.* 276, 91 - 94
- Safrany S.T., Wojcikiewicz R.J., Strupish J., Nahorski S.R., Dubreuil D., Cleophax J., Gero S.D., Potter B.V. (1991)  
Interaction of synthetic D-6-deoxy-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate with the Ca<sup>2+</sup>-releasing D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, and the metabolic enzymes 5-phosphatase and 3-kinase  
*FEBS Lett.* 278, 252 - 256
- Safrany S.T., Sawyer D.A., Nahorski S.R., Potter B.V. (1992a)  
Synthetic D- and L-enantiomers of 2,2-difluoro-2-deoxy-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate interact differently with myo-inositol 1,4,5-trisphosphate binding proteins: identification of a potent small molecule 3-kinase inhibitor  
*Chirality* 4, 415 - 422
- Safrany S.T., Wilcox R.A., Liu C., Potter B.V., Nahorski S.R. (1992b)  
3-position modification of myo-inositol 1,4,5-trisphosphate: consequences for intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilisation and enzyme recognition  
*Eur. J. Pharmacol.* 226, 265 - 272
- Saiardi A., Erdjument-Bromage H., Snowman A.M., Tempst P., Snyder S.H. (1999)  
Synthesis of diphosphoinositol pentakisphosphate by a newly identified family of higher inositol polyphosphate kinase  
*Curr. Biol.* 9, 1323- 1326
- Saiardi A., Caffrey J.J., Snyder S.H., Shears S.B. (2000a)  
Inositol polyphosphate multikinase (ArgR111) determines nuclear mRNA export in *Saccharomyces cerevisiae*  
*FEBS Lett.* 468, 28 - 32
- Saiardi A., Caffrey J.J., Snyder S.H., Shears S.B. (2000b)  
The inositol hexakisphosphate kinase family. Catalytic flexibility and function in yeast vacuole biogenesis  
*J. Biol. Chem.* 275, 24686 - 24692
- Saiardi A., Nagata E., Luo H.R., Sawa A., Luo X., Snowman A.M., Snyder S.H. (2001a)  
Mammalian inositol polyphosphate multikinase synthesizes inositol 1,4,5-trisphosphate and an inositol pyrophosphate  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98, 2306 - 2311
- Saiardi A., Nagata E., Luo H.R., Snowman A.M., Snyder S.H. (2001b)  
Identification and characterization of a novel inositol hexakisphosphate kinase  
*J. Biol. Chem.* 276, 39179 - 39185
- Sakura H., Ashcroft F.M. (1997)  
Identification of four trp1 gene variants murine pancreatic beta-cells  
*Diabetologia* 40, 528 - 532
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977)  
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 74, 5463 - 5467

