

**Untersuchungen zum Stoffwechsel und zu Funktionen
von „energiereichen“ Diphosphoinositolphosphaten
in *Dictyostelium discoideum***

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades im Fachbereich Chemie
der Bergischen Universität Wuppertal

vorgelegt von

Christine Trautwein

aus Wuppertal

Juni 2004

Tag der mündlichen Prüfung:

27.8.2004

Danksagung

Herrn Prof. Dr. G. Vogel gilt mein besonderer Dank für die Aufgabenstellung und die umfassende Betreuung, die es mir dennoch erlaubte, weitgehend selbständig zu planen und zu arbeiten.

Herrn Prof. Dr. Helmut Guth danke ich für die Übernahme des Korreferats und die gute Zusammenarbeit bei dem Molecular Modelling der hochphosphorylierten Inositolphosphate.

Bei Herrn Dr. T. Laussmann möchte ich mich ganz herzlich dafür bedanken, dass er in der ganzen Zeit durch seine Kompetenz und Offenheit immer wieder Ansprechpartner für auftretende Probleme war.

Den Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises Dr. Stefan Adelt, Guido Dallmann, Anne-Brigitte Eyidi, Andreas Fischbach, Alexander Müller und Muatasem Ubeidat danke ich für die gute und entspannte Arbeitsatmosphäre, anregende Diskussionen und viele gute Ratschläge. Den Kollegen des Arbeitskreises Chemische Mikrobiologie Prof. Dr. Wolfgang Piepersberg danke ich für ihre Bereitschaft zur Unterstützung in Bezug auf allgemeine molekularbiologische Arbeitsmethoden.

Bei Herrn Dr. Thomas Winckler möchte ich mich für die Offenheit und Hilfestellung bei speziellen genetischen und molekularbiologischen Fragestellungen bezüglich *Dictyostelium discoideum* bedanken.

Herrn Dr. Marcus Mreyen danke ich für anregende Diskussionen und seine Kooperationsbereitschaft bei Proteinsequenzierungen.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Dr. Sabine Metzger für die Unterstützung bei der Proteinsequenzierung und der Messung von ESI-MS/MS-Spektren.

Herrn Dr. Adolfo Saiardi danke ich für die Diskussionsbereitschaft bei Fragen zu Datenbankrecherchen und InsP₆-Kinasen.

Meiner Familie und ganz besonders meinem Mann Jochen bin ich dankbar für die Geduld und Unterstützung während der Promotion und für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Für Jochen

Zusammenfassung

In Dictyosteliden wurde eine neue Klasse von energiereichen myo-Inositolphosphaten entdeckt, die Diphosphatgruppen tragen. Diese offenbar ubiquitär verbreiteten Diphosphoinositolphosphate wurden in verschiedenen Organismen gefunden. Ihre Strukturen wurden nur in Dictyosteliden eindeutig aufgeklärt. Am Stoffwechsel dieser Metabolite in *Dictyostelium discoideum* sind die bereits charakterisierte 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase und die InsP₆-Kinase, die durch Gendelektion identifiziert wurde, beteiligt. Die physiologische Bedeutung der PP-InsPs ist weitgehend unbekannt. Hinweise auf eine regulatorische Funktion ergeben sich aufgrund ihrer Beteiligung an der Chemotaxis in *Dictyostelium*.

Nach der *de-novo*-Sequenzierung mittels ESI-MS/MS der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase wurde das codierende Gen durch Sequenzvergleiche identifiziert. Die massenspektrometrische Analyse der InsP₇-Kinasebande ergab, dass zwei Proteine im Verlauf der Anreicherung copurifiziert wurden. Das mitangereicherte Protein ist nicht am Stoffwechsel der Diphosphoinositolphosphate beteiligt.

Eine mögliche regulatorische Bedeutung der PP-InsPs *in vivo* konnte durch die Untersuchung spezifischer Proteinmarkierungen durch [β -³²P-5]-PP-InsP₅ und [β -³²P-5],6-bis-PP-InsP₄ nicht eindeutig belegt werden. Die Malatsynthase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase und die Inosinmonophosphat-Cyclohydrolase, die mittels ESI-MS/MS sequenziert und identifiziert wurden, binden ebenso wie die InsP₇-Kinase an das InsP₆-Affinitätsgel. Sie sind nicht am Stoffwechsel der PP-InsPs beteiligt, werden aber möglicherweise durch diese Metabolite reguliert. Der Stoffwechsel der hochphosphorylierten Inositolphosphate konnte nicht aufgeklärt werden. Es wurden außer der bekannten InsP₇-Kinaseaktivität keine weiteren anabolen oder katabolen Enzymaktivitäten gefunden.

Die InsP₇-Kinase katalysiert reversibel sowohl die Phosphorylierung von InsP₆ wie auch von 6-PP-InsP₅. Ihre Affinität gegenüber InsP₆ ist jedoch bedeutend geringer und das Substrat wird im Vergleich zu 6-PP-InsP₅ sehr viel langsamer umgesetzt. Die Konformationsanalysen der Substrate mittels *ab-initio*-Simulationen zeigten gravierende und unerwartete Unterschiede, auf deren Basis die unterschiedliche katalytische Aktivität der InsP₇-Kinase gegenüber ihren Substraten diskutiert wurde. Weitergehend wurde eine mögliche Tertiärstruktur der InsP₇-Kinase vorhergesagt.

Abstract

In dictyostelids a new class of “energy-rich“ myo-inositol phosphates with diphosphate groups has been discovered. The diphospho inositol phosphates seem to occur ubiquitous in eukaryotic cells and have been found meanwhile in various organisms. However, the structures of the PP-InsPs were only elucidated in dictyostelids. A characterized 6-PP-InsP₅ 5-kinase and an InsP₆ kinase, which was identified by gene deletion, participate in the metabolism of these compounds in *Dictyostelium discoideum*. Physiological functions of the diphospho inositol phosphates remain still elusive. A regulatory role for PP-InsPs is indicated by the mediation of chemotaxis in *Dictyostelium*.

In this thesis, the *de novo* sequencing of the digested 6-PP-InsP₅ 5-kinase by ESI-MS/MS resulted in several peptides. The coding gene was identified by data base searches with these peptide sequences. The mass spectrometric analysis of the protein spot after SDS-PAGE displayed the co-purification of a second protein and the InsP₇ kinase. But this protein is not involved in the inositol phosphate metabolism.

A regulatory effect of the diphospho inositol phosphates *in vivo* was not unambiguously supported by the investigation of specific labelling of proteins by [β -³²P-5]-PP-InsP₅ and [β -³²P-5],6-bis-PP-InsP₄. The malate synthase, the 6-phosphogluconate dehydrogenase and third the inosine monophosphate cyclohydrolase also sequenced and identified by ESI-MS/MS are retarded by the InsP₆ affinity resin as well as the InsP₇ kinase. Even this enzymes do not participate in the metabolism of PP-InsPs, but they are potentially regulated by this metabolites.

The metabolism of the diphospho inositol phosphates remains elusive. Except the InsP₇ kinase activity no further anabolic or katabolic enzymatic activities could be determined.

The InsP₇ kinase catalyzes the reversible phosphorylation of 6-PP-InsP₅ and shows a minor activity against InsP₆. 6-PP-InsP₅ is significantly faster metabolized than InsP₆. Conformational analysis of the substrates by *ab-initio* simulations reveal great and unexpected differences. They justify the discussion of the catalytic activity of the InsP₇ kinase against their substrates. Furthermore in this thesis a threading-based protein fold prediction was demonstrated for the InsP₇-kinase.

