

## 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.