- Santella L., Kyojuka K., De Riso L., Carafoli E. (1998)  
Calcium, protease action, and the regulation of the cell cycle  
*Cell Calcium* 23, 123 - 130
- Schell M.J., Erneux C., Irvine R.F. (2001)  
Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase A associates with F-actin and dendritic spines via Its N terminus  
*J. Biol. Chem.* 276, 37537 - 37546
- Scholz P., Bergmann G., Mayr G.W. (1990)  
Nuclear magnetic resonance spectroscopy of myo-inositol phosphates  
*Methods in Inositide Research*, edited by Robin F. Irvine, Raven Press, Ltd., New York
- Sedgwick S.G., Smerdon S.J. (1999)  
The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework  
*Trends Biochem. Sci.* 24, 311 - 316
- Shamsuddin A.M. (1999)  
Metabolism and cellular functions of IP<sub>6</sub>: a review  
*Anticancer Res.* 19, 3733 - 3736
- Shirakawa H., Miyazaki S. (1995)  
Evidence for inositol tetrakisphosphate-activated Ca<sup>2+</sup> influx pathway refilling inositol trisphosphate-sensitive Ca<sup>2+</sup> stores in hamster eggs  
*Cell Calcium* 17, 1 - 13
- Sim S.S., Kim J.W., Rhee S.G. (1990)  
Regulation of D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C  
*J. Biol. Chem.* 265, 10367 - 10372
- Simons K., Ikonen E. (1997)  
Functional rafts in cell membranes  
*Nature* 387, 569 - 572
- Skamnaki V.T., Owen D.J., Noble M.E.M., Lowe E.D., Lowe G., Oikonomakos N.G., Johnson L.N. (1999)  
Catalytic mechanism of phosphorylase kinase probed by mutational studies  
*Biochemistry* 38, 14718 - 14730
- Smith P.M., Harmer A.R., Letcher A.J., Irvine R.F. (2000)  
The effect of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate on inositol trisphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> mobilization in freshly isolated and cultured mouse lacrimal acinar cells  
*Biochem. J.* 347, 77 - 82
- Soriano S., Thomas S., High S., Griffiths G., D`Santos C., Cullen P. (1997a)  
Membran association, localization and topology of rat inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B: implications for membrane traffic and Ca<sup>2+</sup> homeostasis  
*Biochem. J.* 324, 579 - 589
- Soriano S., Banting G. (1997b)  
Hypothesis: possible roles of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B in calcium homeostasis  
*FEBS Letters* 403, 1-4
- Stack J.H., Emr S.D. (1994)  
Vps34p required for yeast vacuolar protein sorting is a multiple specificity kinase that exhibits both protein kinase and phosphatidylinositol-specific PI 3-kinase activities  
*J. Biol. Chem.* 269, 31552 - 31562
- Strubing C., Krapivinsky G., Krapivinsky L., Clapham D.E. (2001)  
TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain  
*Neuron* 29, 645 - 655

- Süße S. (1998)  
Herstellung von Fusionsgenen mit dem grünen fluoreszierenden Protein (GFP) zur Charakterisierung der subzellulären Topologie von Inositoltrisphosphat 3-Kinase  
Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Universität Hamburg
- Supattapone S., Worley, P.F., Baraban J.M., Snyder S.H. (1988)  
Solubilization, purification and characterization of an inositol trisphosphate receptor  
*J. Biol. Chem.* 263, 1530-1534
- Takazawa K., Passareiro H., Dumont J.E., Erneux C. (1989)  
Purification of bovine brain inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase. Identification of the enzyme by sodium dodecyl sulphate/polyacrylamide-gel electrophoresis  
*Biochem. J.* 261, 483 – 488
- Takazawa K., Lemos M., Delvaux A., Lejeune C., Dumont J.E., Erneux C. (1990a)  
Rat brain inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase.  $Ca^{2+}$  - sensitivity, purification and antibody production  
*Biochem. J.* 268, 213 – 217
- Takazawa K., Vandekerckhove J., Dumont J.E., Erneux C. (1990b)  
Cloning and expression in *Escherichia coli* of a rat brain cDNA encoding a  $Ca^{2+}$ /calmodulin-sensitive inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase  
*Biochem. J.* 272, 107 – 112
- Takazawa K., Perret J., Dumont J.E., Erneux C. (1990c)  
Human brain inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase cDNA sequence  
*Nucleic Acids Res.* 18, 7141
- Takazawa K., Perret J., Dumont J.E., Erneux C. (1991a)  
Molecular cloning and expression of a human brain inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174, 529 – 535
- Takazawa K., Perret J., Dumont J.E., Erneux C. (1991b)  
Molecular cloning and expression of a new putative inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase iso-enzyme  
*Biochem. J.* 278, 883 – 886
- Takazawa K., Erneux C. (1991c)  
Identification of residues essential for catalysis and binding of calmodulin in rat brain inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase  
*Biochem. J.* 280, 125 - 129
- Takenawa T., Itoh T. (2001)  
Phosphoinositides, key molecules for regulation of actin cytoskeletal organization and membrane traffic from the plasma membrane  
*Biochim. Biophys. Acta* 1533, 190 - 206
- Taketo M., Yokoyama S., Fukuda M., Mikoshiba K., Higashida H. (1997)  
Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphate binding sites in control and ras-transformed NIH/3T3 fibroblasts  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239, 349 – 352
- Tan Z., Bruzik K.S., Shears S.B. (1997)  
Properties of the inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate 1-kinase purified from rat liver. Regulation of enzyme activity by inositol 1,3,4-trisphosphate.  
*J. Biol. Chem.* 272, 2285 – 2290
- Thomas S., Brake B., Luzio J.P., Stanley K., Banting G. (1994)  
Isolation and sequence of a full-length cDNA encoding a novel inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase  
*Biochim. Biophys. Acta* 1220, 219 - 222