	Abkürzungsverzeichnis	IV
	Abbildungsverzeichnis	V
	Tabellenverzeichnis	VI
1	Einleitung	1
1.1	Struktur und Nomenklatur von Inositolphosphaten	1
1.2	<i>Dictyostelium discoideum</i> als Modellorganismus	3
1.3	Inositolphosphate in <i>Dictyostelium discoideum</i> und anderen Organismen	6
1.3.1	Niedrigphosphorylierte Inositolphosphate	6
1.3.2	Inositolhexakisphosphat (InsP ₆ / Phytat)	9
1.4	Übersicht des Inositolphosphatstoffwechsels in <i>D. discoideum</i>	11
1.5	Diphosphoinositolphosphate	13
1.5.1	Diphosphoinositolphosphate in anderen Organismen	14
1.5.2	Metabolismus der Diphosphoinositolphosphate	14
1.5.3	Funktionen der Diphosphoinositolphosphate	18
1.6	Das <i>Dictyostelium discoideum</i> Genom	20
1.6.1	Das <i>Dictyostelium</i> -Genomprojekt	21
1.6.1.1	Sequenzierungsstrategie	23
1.6.2	Das <i>Dictyostelium</i> cDNA-Projekt	25
1.6.3	Das PROTEOME-Projekt	25
1.6.4	Der Umgang mit Sequenzdaten und Perspektiven nach der Entschlüsselung des Genoms	26
1.7	Ziel dieser Arbeit	29
2	Material und Methoden	31
2.1	Zellkultur und Medien	31
2.1.1	Kultivierung und Lagerung von Dictyosteliden	31
2.1.2	Kultivierung von <i>Klebsiella aerogenes</i> und <i>Escherichia coli</i>	32
2.1.3	Kulturgefäße und Zellernte	32
2.1.4	Medien und Nährböden	33
2.2	Bestimmung der Zelldichte von Dictyosteliden und Bakterien	34
2.3	Präparative Isolierung und Analyse von Inositolphosphaten aus Dictyosteliden	34
2.3.1	Isolierung von Inositolphosphaten	34
2.3.2	Lagerung und Handhabung von Inositolphosphaten	35
2.3.3	Qualitative Inositolphosphatbestimmung	35
2.3.4	Quantitative Bestimmung des Phosphatgehaltes	36
2.4	HPLC-MDD-Analytik von Inositolphosphaten	36
2.4.1	Aufbau der HPLC-MDD-Anlage	37
2.4.2	Säulen, Elutionssysteme und Gradienten zur Trennung von Inositolphosphaten	39
2.4.3	Kalibrierung der HPLC-Anlage	40
2.4.4	Regenerierung der HPLC-Säulen	40
2.5	Proteinanalytik	41
2.5.1	Proteinbestimmung	41
2.5.2	SDS-Disk-Polyacrylamidgelelektrophorese	41
2.5.3	Western-Blotting	41

2.5.4	Immunochemische Nachweisreaktionen	42
2.6	Enzymtests	43
2.6.1	Photometrischer Enzymtest durch eine gekoppelte enzymatische Reaktion	43
2.6.2	Nachweis der Enzymaktivität mit HPLC-MDD-Analyse	43
2.7	Anreicherung der 6-PP-InsP ₅ -(5)-Kinase	44
2.7.1	Zellaufschluss	44
2.7.2	Säulenchromatographie	45
2.7.2.1	Ionenaustauschchromatographie an Q- und SP-Sepharose fast flow	45
2.7.2.2	Affinitätschromatographie an InsP ₆ -Gel	46
2.7.2.3	Affinitätschromatographie an anderen Materialien	46
2.8	Charakterisierung der 6-PP-InsP ₅ -(5)-Kinase durch Massenspektrometrie	47
2.8.1	Aufnahme und Auswertung der ESI-Massenspektren	49
2.9	Identifizierung des Gens der 6-PP-InsP ₅ -(5)-Kinase mit molekularbiologischen Methoden	49
2.9.1	Verwendete Lösungen und Medien	51
2.9.2	Isolierung und Analyse von genomischer DNA	52
2.9.3	Primerdesign und Polymerasekettenreaktion	54
2.9.4	Klonierung von DNA-Fragmenten in Vektoren, Transformation in <i>E. coli</i> und Plasmidisolierung	58
2.9.5	Überexpression einer cDNA in <i>Pichia pastoris</i>	59
2.9.5.1	Verwendete Lösungen und Medien	60
2.9.5.2	Konstruktion und Transformation der Vektoren in <i>Pichia pastoris</i>	63
2.9.5.3	Methanolinduzierte Expression des rekombinanten Proteins	64
2.9.5.4	Northern-Blot-Analyse der <i>Pichia</i> Mutanten	65
2.10	Experimente zu physiologischen Funktionen der PP-InsPs	66
2.10.1	Radioaktive Markierung von 5-PP-InsP ₅ und 5,6-bis-PP-InsP ₅ mit [γ - ³² P]-ATP	66
2.10.2	Präparation der Zellextrakte	67
2.10.2.1	Cytosolische und Membranextrakte	67
2.10.2.2	Kernfraktion und solubilisierte Membranproteine	67
2.10.3	Phosphorylierung von Proteinen durch Diphosphoinositolphosphate	67
2.11	Stoffwechsel von Diphosphoinositolphosphaten: Die Untersuchung anaboler und kataboler Enzymaktivitäten	69
2.11.1	Inkubationen von Zellextrakten	69
2.11.2	Immunochemischer Nachweis von Proteinen mit einem Inositolhexakisphosphatkinase-Antikörper	70
2.12	Simulationen zur Ermittlung von Molekülgeometrien von InsP ₆ , 6-PP-InsP ₅ und 5,6-bis-PP-InsP ₄	71
3	Ergebnisse und Diskussion	73
3.1	Präparative Isolierung von Diphosphoinositolphosphaten aus <i>Dictyostelium discoideum</i> und <i>Polysphondylium pallidum</i>	73
3.2	Anreicherung der 6-PP-InsP ₅ -(5)-Kinase	74
3.2.1	Zellaufschluss	75
3.2.2	Ionenaustauschchromatographie	76
3.2.3	Affinitätschromatographie	77
3.2.3.1	InsP ₆ -Affinitätschromatographie	77
3.2.3.2	InsP ₇ als potentieller Affinitätsligand für die 6-PP-InsP ₅ -(5)-Kinase	79

3.2.4	Zusammenfassung der Anreicherung der 6-PP-InsP ₅ -(5)-Kinase	80
3.3	Sequenzierung der 6-PP-InsP ₅ -(5)-Kinase mit Matrix Assisted Laser Desorption Massenspektrometrie (MALDI-MS) und Edmanabbau	81
3.3.1	Versuch der Identifizierung des Gens der 6-PP-InsP ₅ -(5)-Kinase über die Peptidsequenzen DFFENNPDYR und LIDFTHTK	83
3.3.1.1	Isolierung von genomischer DNA aus <i>Dictyostelium discoideum</i>	83
3.3.1.2	Versuch der Genidentifizierung durch PCR	85
3.3.2	Versuch der Genidentifizierung über die konservative Inositolphosphatbindestelle der InsP ₆ -Kinasefamilie	88
3.4	Sequenzierung der 6-PP-InsP ₅ -(5)-Kinase mittels Nanoelektrosprayionisations-Massenspektrometrie (Nano-ESI-MS)	89
3.4.1	ESI- und ESI-CID-Massenspektren	90
3.4.2	<i>De-novo</i> -Sequenzierung der 6-PP-InsP ₅ -(5)-Kinase	92
3.4.3	Versuch der Genidentifizierung durch Überexpression der cDNA VFM264 in <i>Pichia pastoris</i>	97
3.4.3.1	Konstruktion und Transformation des Expressionsvektors in <i>Pichia pastoris</i> X33	98
3.4.3.2	Versuch der Expression des rekombinanten Proteins	99
3.4.4	Datenbankrecherchen zur Identifizierung der 6-PP-InsP ₅ -(5)-Kinase und des zugehörigen Gens	102
3.4.5	Sequenzvergleich der InsP ₇ - und InsP ₆ -Kinase aus <i>Dictyostelium</i>	106
3.4.6	Kritische Betrachtung der Versuche zur Genidentifizierung der 6-PP-InsP ₅ -(5)-Kinase	107
3.5	Experimente zu physiologischen Funktionen der Diphosphoinositolphosphate	109
3.6	Stoffwechsel von Diphosphoinositolphosphaten	113
3.6.1	Inkubationen von cytosolischen Zellextrakten	114
3.6.2	Inkubationen von Kernpräparationen	115
3.6.3	Versuch des immunochemischen Nachweises einer Inositolhexakisphosphatkinase in <i>D. discoideum</i>	116
3.6.4	Identifizierung weiterer Proteine, die an das InsP ₆ -Affinitätsmaterial binden	117
3.7	Molekular Modelling - Simulationen zur Ermittlung der Molekülgeometrien von hochphosphorylierten Inositolphosphaten	121
3.7.1	Eine Einführung in molekülmechanische, semiempirische und <i>ab-initio</i> -Molekülsimulationen	121
3.7.1.1	Molekülmechanik	122
3.7.1.2	Semiempirische Verfahren	123
3.7.1.3	<i>Ab-initio</i> -Methoden	124
3.7.2	Optimierte Molekülgeometrien von hochphosphorylierten Inositolphosphaten	126
3.7.2.1	Geometrieoptimierungen und Energien von InsP ₆ -Konformeren	126
3.7.2.2	Geometrieoptimierungen und Energien von InsP ₇ -Konformeren	129
3.7.2.3	Geometrieoptimierungen und Energien von InsP ₈ -Konformeren	132
3.7.3	Diskussion der Ergebnisse der Molekülsimulationen	134
4	Ausblick	141
5	Literatur	142
	Anhang	

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin	LB	Luria-Bertani
BMM	Buffered Minimal Methanol	MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
BMGY	Buffered Glycerol Complex Medium	NP 40	Nonidet P40
Bla	Blasticidin	OD	optische Dichte
BSA	Rinderserumalbumin	PP-InsP	Diphosphoinositolphosphate
Ci	Curie	RNase	Ribonuklease
CID	Collision induced decay	SDS	Natriumdodecylsulfat
cpm	Counts pro Minute	SSC	Sodium Salt Citrat
DIG	Digoxigenin	TAE	Tris-Acetat-EDTA
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'- triphosphat	TB	terrific broth
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	TE	Tris-EDTA
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin- N'-2-ethansulfonsäure	Tris	tris-(Hydroxymethyl)- aminomethan
HSA	Human Serumalbumin	Upm	Umdrehungen pro Minute
InsP	Inositolphosphate	WCS	whole chromosome shotgun
InsP ₆	Inositolhexakisphosphat	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D- galactopyranosid
InsP ₇	5-Diphosphoinositol- pentakisphosphat	YNB	Yeast Nitrogen Base
InsP ₈	5,6-Bisdiphosphoinositol- tetrakisphosphat	YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose Medium
		YPDS	Yeast Extract Peptone Dextrose Medium with Sorbitol

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Strukturen von myo-Inositol und bekannten Diphosphoinositolphosphaten in Dictyosteliden	2
Abb. 1-2: Der Lebenszyklus von Dictyosteliden	4
Abb. 1-3: Arbeitshypothese zum Inositolphosphatstoffwechsel in <i>D. discoideum</i>	12
Abb. 1-4: Arbeitshypothese zum Stoffwechsel der Diphosphoinositolphosphate in <i>Dictyostelium discoideum</i>	15
Abb. 1-5: Stoffwechsel der Diphosphoinositolphosphate in Hefen und Säugetierzellen	17
Abb. 1-6: Schematische Darstellung der Chromosomen „Shotgun“ Methode	24
Abb. 1-7: Schematische Darstellung der automatischen Genomannotation	27
Abb. 2-1: Schematischer Aufbau der HPLC-MDD-Anlage	38
Abb. 2-2: Schematische Darstellung der angewendeten molekularbiologischen Methoden	50
Abb. 3-1: Die durch die 6-PP-InsP ₅ -(5)-Kinase katalysierte Reaktion	74
Abb. 3-2: InsP ₆ -Affinitätsgel zur Anreicherung der 6-PP-InsP ₅ -(5)-Kinase	77
Abb. 3-3: Modell des aktiven Zentrums der 6-PP-InsP ₅ -(5)-Kinase nach Laussmann ⁶	78
Abb. 3-4: InsP ₇ -Derivat als potentieller Ligand zur Affinitätschromatographie	79
Abb. 3-5: Elektropherogramme der partiell angereicherten 6-PP-InsP ₅ -(5)-Kinase	82
Abb. 3-6: Dokumentationsgele der PCR und Klonierung des PCR-Produktes in den pUC18-Vektor	87
Abb. 3-7: PCR mit Primern, die von der Sequenz des DNA-Klons aus Jena abgeleitet wurde	89
Abb. 3-8: Übersichtsspektrum der mit 60% Methanol eluierten tryptischen Peptide der 6-PP-InsP ₅ -(5)-Kinase	90
Abb. 3-9: Übersichtsspektrum der mit 80% Methanol eluierten tryptischen Peptide der 6-PP-InsP ₅ -(5)-Kinase	91
Abb. 3-10: CID-Spektrum und Sequenzierung des Peptids mit der Masse 974,6 Da	92
Abb. 3-11: CID-Spektrum und Sequenzierung des Peptids mit der Masse 2963,8 Da	93
Abb. 3-12: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des cDNA-Klons VFM 264	96
Abb. 3-13: Klonierung der cDNA in den Expressionsvektor pPIC6α A	99
Abb. 3-14: Northern Analyse der Mutanten PpCT3 und PpCT5	101
Abb. 3-15: Nukleotid- und Aminosäuresequenz der InsP ₇ -Kinase	104
Abb. 3-16: Vergleich der Aminosäuresequenzen der InsP ₆ - und InsP ₇ -Kinase	106
Abb. 3-17: Blockalignment der konservierten Sequenzen der Inositolphosphatbindestelle	108
Abb. 3-18: Elektropherogramm und Autoradiogramm der inkubierten Zellextrakte	111
Abb. 3-19: Reaktion, die durch die Malatsynthase katalysiert wird	117
Abb. 3-20: Reaktion, die durch die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase katalysiert wird	118
Abb. 3-21: Reaktion, die durch die IMP-Cyclohydrolase katalysiert wird	119
Abb. 3-22: Primärstrukturen der Proteine, die an das InsP ₆ -Affinitätsmaterial binden	120
Abb. 3-23: Schematische Darstellung der berücksichtigten Torsionen	129
Abb. 3-24: 3D-Plots der Energieprofile von InsP ₇ -Konformeren in Abhängigkeit von den Diederwinkeln	130
Abb. 3-25: Energiedifferenzen der einzelnen Konformationen für InsP ₆ und 6-PP-InsP ₅ in wässriger Umgebung und im Vakuum	135
Abb. 3-26: Konformationen der hochphosphorylierten Inositolphosphate in Abhängigkeit von ihrer Umgebung	137
Abb. 3-27: Molekülstrukturen und elektrostatische Oberflächenpotentiale der relevanten InsP _x -Konformere	138
Abb. 3-28: Vorschlag einer Tertiärstruktur für die InsP ₇ -Kinase	140

Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1: Sequenzierung der Chromosomen und der Status des <i>Dictyostelium</i> -Genomprojektes	22
Tab. 1-2: Internetadressen von Instituten und Datenbanken	29
Tab. 2-1: Medien und Nährböden zur Kultivierung von Dictyosteliden	33
Tab. 2-2: PAR-Reagenz	36
Tab. 2-3: Phosphatreagenz	36
Tab. 2-4: Geräteliste HPLC	38
Tab. 2-5: Elutionslösungen für die präparative Trennung von Inositolphosphaten	39
Tab. 2-6: Elutionslösungen für die Analyse von Inositolphosphatgemischen	40
Tab. 2-7: Protokoll für immunochemische Nachweisreaktionen	42
Tab. 2-8: Testreagenz für den 6-PP-InsP ₅ -(5)-Kinase-Farbttest	43
Tab. 2-9: Testlösung zur Phosphorylierung von 6-PP-InsP ₅	44
Tab. 2-10: Protokoll zur Extraktion der Peptide nach dem „In-Gel-Verdau“	48
Tab. 2-11: Verwendete Puffer, Lösungen und Medien	52
Tab. 2-12: Übersicht über die verwendeten degenerierten Oligonukleotide, die von Peptidsequenzen abgeleitet wurden	55
Tab. 2-13: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide, die von DNA-Sequenzen abgeleitet wurden	56
Tab. 2-14: Zusammensetzung der PCR-Ansätze	57
Tab. 2-15: PCR-Programm	57
Tab. 2-16: Puffer, Lösungen und Medien für die Überexpression in <i>P. pastoris</i>	62
Tab. 2-17: Protokoll der Waschschrte nach der Hybridisierung von mRNA	66
Tab. 2-18: Inkubationsansatz für die radioaktive Markierung von PP-InsPs	66
Tab. 2-19: Zusammensetzung der Lysispuffer zur Isolierung von Zellkernen	70
Tab. 2-20: Testlösung „Dephosphorylierung“	70
Tab. 2-21: Parameter für die <i>ab-initio</i> -Molekülsimulationen mit GAMESS	72
Tab. 3-1: Isolierte Inositolphosphate aus <i>D. discoideum</i> und <i>P. pallidum</i>	73
Tab. 3-2: Eigenschaften der 6-PP-InsP ₅ -(5)-Kinase ⁶	75
Tab. 3-3: Zusammenfassung der Reinigungsschritte der 6-PP-InsP ₅ -(5)-Kinase	80
Tab. 3-4: Ermittelte Peptidsequenzen aus den massenspektrometrischen Analysen	94
Tab. 3-5: Ergebnisse der aktualisierten Datenbankrecherchen für die InsP ₇ -Kinase	102
Tab. 3-6: Ergebnisse der aktualisierten Datenbankrecherchen für die cDNA	105
Tab. 3-7: Energien für InsP ₆ -Konformere aus GAMESS-Simulationen	127
Tab. 3-8: Energien für InsP ₇ -Konformere aus GAMESS-Simulationen	131
Tab. 3-9: Torsionsenergien der 5 günstigsten Konformationen von 5,6-bis-PP-InsP ₄ (_{5ax/1äq}) und 5,6-bis-PP-InsP ₄ (_{1ax/5äq}) in Abhängigkeit von den 4 Diederwinkeln	133
Tab. 3-10: Energien für InsP ₈ -Konformere in wässriger Umgebung aus GAMESS-Simulationen	134

1 Einleitung

Der Stoffwechsel und die physiologischen Funktionen von „energiereichen“ Diphosphoinositolphosphaten in *Dictyostelium discoideum*, einem zellulären Schleimpilz, sind Thema der vorliegenden Arbeit. Diphosphoinositolphosphate sind hochphosphorylierte Derivate des *myo*-Inositols. Neben ortho-Phosphatgruppen besitzen diese Verbindungen zusätzliche Diphosphatgruppen (Pyrophosphatgruppen). Mit der Aufklärung der Rolle von *myo*-Inositol(1,4,5)trisphosphat bei der calciumabhängigen Signaltransduktion in höheren Organismen¹ begann 1983 die Suche nach weiteren physiologisch relevanten *myo*-Inositolphosphaten. In den letzten Jahren fanden sie große Beachtung in Medizin und Biologie, weil ihnen essentielle Funktionen z. B. in regulatorischen Prozessen zugeordnet werden. Bisher ist es nicht gelungen, den Metabolismus und die Funktionen dieser Naturstoffklasse vollständig aufzuklären. Im Verlauf dieser Forschung wurden neben vielen anderen Inositolphosphaten in *Dictyostelium discoideum* auch Diphosphoinositolphosphate entdeckt^{2,3} und ihre Strukturen aufgeklärt^{4,5}. Ebenso wurde ein am Stoffwechsel der Diphosphoinositolphosphate beteiligtes Enzym gereinigt und charakterisiert⁶.