- Thomas S., Soriano S., D`Santos C., Banting G. (1996)  
Expression of recombinant rat myo-inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B suggests a regulatory role for its N-terminus  
*Biochem. J.* 319, 713 – 716
- Timerman A.P., Mayrleitner M.M., Lukas T.J., Chadwick C.C., Saito A., Watterson D.M., Schindler H., Fleischer S. (1992)  
Inositol polyphosphate receptor and clathrin assembly protein AP-2 are related proteins that form potassium-selective ion channels in planar lipid bilayers  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 8976 – 8980
- Togashi S., Takazawa K., Endo T., Erneux C., Onaya T. (1997)  
Structural identification of the myo-inositol 1,4,5-trisphosphate-binding domain in rat brain inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase  
*Biochem. J.* 326, 221 –225
- Trepakova E.S., Csutora P., Hunton D.L., Marchase R.B., Cohen R.A., Bolotina V.M. (2000)  
Calcium influx factor (CIF) directly activates store-operated cation channels in vascular smooth muscle cells  
*J. Biol. Chem.* 275, 26158 - 63261
- Van Dijken P., Lammers A.A., Ozaki S., Potter B.V., Erneux C., Van Haastert P.J. (1994)  
Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate analogues by 3-kinase and dephosphorylation of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate analogues by 5-phosphatase  
*Eur. J. Biochem.* 226, 561 - 566
- Vanweyenbergh V., Communi D., D`Santos C.S., Erneux C. (1995)  
Tissue- and cell-specific expression of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-kinase isoenzymes  
*Biochem. J.* 306, 429 – 435
- Vogelmaier S.M., Keen J.H., Murphy J.E., Ferris C.D., Prestwich G.D., Snyder S.H., Theibert A.B. (1992)  
Inositol hexakisphosphate receptor identified as the clathrin assembly protein AP-2  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 158 – 163
- Walker E.H., Perisic O., Ried C., Stephens L., Williams R.L. (1999)  
Structural insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling  
*Nature* 402, 313 - 319
- Wang X.L., Akhtar R.A., Abdel-Latif A.A. (1995)  
Purification and properties of D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase from bovine iris sphincter smooth muscle: effects of protein phosphorylation in vitro and in intact muscle  
*Biochem. J.* 308, 1009 – 1016
- Weimar T., Bukowski R., Young N.M. (2000)  
The conformation of the T-antigen Disaccharide bound to *Maclura pomifera* agglutinin in aqueous solution  
*J. Biol. Chem.* 275, 37006 - 37010
- Wes P.D., Chevesich J., Jeromin A., Rosenberg C., Stetten G., Montell C. (1995)  
TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9652 - 9656
- White A.M., Varney M.A., Watson S.P., Rigby S., Liu C.S., Ward J.G., Reese C.B., Graham H.C., Williams R.J. (1991)  
Influence of Mg<sup>2+</sup> and pH on n.m.r. spectra and radioligand binding of inositol 1,4,5-trisphosphate  
*Biochem. J.* 278, 759 - 764
- Wilmann M., Gautel M., Mayans O. (2000)  
Activation of calcium/calmodulin regulated kinases  
*Cell. Mol. Biol.* 46, 883 - 894