Dictyosteliden, im Besonderen *D. discoideum*, sind Modellorganismen, die sich gut zur Untersuchung komplexer biologischer Prozesse eignen. Zu diesen Prozessen gehören unter anderem die Differenzierung, Zellmotilität, Genregulation, Signaltransduktion, Endo- und Exocytose.

1.1 Struktur und Nomenklatur von Inositolphosphaten

Das Grundgerüst von Inositolen, Cyclitolen der allgemeinen Summenformel $C_6H_{12}O_6$ ist ein C_6 -Ring, dessen C-Atome Hydroxylgruppen tragen. Aufgrund der individuellen Anordnung der Hydroxylgruppen existieren neun mögliche Stereoisomere von Inositol. Sieben Stereoisomere (*cis*-, *epi*-, *allo*-, *myo*-, *muco*-, *neo*- und *scyllo*-Inositol) sind optisch inaktive meso-Formen, während die anderen beiden ein Enantiomerenpaar (*chiro*-Inositol: D- und L-Form) bilden. Fast alle Inositole wurden in der Natur gefunden⁷. Das häufigste natürlich vorkommende Inositol ist *myo*-Inositol, ein Stereoisomer mit fünf äquatorialen und einer axialen Hydroxylgruppe.

Die Kohlenstoffatome des Cyclohexanrings werden nach der IUPAC-Empfehlung⁸ durchnummeriert (Abb. 1-1). Das Molekül besitzt eine Spiegelebene, die durch die Kohlenstoffatome 2 und 5 verläuft. Demzufolge sind die Kohlenstoffatome 1 und 3 sowie 4 und 6 nicht unterscheidbar. Die definierte Nummerierung wird erst bei der Einführung von Substituenten wichtig.

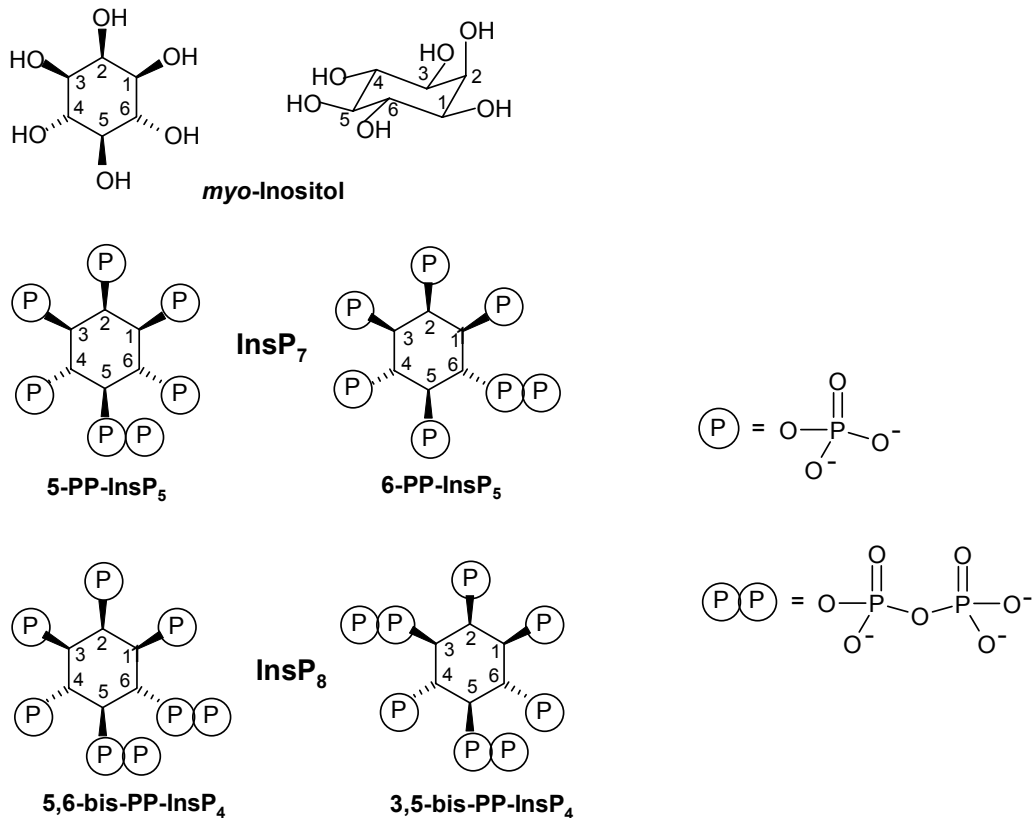


Abb. 1-1: Strukturen von *myo*-Inositol und bekannten Diphosphoinositolphosphaten in Dictyosteliden

In dieser Arbeit werden ausschließlich Derivate des *myo*-Inositols („Ins“) berücksichtigt. Biologisch relevante Verbindungen sind einige *myo*-Inositol(poly)phosphate (Ins(a,b,...)P_x mit a, b, ... = phosphorylierte Position(en) und x = Anzahl der Phosphatgruppen). Diphosphoinositolphosphate besitzen neben Monophosphatestergruppen auch Diphosphatestergruppen. Für diese Inositolphosphate ist inzwischen eine Nomenklatur etabliert, die auch in dieser Arbeit verwendet wird. Inositolphosphate mit einer Diphosphatgruppe werden kurz als m-PP-InsP_x bezeichnet, wobei m die Position der Diphosphatgruppe angibt (Abb. 1-1). Sind mehrere Diphosphatgruppen vorhanden, dann werden die Vorsilben bis-, tris- usw. den

Positionen der Diphosphatgruppen nachgestellt. Sind alle Positionen des Grundgerüsts phosphoryliert, so kann auf die Zusätze a, b,... zur Kennzeichnung der Positionen verzichtet werden.

1.2 *Dictyostelium discoideum* als Modellorganismus

Da *Dictyostelium discoideum* im Verlauf seines Lebenszyklus (Abb. 1-2) sowohl uni- als auch multizellulär vorkommt, ist der Organismus als Modell zur Untersuchung biologischer Prozesse besonders geeignet. Über die erste Dictyostelidenart, *Dictyostelium mucoroides*, berichtete schon 1869 der Pilzforscher Oskar Brefeld⁹. 1935 wurde *D. discoideum* (NC4) erstmals von Raper als im Waldboden auftretender zellulärer Schleimpilz beschrieben¹⁰. In der vegetativen Phase ernähren sich die einzelligen, haploiden Bodenamöben durch Phagozytose von Bakterien¹¹. Dabei vermehren sich die Zellen mitotisch. Bei mangelndem Nahrungsangebot teilen sich die Zellen nicht mehr. Die Amöbe reagiert auf die sich verändernden Umweltbedingungen durch die Differenzierung zu Dauerformen, den Sporen. Mit der Differenzierung ist eine starke Veränderung der Genexpression verbunden.

In der einleitenden Phase der Differenzierung sekretieren die Zellen in zeitlichen Intervallen cAMP als Botenstoff. Die entstehenden cAMP-Gradienten werden von anderen *Dictyostelium*-Zellen erkannt, die sich chemotaktisch auf die cAMP-Quelle zubewegen und selbst den Botenstoff sezernieren. Die Amöben aggregieren zunächst zu großen Zellverbänden von ca. 10^5 Einzelindividuen. Nach ungefähr 14 Stunden bilden sich multizelluläre „slugs“, die photo- und thermotroph sind und sich koordiniert bewegen können. Schon in diesen Pseudoplasmodien beginnt die Differenzierung in zwei unterschiedliche Zelltypen, Präsporenzellen und Prästielzellen. Die Prästielzellen befinden sich an der Spitze des Pseudoplasmodiums und machen ungefähr 30% dieser Struktur aus. An geeigneter Stelle richten sich die Pseudoplasmodien senkrecht auf. Die Prästielzellen wandern durch die Präsporenzellmasse nach unten und sterben ab, während die Präsporenzellen nach oben wandern und schrumpfen. Etwa 24 Stunden nach der Aggregationsphase endet der Differenzierungsprozess mit der Ausbildung des Fruchtkörpers. Der reife Fruchtkörper besteht aus einem Stiel und dem Sporenkopf. Während die toten Stielzellen eine Zellwand aus Zellulose besitzen, bilden die Sporenzellen eine stabile Wand aus Zellulose und Glykoproteinen aus. Unter günstigen Umweltbedingungen, vor allem bei ausreichendem

Nahrungsangebot, schließt sich dieser asexuelle Lebenszyklus von *D. discoideum* mit der Sporengermination.

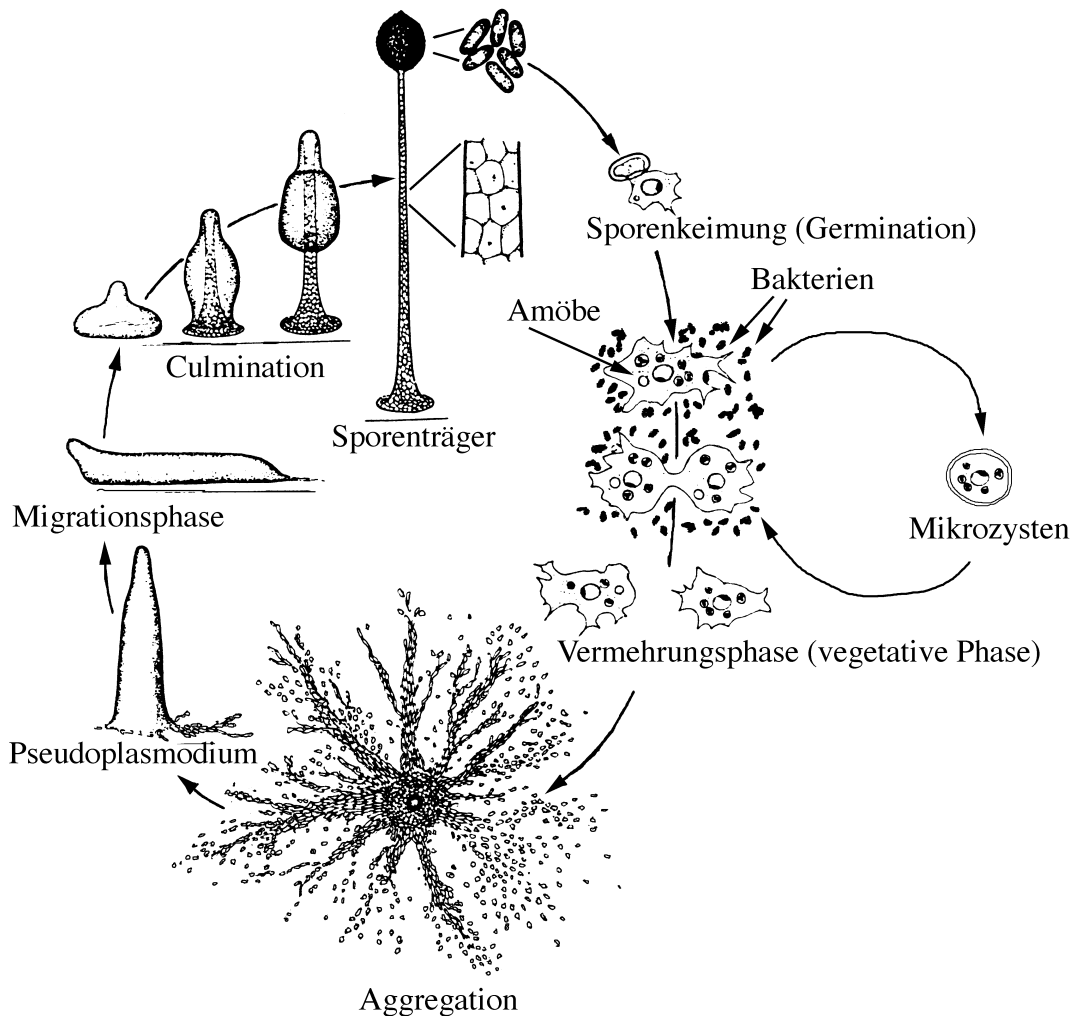


Abb. 1-2: Der Lebenszyklus von Dictyosteliden

Einige Dictyostelidenarten bilden statt der Fruchtkörper Mikro- oder Makrozysten aus. Bei der Bildung von Mikrozysten durchlaufen diese Arten kein multizelluläres Stadium. Makrozysten werden nur ausgebildet, wenn die haploiden Amöben geschlechtliche Merkmale besitzen¹².

Amöboide Dictyosteliden ernähren sich durch Phagozytose von Bakterien. Für Laborzwecke wurden Mutanten generiert. Der Stamm *D. discoideum* AX2 ist eine Mutante, die auch in flüssigen Medien via Pinocytose wachsen kann. Die Fähigkeit, unter entsprechenden Bedingungen zu phagozytieren, bleibt erhalten¹³. *D. discoideum* AX2 kann daher weiterhin auf bakterienbewachsenen Agarplatten und in Bakteriensuspensionen, aber

auch in synthetischen und halbsynthetischen Flüssignährmedien leben. Dieser Organismus ist damit, auch aufgrund seiner leichten Kultivierbarkeit, hervorragend für Untersuchungen biologischer Prozesse geeignet.

Während des Lebenszyklus zeigt *D. discoideum* viele Merkmale, die auch in komplexeren Organismen beobachtet werden. Dazu gehören unter anderem die Motilität, Zell-Zell-Adhäsion, Zelldifferenzierung und die Anpassung an wechselnde äußere Bedingungen. Diese Merkmale waren mit ein Grund dafür, dass *D. discoideum* von den National Institutes of Health (NIH) im Jahre 2002 in die Liste der Modellorganismen für biomedizinische Untersuchungen aufgenommen wurde. Der eukaryontische Organismus zeigt Eigenschaften, die Parallelen zu Säugerzellen aufweisen. Gleichzeitig besitzt *D. discoideum* auch Eigenschaften von Pflanzenzellen, wie die Zelluloseanreicherung während des Endstadiums der Differenzierung von Stielzellen und die Vakuolisierung.

Aufgrund der Eigenschaften des Organismus wird die Taxonomie heute immer noch diskutiert. Raper et al. ordneten die Unterklasse Dictyosteliden klassisch in das Reich der Pilze, die Abteilung Myxomycota und die Klasse der Acrasiomyceten ein¹⁰. Auf der Basis der aktuelleren molekularen Phylogenie werden für *D. discoideum* kontroverse Stellungen im Evolutionsstammbaum postuliert¹⁴. Kessin et al.¹² stufen *Dictyostelium* als einen Zweig der Protisten vor der Trennung von Tier-, Pflanzen- und Pilzreich ein. Nach Loomis et al.¹⁵ divergierten Dictyosteliden erst nach der Trennung aus der tierischen Linie. Diese Theorie wird auch von Baldauf et al.¹⁶ aufgrund der phylogenetischen Analyse von konservierten Proteinsequenzen unterstützt. Danach wird *Dictyostelium* als Amoebozoa klassifiziert, die weiter von den Pflanzen als von den Vertebraten entfernt sind. Das Genom von *Dictyostelium* zeigt größere Ähnlichkeiten zu den Genen der Vertebraten als zu denen von Pflanzen oder Pilzen¹⁷.

In Bezug auf diese Arbeit ist *D. discoideum* besonders für die Untersuchung des Stoffwechsels und physiologischer Funktionen der Diphosphoinositolphosphate geeignet, da der Organismus große Mengen dieser Substanzen produziert. Dies ist gleichzeitig der Grund dafür, dass Diphosphoinositolphosphate zuerst in *D. discoideum* gefunden wurden. Erst daraufhin wurde mit der Suche nach diesen Verbindungen in anderen Organismen begonnen⁶. In *D. discoideum* wurden außerdem zahlreiche *myo*-Inositolphosphate gefunden¹⁸, deren physiologische Funktionen noch weitgehend ungeklärt sind. Viele dieser Metabolite könnten

ausschließlich als Konsequenz des Stoffwechsels von hochphosphorylierten Inositolphosphaten auftreten oder aber physiologische Bedeutung haben.

1.3 Inositolphosphate in *Dictyostelium discoideum* und anderen Organismen

An dieser Stelle soll ein Überblick über die Inositolphosphate in *D. discoideum* gegeben werden. Des Weiteren werden bekannte Funktionen in anderen Organismen kurz dargestellt. Die Aufklärung der Rolle von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ bei der Signaltransduktion hat dazu geführt, dass in den vergangenen Jahren verstärkt die Erforschung von Inositolphosphaten, ihres Stoffwechsels und ihrer Funktionen begann. Es wurde eine Vielzahl natürlich vorkommender Inositolphosphate sowohl in tierischen als auch in pflanzlichen Zellen entdeckt, was zu unzähligen *in vitro* Untersuchungen des Stoffwechsels führte. Die Übertragung der vorgeschlagenen Stoffwechselwege auf den lebenden Organismus ist nur bedingt möglich und zulässig. Im Verlauf der Forschung wurden eine Reihe von bindenden Proteinen und Rezeptoren für Inositolphosphate gefunden¹⁹. In den meisten Fällen ist die physiologische Bedeutung dieser Wechselwirkungen jedoch noch unklar und lässt damit Raum für viele Spekulationen.