- Wilson M.P., Majerus P.W. (1996)  
Isolation of inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase, cDNA cloning and expression of the recombinant enzyme  
*J. Biol. Chem.* 271, 11904 - 11910
- Wilson M.P., Majerus P.W. (1997)  
Characterization of a cDNA encoding *Arabidopsis thaliana* inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232, 678 - 681
- Wilson M.P., Sun Y., Cao L., Majerus P.W. (2001)  
Inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase is a protein kinase that phosphorylates the transcription factors c-Jun and ATF-2  
*J. Biol. Chem.* 276, 40998 - 41004
- Woodring P.J., Garrison J.C. (1997)  
Expression, purification, and regulation of two isoforms of the inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase  
*J. Biol. Chem.* 272, 30447 - 30454
- Wu X., Babnigg G., Villereal M.L. (2000)  
Functional significance of human trp1 and trp3 in store-operated Ca(2+) entry in HEK-293 cells.  
*Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 278, C526-36
- Wymann M.P., Pirola L. (1998)  
Structure and function of phosphoinositide 3-kinases  
*Biochem. Biophys. Acta* 1436; 127 -150
- Xie W., Kaetzel M.A., Bruzik K.S., Dedman J.R., Shears S.B., Nelson D.J. (1996)  
Inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate inhibits the calmodulin-dependent protein kinase II-activated chloride conductance in T84 colonic epithelial cells  
*J. Biol. Chem.* 271, 14092 - 14097
- Xie W., Solomons K.R.H., Freeman S., Kaetzel M.A., Bruzik K.S., Nelson D.J., Shears S.B. (1998)  
Regulation of Ca<sup>2+</sup> - dependent Cl<sup>-</sup> conductance in a human colonic epithelial cell line (T<sub>84</sub>): cross-talk between Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub> and protein phosphatases  
*Journal of Physiology* 510, 661 - 673
- Yamada N., Makino Y., Clark R.A., Pearson D.W., Mattei M.G., Guenet J.L., Ohama E., Fujino I., Miyawaki A., Furuichi T. (1994)  
Human inositol 1,4,5-trisphosphate type-1 receptor, InsP3R1: structure, function, regulation of expression and chromosomal localization  
*Biochem. J.* 302, 781 - 790
- Yamada K.M., Araki M. (2001)  
Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis  
*J. Cell. Sci.* 114, 2375 - 2382
- Yamaguchi H., Matsushita M., Nairn A.C., Kuriyan J. (2001)  
Crystal structure of the atypical protein kinase domain of a TRP channel with phosphotransferase activity  
*Mol. Cell.* 7, 1047 - 1057
- Yamaguchi K., Hirata M., Kuriyama H. (1987)  
Calmodulin activates inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase activity in pig aortic smooth muscle  
*Biochem. J.* 244, 787-791
- Yamamoto T., Matsui T., Nakafuku M., Iwamatsu A., Kaibuchi K. (1995)  
A novel GTPase-activating protein for R-Ras  
*J. Biol. Chem.* 270, 30557 - 30561.

- Ye W., Ali N., Bembenek M.E., Shears S.B., Lafer E.M. (1995)  
Inhibition of clathrin assembly by high affinity binding of specific inositol polyphosphates to the synapse-specific clathrin assembly protein AP-3  
*J. Biol. Chem.* 270, 1564 – 1568
- York J.D., Odom A.R., Murphy R., Ives E.B., Wente S.R. (1999)  
A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export  
*Science* 285, 96 – 100
- Yoshida Y., Imai S. (1997)  
Structure and function of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor  
*Jpn. J. Pharmacol.* 74, 125-137
- Yoshikawa F., Morita M., Monkawa T., Michikawa T., Furuichi T., Mikoshiba K. (1996)  
Mutational analysis of the ligand binding site of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor  
*J. Biol. Chem.* 271, 18277 - 18284
- Yoshikawa F., Iwasaki H., Michikawa T., Furuichi T., Mikoshiba K. (1999a)  
Trypsinized cerebellar inositol 1,4,5-trisphosphate receptor  
*J. Biol. Chem.* 274, 316 – 327
- Yoshikawa F., Iwasaki H., Michikawa T., Furuichi T., Mikoshiba K. (1999b)  
Cooperative formation of the ligand binding site of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by two separable domains  
*J. Biol. Chem.* 274, 328 – 334
- Yoshimura K., Watanabe Y., Erneux C., Hirata M. (1999)  
Use of phosphorofluoridate analogues of D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate to assess the involvement of ionic interactions in its recognition by the receptor and metabolising enzymes  
*Cell. Signal.* 11, 117 - 125
- Zhang T., Caffrey J.J., Shears S.B. (2001)  
The transcriptional regulator, Arg82, is a hybrid kinase with both monophosphoinositol and diphosphoinositol polyphosphate synthetase activity  
*FEBS Lett.* 494, 208 - 212
- Zhu X., Chu B.P., Peyton M., Birnbaumer L. (1995)  
Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila* trp gene  
*FEBS Lett.* 373, 193 - 198
- Zhu D.-M., Tekle E., Huang C.Y., Boon Chock P. (2000)  
Inositol tetrakisphosphate as a frequency regulator in calcium oscillations in HeLa cells  
*J. Biol. Chem.* 275, 6063 – 6066
- Zitt C., Zobel A., Obukhov A.G., Harteneck C., Kalkbrenner F., Luckhoff A., Schultz G. (1996)  
Cloning and functional expression of a human  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable cation channel activated by calcium store depletion  
*Neuron* 16, 1189 - 1196

## 7 Anhang

### 7.1 NMR-Pulsprogramme

Bei den im Folgenden angegebenen Pulsprogrammen handelt es sich um modifizierte Pulsprogramme der Standard Bruker Pulsprogramm-Bibliothek, welche in Rahmen der Dissertation von M. Mayer [Mayer, 2001] in Zusammenarbeit mit O. Schuster am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg entwickelt wurden. Alle Programme dienen der Aufnahme eindimensionaler  $^1\text{H}$ -Spektren.

#### **Das Programm „zg“**

```
1 ze
2 d1
  p1 ph1
  go=2 ph31
  wr #0
exit

ph1=0 2 2 0 1 3 3 1
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1
```

Hierbei wurden die Parameter wie folgt gewählt:

```
p1 = 9  $\mu\text{sec}$  - 10  $\mu\text{sec}$ 
d1 = 2 sec
```

#### **Das Programm „zgsi“**

Verwendung: Aufnahme des mit dem STD-Spektrum zu vergleichenden Referenzspektrums ohne Vorsättigungspuls; Spinlock-Puls zur Unterdrückung der Proteinresonanzen

```
1 ze
2 d1 p1:f1
  p1 ph1
  20u p10:f1
  p10 ph2
  go=2 ph31
  wr #0
exit

ph1=0 2 2 0 1 3 3 1
ph2=1 3 1 3 2 0 2 0
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1
```

```
.;*****Power Level*****
;p1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p10 : spin lock power level (10-15 dB)
;
;*****Pulse*****
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p10 : spin lock pulse (10 - 30 ms, depending on the protein)
;
;*****Delays*****
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
```

Hierbei wurden die Parameter wie folgt gewählt:

p11	=	0	dB
p110	=	15	dB
p1	=	9	$\mu\text{sec}$ - 9,4 $\mu\text{sec}$
p10	=	30	msec
d1	=	2	sec