Die Ähnlichkeiten von Dictyosteliden mit Tier- und Pflanzenzellen und die evolutionäre Entwicklung dieser Organismen machen sie mit Blick auf die Inositolphosphate besonders interessant. Die Aufklärung des komplexen Inositolphosphatstoffwechsels in *D. discoideum*, an dem ungefähr 25 verschiedene InsPs beteiligt sind, kann eventuell die ursprünglichen Funktionen dieser Naturstoffklasse aufzeigen. Gleichzeitig könnte damit auch die Aufklärung des Stoffwechsels bei Tieren und Pflanzen erleichtert werden.

1.3.1 Niedrigphosphorylierte Inositolphosphate

Aufgrund ihrer intrazellulären Konzentrationen in *D. discoideum* lassen sich phosphorylierte InsP_x ($x=1-5$) mit ortho-Phosphatgruppen in zwei Gruppen einteilen. Die Konzentrationen der InsP_x ($x=1-4$) sind kleiner als $5 \mu\text{M}$, während die Inositolpentakisphosphate in Konzentrationen zwischen 5 und $30 \mu\text{M}$ vorkommen.

Die **Inositolmonophosphate** $\text{Ins}(1)\text{P}$, $\text{Ins}(3)\text{P}^{20}$ und $\text{Ins}(4)\text{P}^{21}$ wurden in Zellextrakten von *Dictyostelium* identifiziert. $\text{Ins}(3)\text{P}$, das Produkt der *de-novo*-Synthese aus *myo*-Inositol,

wird als Ausgangsverbindung zum Aufbau von InsP_6 beschrieben²². $\text{Ins}(1)\text{P}$ und $\text{Ins}(4)\text{P}$ gelten als Abbauprodukte. Physiologische Wirkungen konnten noch nicht nachgewiesen werden.

Von den möglichen Isomeren der **Inositolbisphosphate** sind $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$, $\text{Ins}(4,5)\text{P}_2$ und $\text{Ins}(3,6)\text{P}_2$ gefunden worden. Der Abbau von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ durch eine 1- bzw. 5-Phosphatase²¹ führt zu $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$ und $\text{Ins}(4,5)\text{P}_2$, während $\text{Ins}(3,6)\text{P}_2$ ein Intermediat der InsP_6 -Biosynthese ist²³. Die Beteiligung von $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$ an der DNA-Replikation durch Stimulation der DNA-Polymerase α in einigen Zelllinien konnte gezeigt werden²⁴. Es wird weiterhin vermutet, dass $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$ eine funktionelle Rolle in Herzmuskelzellen spielt²⁵. Vergleichbare Funktionen wurden bei *D. discoideum* bislang nicht untersucht.

In *D. discoideum* wurden einige **Inositoltrisphosphate** detektiert. In höheren Zellen ist $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ an der Signaltransduktion beteiligt. Es entsteht bei der Hydrolyse von $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, einem Phosphatidylinositolphosphat (PIP_x) der Plasmamembran, durch die hormonsensitive Phospholipase C und mobilisiert intrazelluläre Calciumspeicher. Auch in *D. discoideum* wurde die Calciumfreisetzung durch $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ festgestellt. Die Bedeutung des Signaltransduktionswegs über PIP_2 ist hier allerdings noch nicht aufgeklärt²⁶ und offensichtlich nicht der einzige Stoffwechselweg zum $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$. $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ entsteht in *D. discoideum* auch bei der Dephosphorylierung von $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ durch eine Ca^{2+} -abhängige 3/6-Bisphosphatase^{23,27}. $\text{Ins}(3,4,6)\text{P}_3$ ist ein Metabolit der InsP_6 -Biosynthese²². Weitere Inositoltrisphosphate entstehen aus der Phytasereaktion ($\text{Ins}(1,2,3)\text{P}_3$, $\text{Ins}(1,2,4)\text{P}_3$, $\text{Ins}(1,2,6)\text{P}_3$). Die Phytase ist eine membranassoziierte InsP_6 -Phosphohydrolase, die bevorzugt Phosphatgruppen in den Positionen 3, 5 und 6 abspaltet²⁸. $\text{Ins}(1,2,6)\text{P}_3$ ist daneben auch ein Produkt der $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatasereaktion²⁹. Die Beteiligung der Inositoltrisphosphate am intrazellulären Eisentransport und Funktionen als endogene Suppressoren toxischer, radikalischer Oxidationsreaktionen werden diskutiert. Ebenso konnten entzündungshemmende, schmerzstillende und vasodilatorische Wirkungen des $\text{Ins}(1,2,6)\text{P}_3$ bei Tierversuchen festgestellt werden, wobei allerdings die molekulare Wirkungsweise bisher nicht geklärt wurde³⁰. $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ wird in tierischen Zellen als wichtige Vorstufe zur Synthese von $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$, InsP_6 und den diphosphorylierten Inositolphosphaten beschrieben³¹. Dieser Stoffwechselweg ist in *D. discoideum* nicht bekannt.

In Extrakten von *Dictyostelium*-Zellen, die in vollsynthetischem Medium oder auf Bakterienrasen wachsen, kommen verschiedene **Inosoltetrakisphosphate** nur in Spuren

vor. Von den gefundenen InsP_4 -Isomeren passen nur einige in die bekannten Stoffwechselwege. Den meisten dieser Verbindungen konnten bislang keine eindeutigen Funktionen zugeordnet werden. $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ entsteht durch die enzymatisch katalysierte Phosphorylierung von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$. In höheren Zellen wird der Botenstoff durch diese Reaktion deaktiviert. $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ schützt $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ vor der Hydrolyse durch eine $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 5-Phosphatase und steigert damit möglicherweise die Effektivität des second messengers³². $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ selbst ist wie $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ein intrazelluläres Signalmolekül, das Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran aktiviert³³. Neuere Studien belegen in höheren Zellen eine Beteiligung von $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ an der Signaltransduktion, die durch ein GTPase-aktivierendes Protein (GAP) vermittelt wird³⁴. $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$, ein weiterer physiologisch relevanter Metabolit, inhibiert Ca^{2+} -abhängige Chloridkanäle. Die Regulation der Chloridsekretion über die Plasmamembran ist Teil eines Prozesses, durch den die Salz- und Flüssigkeitssekretion in der Lunge, in exokrinen Drüsen und im Gastrointestinaltrakt reguliert werden³¹, und hat damit Auswirkungen auf die Osmoregulation, die pH-Balance und die Muskeleerregbarkeit³⁵.

In *D. discoideum* wird die Phosphorylierung von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ zu $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ nur in Zellkernpräparaten beobachtet³⁶. Gleichzeitig kommt $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ ebenso wie $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ als Abbauprodukt von $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ vor. Weitere Inositoltetrakisphosphate treten als Intermediate der InsP_6 -Biosynthese und des InsP_6 -Abbaus, als Produkte von Phytase-Reaktionen mit verschiedenen Substraten und anderer enzymatisch katalysierter Reaktionen im Inositolphosphatstoffwechsel auf⁶.

Im Gegensatz zu den Inositoltris- und Inosoltetrakisphosphaten scheinen die **Inositolpentakisphosphate** in *D. discoideum* hauptsächlich im Gleichgewicht mit InsP_6 zu stehen. An diesen futilen Substratzyklen sind ATP-verbrauchende InsP_5 -Kinasen beteiligt. Als Antagonist der Kinasen kann die membranassoziierte Phytase angesehen werden, die unter anderem InsP_6 zu InsP_5 abbaut. Die Substratzyklen dienen vermutlich der Regulation der InsP_6 -Konzentration.

$\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ kommt in *D. discoideum* nur in geringen Konzentrationen vor, zeigt aber Konzentrationsschwankungen während der Zellteilung (S. Adelt, pers. Mitteilung). Das weist auf eine physiologische Relevanz hin, wurde aber noch nicht weiter untersucht. $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ ist wahrscheinlich ein Knotenpunkt im Inositolphosphatstoffwechsel. In *D. discoideum* wird dieser Metabolit als direkter Vorläufer von InsP_6 angesehen³³. Er entsteht

sowohl aus $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ als auch aus $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$ und kann zu $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ abgebaut werden²³. Die Rezeptorstimulierte Dephosphorylierung von $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ in höheren Zellen impliziert eine physiologische Bedeutung³³. In kernhaltigen Erythrozyten von Vögeln und Amphibien reguliert $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ durch die Bindung an Hämoglobin dessen Sauerstoffaffinität³⁷. In den kernlosen Erythrozyten von Säugetieren, reguliert dagegen 2,3-Bisphosphoglycerat die Sauerstoffaffinität von Hämoglobin³⁴.