### **Das Programm „stdslsp“**

Verwendung: Aufnahme von 1D  $^1\text{H}$ -Saturation Transfer Difference-NMR-Spektren mit einem selektiven Vorsättigungspuls wählbarer Stärke (Parameter sp1) und Länge (Parameter I7); wie in zgs/ Unterdrückung der Proteinresonanzen über  $T_{1\rho}$ -Filter

```
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p1 : f1 channel - high power pulse
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
```

```
1 ze
2 20u p11:f1
  d7 fq1:f2
3 p11:sp1:f2
  d11
  lo to 3 times I7
  p1 ph1
  20u p110:f1
  p10 ph2
  go=2 ph31
  wr #0
exit
```

```
ph1=0 2 2 0 1 3 3 1 2 0 0 2 3 1 1 3
ph2=1 3 1 3 2 0 2 0
ph31=0 0 2 2 1 1 3 3 2 2 0 0 3 3 1 1
```

```
*****Power Level*****
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p110: f1 channel - power level for spin lock pulse (15 dB)
;sp1 : f2 - channel - power level for shaped pulse
;between 50 - 60 dB depending on protein and ligand
;
*****Pulse*****
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p10 : f1 channel - spin lock pulse for protein suppr. (10-30 ms, depending on the protein)
;p11 : f2 channel - presaturation shaped pulse (gauss ca. 50 msec)
;
*****Delays*****
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d7 : additional delay (if nessesary) for complete T1 relaxation [min 20usec]
;d11 : delay between shaped pulses [1msec]
;
;presaturation = (p11 + d11) * I7 (presaturation should be around 2 sec)
;
;fq1 : define frequencies for on and off resonance presaturation
```

---

```
; O 499.87000 off resonance 1x(15-20000 HZ) on resonance 1x(xxx HZ)
; on frequency list f1.
;NS = 16*n
;DS = 16
```

Hierbei wurden die Parameter wie folgt gewählt:

```
p11 = 0 dB
p110 = 15 dB
sp1 = 50 dB

p1 = 9,25 - 9,4 µsec
p10 = 30 msec
p11 = 50 msec

d1 = 2 sec
d7 = 0,1 sec
d11 = 1 msec
```

Die off-resonance-Einstrahlung erfolgte bei einer Frequenz von 15000 Hz (30 ppm); die on-resonance-Einstrahlung bei – 600 Hz (-1,2 ppm).

## 7.2 Literaturdaten $1D\text{-}^1\text{H-NMR-Spektren von D-myoinositol(1,4,5)P}_3$

Von [Scholz et al., 1990] wurden die chemischen Verschiebungen der Proton-Resonanzen des D-myoinositol(1,4,5)P<sub>3</sub> in D<sub>2</sub>O bei einem pH\*-Wert von 6,0 bzw. 9,0 sowie die Multiplizitäten der einzelnen Resonanzen wie folgt angegeben.

	<b>H1</b>	<b>H2</b>	<b>H3</b>	<b>H4</b>	<b>H5</b>	<b>H6</b>
<b>pH* = 6,0</b>	4,03	4,29	3,74	4,27	4,02	3,93
<b>pH* = 9,0</b>	3,92	4,35	3,73	4,15	3,92	3,86
<b>Multiplizität</b>	dT	t	dD	Q	Q	T

Tabelle 7.1: Chemische Verschiebung der Proton-Resonanzen des D-myoinositol(1,4,5)P<sub>3</sub> in D<sub>2</sub>O bei verschiedenen pH\*-Werten (angegeben in ppm relativ zu TMS) und Multiplizitäten der Signale. Hierbei ist t, T: Triplett; Q: Quartett; dT: doppeltes Triplett; dD: doppeltes Dublett.

## 7.3 Abkürzungsverzeichnis

### *allgemeine Abkürzungen*

1D, 2D	1-, 2-dimensional
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CaM	Calmodulin
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> /CaM-abhängige Proteinkinase II
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CIF	calcium influx factor
COSY	correlation spectroscopy
CRAC	calcium release activated current
DAG	Diacylglycerol
ddNTP	Didesoxynukleosid-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
E.coli	Escherichia coli
EGF	epidermal growth factor
FGF	fibroblast growth factor
G	Guanosin
g	Gramm; Erdbeschleunigung
Gg	gallus gallus
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GIK	<i>Gallus</i> Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase A
GTP	Guanosintriphosphat

---

h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Hs	homo sapiens
Ins(1,4,5)P <sub>3</sub>	D-myo-Inositol 1,4,5-trisphosphat
Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> 3-Kinase	D-myo-Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase
IP	Inositolphosphat
IP3K	D-myo-Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase
IP6K	Inositolhexakisphosphatkinase
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
IPMK	Inositolpolyphosphatmultikinase
kb	Kilobasen
k <sub>kat</sub>	katalytische Konstante, Wechselzahl (Einheit 1/sec)
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
K <sub>i</sub>	Inhibitionskonstante
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
k <sub>sat</sub>	Sättigungsrate
l	Liter
LDH	L-Lactatdehydrogenase
LMW	low molecular weight
m	Meter
M	molar
Mm	mus musculus
μ	mikro
MCS	multiple cloning site
MDD	metal dye detection
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
mM	millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MW	Molekulargewicht
n	nano
NADH	hydriertes Nikotinsäureamidadenindinukleotid
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
nM	nanomolar
NMR	nuclear magnetic resonance
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	Protein Data Bank
PEP	Phosphoenolpyruvat

---

PH-Domäne	pleckstrin homology – Domäne
PI 3-Kinase	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP	Phosphatidylinositolphosphat
PK	Pyruvatkinase
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PP-InsP <sub>5</sub>	Diphosphoinositolpentakisphosphat
Rn	rattus norvegicus
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkription-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec, s	Sekunde
STD	saturation transfer difference
STDAF	STD-Amplifikationsfaktor
STDAF <sub>max</sub>	maximaler STDAF
T	Thymin
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat/EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Triethanolamin
TEMED	N, N, N', N' – Tetramethylethylendiamin
TMS	Tetramethylsilan
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	enzymatische Einheit (unit; 1 U entspricht 1 µmol/min)
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
V <sub>max</sub>	maximale Umsatzgeschwindigkeit
wt	Wildtyp
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid

**Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren**

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

## 7.4 Gefahrstoffe

Substanz	Kennzeichnung Gefahrensymbole	Gefahrenhinweise R-Sätze	Sicherheitsrat- schläge S-Sätze
Acrylamid	T	45-46-E24/25- E48/23/24/25	53-45
Ammoniumpersulfat	O, Xn	8-22-36/37/38- 42/43	22-24-26-37
Ampicillin	Xn	36/37/38-42/43	22-26-36/37
Benzamidin	Xi	36/37/38	26-36
Calciumchlorid-Dihydrat	Xi	36	22-24
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
Diethylether	Xn, F+	12-19-22-66-67	9-16-29-33
Dimethylformamid	T	61-E20/21-36	53-45
Dithiothreitol	Xn	22-36/38	24-25
Eisessig	C	10-35	23.2-26-45
Ethanol	F	11	7-16
Ethidiumbromid	T+	22-26-36/37/38-40	26-28.2-36/37-45
Ethylendiamintetraessigsäure- Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA, Titriplex III)	Xn	22	
N-Ethylmaleinimid	C	34	26-36/37/39-45
Formaldehyd	T	23/24/25-34- 39/23/24/25-40-43	26-36/37/39-45-51
Glutardialdehyd	T, N	22-23-24-42/43-50	26-36/37/39-45-61
2-(4-Hydroxyphenylazo)- benzoesäure (HABA)	Xi	36/37/38	26-36
Mangan(II)-chlorid- Tetrahydrat	Xn	22	
2-Mercaptoethanol	T, N	22-24-34-51/53	26-36/37/39-45-61
Methanol	F, T	11-23/24/25- 39/23/24/25	7-16-36/37-45
Natriumazid	T+, N	28-32-50/53	28.1-45-60-61
Natriumdodecylsulfat	Xn	22-36/38	26-36