1.3.2 Inositolhexakisphosphat (InsP_6 / Phytat)

InsP_6 wurde ursprünglich vor ca. 80 Jahren als Phosphat-speichermolekül in Pflanzen entdeckt. Der Gehalt in Pflanzenzellen beträgt 1-3% (w/w). Besonders hoch ist der Phytatgehalt in Pflanzensamen mit bis zu 6%. Damit sind zwischen 50-90% des gesamten Phosphatvorrats in InsP_6 gespeichert. Pflanzen lagern Phytat in Proteinbodies ab, die vor allem in den Samen angereichert werden. Während des Keimungsprozesses wird unter anderem das eingeschlossene InsP_6 durch Phytasen abgebaut. Der Keim erhält aus diesem InsP_6 -Abbau Phosphat, Inositol und lebenswichtige Ionen.

Nachfolgend wurde festgestellt, dass InsP_6 ubiquitär in Zellen auftritt und das häufigste natürlich vorkommende Inositolphosphat ist³⁸. Die intrazelluläre Konzentration von InsP_6 in tierischen Zellen liegt zwischen 10 und $100\mu\text{M}$. In *Dictyostelium* ist die InsP_6 -Konzentration ungefähr 10 mal höher und liegt im Bereich von 300 - $600\mu\text{M}$ ³⁹. Ähnlich wie bei vielen anderen Inositolphosphaten sind inzwischen einige Stoffwechselwege bekannt, die von InsP_6 durchlaufen werden. Während in Säugetierzellen die Biosynthese von InsP_6 nicht vollständig abgesichert ist, ist der anabole Metabolismus in Pflanzen und *Dictyostelium*, ausgehend vom Inositol über $\text{Ins}(3)\text{P}$ gefolgt von einer Reihe stereoselektiver, sequentieller Kinasereaktionen, bekannt³⁴. In Säugetierzellen wird die sequentielle Phosphorylierung ausgehend von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ zum $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ beschrieben. Der letzte Schritt, der durch eine 2-Kinase katalysiert wird und zum InsP_6 führt, ist bisher nur in Hefen dokumentiert^{38,40}.

In den vergangenen Jahren wurden einige physiologische Funktionen von InsP_6 gezeigt, die hier kurz dargestellt werden. Fast alle Funktionen, die InsP_6 zugeordnet werden, setzen lokal begrenzte Pools von Inositolphosphaten voraus, deren Fluktuationen für die Effekte verantwortlich sein müssen. Nur so lassen sich die unterschiedlichsten physiologischen Aufgaben, die zum Teil sehr hohe Stoffwechselraten von InsP_6 erfordern, mit dem scheinbar

statischen zellulären InsP_6 -Pool in Einklang bringen. Fraglich ist, ob die *in vitro* Ergebnisse ohne weiteres auf physiologische Bedingungen *in vivo* übertragen werden können³⁹.

Eine antioxidative Wirkung von InsP_6 konnte nachgewiesen werden. Eisen(III)-Ionen katalysieren die Bildung reaktiver OH-Radikaler in Zellen und die Peroxidation von Lipiden. Beiden Prozessen wird eine kanzerogene Wirkung zugeschrieben. InsP_6 inhibiert durch Komplexierung der Eisenionen diese Reaktionen. Studien mit entarteten Zellen belegen, dass InsP_6 die Bildung von Krebs reduzieren⁴¹ und das Wachstum bereits bestehender Tumore verringern⁴² kann. In diesem Zusammenhang wird auch eine mögliche Bedeutung von InsP_6 als niedermolekularer Eisentransporter diskutiert.

Generell bildet InsP_6 mit 2- und 3-wertigen Ionen Komplexe und kann somit die Verfügbarkeit dieser Ionen in biologischen Systemen stark reduzieren. Neben diesem Chelat-effekt begrenzen die Unlöslichkeit von Ca^{2+} - bzw. Mg^{2+} -Salzen und die elektrostatische Bindung von InsP_6 an Proteine auch die intrazelluläre Verfügbarkeit von InsP_6 .

In Pflanzen wird Inositolhexakisphosphat als physiologisches Signal beschrieben, das als Antwort auf das Stresshormon Abscisinsäure in Leitzellen gebildet wird. InsP_6 und Abscisinsäure sind an der Regulation der Stomata beteiligt, über die der Wasserhaushalt der Pflanze reguliert wird⁴³. Die intrazelluläre InsP_6 -Konzentration steigt als Konsequenz des hyperosmotischen Stresses. In Folge aktiviert InsP_6 K^+ -Kanäle und Ca^{2+} -Kanäle in der Vakuolenmembran und mobilisiert über letztere Calcium aus dem Endomembranvorrat⁴⁴.

InsP_6 könnte durch seine antineoplastische Wirkung⁴⁵, zur Vorbeugung der Nierensteinbildung⁴⁶ und als zelluläres Antioxidans⁴⁷ pharmakologisch bedeutsam sein.

Hochaffine Bindestellen für InsP_6 wurden in Zellmembranen bestimmter Gehirnregionen detektiert. Hier wird eine Beteiligung von InsP_6 an der Freisetzung von Neurotransmittern postuliert³⁸. Weiterhin wird die Interaktion von InsP_6 mit regulatorischen Proteinen und damit die Modulation von Rezeptorsensibilitäten diskutiert. Sie kann über zwei Mechanismen erfolgen. Die schnelle Adaption von G-Protein gekoppelten Rezeptorklassen führt zur Desensibilisierung dieser Rezeptoren, während die längerfristige Adaption verschiedener Rezeptorklassen zu einer geringeren Sensitivität⁴⁸ der entsprechenden Rezeptoren führt.

Inzwischen sind einige weitere hochaffine Bindeproteine für InsP_6 bekannt. Aufgrund der hohen negativen Ladung von InsP_6 neigt dieser Metabolit stark zu unspezifischen, elektrostatischen Wechselwirkungen, so dass die Ergebnisse dieser Studien mit besonderer Vorsicht zu interpretieren sind. Im Zusammenhang mit der Internalisierung und dem

Recycling von Membranen bei endocytotischen Prozessen wurden die Bindung an Vesikeladaptorproteine wie den Clathrin-Assembly-Proteinen AP-2⁴⁹, AP-3 und AP-180⁵⁰, an Arrestin⁵¹ sowie die Bindung an Coatomer^{52,53} dokumentiert. Ebenso wurde die Bindung an Myelin-Proteolipid-Protein und Ca²⁺-Kanäle des L-Typs beschrieben³⁸.

Weitere Funktionen ergeben sich aus Studien, in denen eine spezifische Phosphorylierung durch InsP₆ belegt werden konnte. Neben der Regulation der Proteinkinase C und verschiedenen Proteinphosphatasen ist eine InsP₆-abhängige Proteinkinase zu nennen. Durch die spezifische Phosphorylierung steigt die Interaktion zwischen den endocytotischen Proteinen Pacsin/Syndapin I und Dynamin I, die unter anderem im synaptischen Vesikelrecycling involviert sind⁵⁴.

Auch an Prozessen, die im Zellkern stattfinden, ist nach neueren Untersuchungen InsP₆ beteiligt. Zu erwähnen ist hier die Beteiligung an einem Reparaturmechanismus für strahlungs- und chemisch induzierte DNA-Doppelstrangbrüche durch Aktivierung einer DNA-abhängigen Proteinkinase, die Teil eines multimeren DNA-Endjoining-Komplexes ist⁵⁵. Aufgrund von Mutationsstudien in Hefen konnte belegt werden, dass die Phospholipase C-abhängige InsP₆-Synthese essentiell für die Effizienz des mRNA-Exportes aus dem Zellkern ist^{56,57}. Weitere Hinweise auf diese physiologische Funktion ergaben Studien mit Säugetierzellen, bei denen die Expression der heterologen Inositolphosphat Phosphatase SopB induziert wurde. Die Akkumulation von mRNA in den Zellkernen konnte als Folge des 6 Stunden nach der Induktion fehlenden InsP₆ nachgewiesen werden⁵⁸. Außerdem wird die Beteiligung von InsP₆ an der Transkriptionskontrolle diskutiert⁵⁹.

1.4 Übersicht des Inositolphosphatstoffwechsels in *D. discoideum*

Viele Experimente zur Aufklärung des Stoffwechsels der Inositolphosphate in *Dictyostelium* wurden mit Zellen in der vegetativen Wachstumsphase oder frühen Aggregationsphase durchgeführt. Der Stoffwechsel während der Differenzierung ist bislang wenig untersucht worden. Die Zellen oder auch Zellhomogenate wurden zum Teil mit isopenmarkierten Substraten versetzt und das entstehende Metabolitmuster untersucht. Häufig wurden dabei die beteiligten Enzyme hinsichtlich ihrer Substratspezifität und einer möglichen Kompartimentierung innerhalb der Zelle nicht charakterisiert. Aus diesen Untersuchungen und Erkenntnissen aus anderen Organismen kann ein Schema des offenbar sehr komplexen Inositolphosphatstoffwechsels in *Dictyostelium* aufgestellt werden (Abb. 1-3). Das

1. Einleitung

Schema kann aber nur eine Arbeitshypothese sein und möglicherweise durch weitere Ergebnisse ergänzt und vervollständigt werden.