## 7.4 Anhang

Natriumhydroxid	C	35	26-37/39-45
2-Propanol	F, Xi	11-41-67	7-16-24-26-39
Salzsäure	C	34-37	26-36/37/39-45
Silbernitrat	C, N	34-50/53	26-45-60-61
Tetracyclin	Xn	22-40-63	36/37
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Xi	36/38	24-25
Triton X-100	Xn	22-41	24-26-39
Xylencyanol	Xi	36	24

## Tabellarischer Lebenslauf

Name:	Deschermeier
Vorname	Christina
Geburtsdatum	01.07.1972
Geburtsort	München

### Schulausbildung

Juli 1991	Abitur am Käthe-Kollwitz-Gymnasium in München Stipendienprüfung für Stipendium nach dem Bayerischen Begabtenförderungsgesetz
-----------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### Studium der Physik

Sept. 1991	Aufnahme des Studiums (Studiengang Physik/Diplom) an der Universität Bielefeld
Sept. 1993	Ablegung der Diplom-Vorprüfung
Nov. 1995	Ablegung der Diplom-Hauptprüfung
Nov. 1995 – Nov. 1996	Anfertigung einer Diplomarbeit im Bereich der theoretischen Physik (Ladungstransport in Quantenpunktstrukturen; Arbeitsgruppe „Angewandte Mathematische Physik“)
Dez. 1996	Abschluss des Physikstudiums mit dem Diplom

Bemerkung: Das Studium der Physik wurde während der Regelstudierendauer (01.10.91 bis 30.09.1996) durch ein Stipendium nach dem Bayerischen Begabtenförderungsgesetz gefördert.

### Fernstudium „Medizinische Physik und Technik“

Okt. 1995	Aufnahme des Fernstudiums „Medizinische Physik und Technik“ an der Universität Kaiserslautern
Okt. 1996	Abschluss des 2-semesterigen Grundlagenstudiums
Okt. 1996	Aufnahme des 2-semesterigen Vertiefungsstudiums; gewählte Vertiefungsrichtung „Medizinische Bildverarbeitung“
Aug. 1997	Abschluss des Fernstudiums

### Aufbaustudiengang Molekularbiologie

Okt. 1998	Aufnahme des 4-semesterigen Aufbaustudiengangs Molekularbiologie an der Universität Hamburg
Nov. 2000	Abschluss des Aufbaustudiums

**GRK 336 (Molekulare Endokrinologie und Molekularer Stoffwechsel)**

- März 1997                      Beginn der Doktorarbeit am Universitätskrankenhaus Eppendorf (Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie; Arbeitsgruppe Mayr/Bertsch) als Stipendiatin des Graduierten-kollegs 336;  
Thema: Molekulare Erkennung von Inositolphosphaten durch ihre Rezeptorproteine – Untersuchung von Struktur-Funktions-Beziehungen am Beispiel der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase
- März 1997 – März 1999      Stipendiatin im GRK 336

**Tätigkeit als wissenschaftliche Angestellte am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie (UKE, Hamburg)**

- April 1999 – März 2001      Wiss. Angestellte (BAT IIa/2) am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie; Weiterbearbeitung des Promotionsthemas sowie Lehrtätigkeit im Rahmen des Biochemie-Praktikums für Medizinstudenten
- Seit 01.04.01                      Wiss. Angestellte (BAT IIa) am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie; Weiterbearbeitung des Promotions-themas sowie Lehrtätigkeit (Studiengang Biochemie/Molekularbiologie und Zusatzqualifikation Molekulare Medizin für Medizinstudenten)

## Erklärung zur Dissertation

---

Ich versichere, dass ich die Arbeit selbständig, ohne fremde Hilfe verfasst habe.  
Bei der Abfassung der Arbeit sind nur die angegebenen Quellen benutzt worden.

Hamburg, den 14.05.02

---

Unterschrift

---

Ich versichere, dass ich vor Beginn dieser Dissertation keine weiteren Promotionsversuche durchgeführt habe.

Hamburg, den 14.05.02

---

Unterschrift