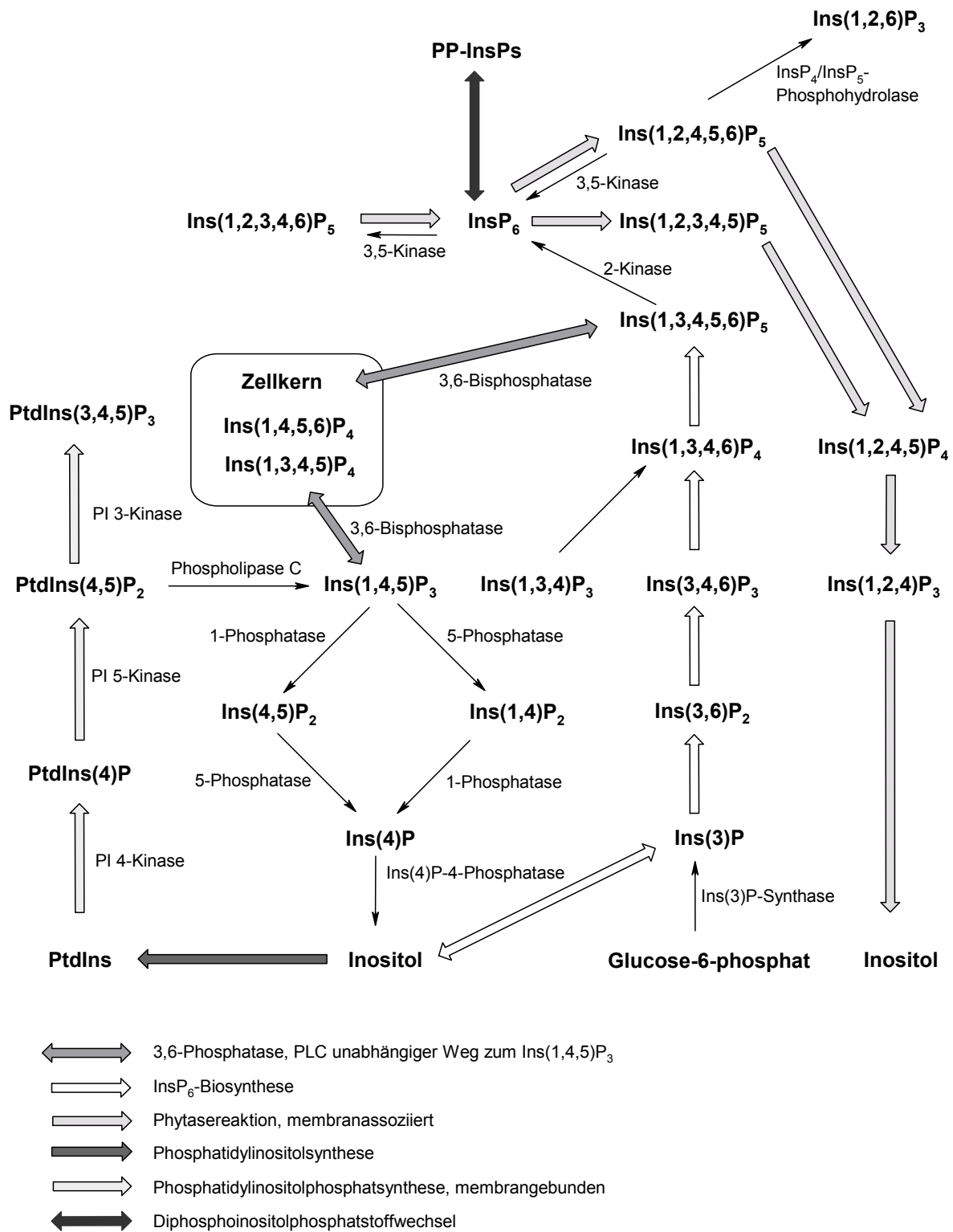


Abb. 1-3: Arbeitshypothese zum Inositolphosphatstoffwechsel in *D. discoideum*

1.5 Diphosphoinositolphosphate

Diphosphoinositolphosphate repräsentieren eine neue Klasse von hochphosphorylierten Inositolphosphaten mit „energiereichen“ Diphosphatgruppen. Sie wurden 1989 erstmalig aufgrund ihrer Elutionseigenschaften von Anionenaustauschersäulen in Inositolphosphatgemischen, die aus Zellen von *Dictyostelium discoideum* extrahiert wurden, vermutet². Ein direkter Nachweis von „InsP₇“ und „InsP₈“ *in vitro* gelang 1992 durch die Phosphorylierung von Inositolphosphaten und *in vivo* durch ihr Vorkommen in Extrakten von *D. discoideum*⁶⁰. Die ungewöhnliche Gruppe hochgeladener Inositolphosphate ist offenbar ubiquitär verbreitet. Sie wurden in einer Vielzahl phylogenetisch unterschiedlicher Organismen wie z.B. solitär lebenden Amöben (*Entamoeba histolytica*⁶¹ und *Phreatamoeba balamuthi*⁶²), in Hefen und einer Reihe verschiedener Säugetierzellen entdeckt.

Die intrazellulären Konzentrationen der Diphosphoinositolphosphate liegen in *Dictyostelium* und verwandten Dictyosteliden zwischen 10 und 300 μM und sind damit bis zu 300fach höher als in Säugetierzellen^{6,63}. Ausreichende Mengen zur Charakterisierung dieser Metabolite konnten daher bislang nur aus Zellextrakten von *Dictyostelium* und *Polysphondylium pallidum* gewonnen werden.

Durch die massenspektrometrische Analyse und partielle saure Hydrolyse der Verbindungen in *Dictyostelium* konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass es sich um *myo*-Inositolphosphate mit einer bzw. zwei Diphosphatgruppen handelt. Basierend auf ³¹P-NMR-Spektren wurden zunächst aufgrund von sterischen und elektrostatischen Wechselwirkungen die Strukturen 1-PP-InsP₅ und 1,4-bis-PP-InsP₄ postuliert⁶⁴. Die Strukturaufklärung der PP-InsPs gelang dann im hiesigen Arbeitskreis durch 2D-NMR-Analysen und enzymatische Methoden. D-6-Diphospho-*myo*-Inositolpentakisphosphat (6-PP-InsP₅) ist in *Dictyostelium discoideum* das prominentere InsP₇-Isomer. D-5,6-Bisdiphospho-*myo*-Inosoltetrakisphosphat (5,6-bis-PP-InsP₄), das InsP₈-Isomer, besitzt entgegen der ursprünglichen Vermutung zwei benachbarte Diphosphatgruppen⁵.

Neben 6-PP-InsP₅ kommt in geringeren Konzentrationen auch 5-PP-InsP₅ (10%) in *Dictyostelium* vor. In *Polysphondylium pallidum*, einer verwandten Dictyostelidenart, ist 5-PP-InsP₅ (70%) das Hauptisomer. Daneben wurde in diesem Organismus ein weiteres InsP₈-Isomer, 3,5-bis-PP-InsP₄, identifiziert, dessen Existenz in *Dictyostelium* nicht nachgewiesen werden konnte⁶⁵.

1.5.1 Diphosphoinositolphosphate in anderen Organismen

Nach der Entdeckung der PP-InsPs in *Dictyostelium* wurde diese Stoffklasse in Zelltypen verschiedener Organismen gesucht. Das Auftreten dieser Verbindungsklasse in solitär lebenden Amöben wie *Entamoeba histolytica*⁶¹ und *Phreatamoeba balamuthi*⁶² konnte gezeigt werden. In diesen Organismen treten jedoch die *neo*-Isomere der Inositolphosphate auf. Hochphosphorylierte *myo*-Inositolphosphate wurden in HL60-Zellen, menschlichen Astrozytomzellen und Makrophagen aus Mäuseknochen in deutlich geringeren Konzentrationen (0,5 – 3 μM) gefunden⁶⁶. Weitere Arbeiten beschreiben das Vorkommen von diphosphorylierten Inositolphosphaten in Pankreatomazellen⁶⁷, Hepatozyten⁶⁸, Hefe- und Pflanzenzellen⁴³. Die Metabolite Diphosphoinositoltrikisphosphat (PP-InsP₄) und Bisdiphosphoinositoltrisphosphat (bis-PP-InsP₃) mit einer freien Hydroxylgruppe, werden als Produkte der Phosphorylierung von Ins(1,3,4,5,6)P₅ bzw. PP-InsP₄ in Säugetierzellen beschrieben³⁸. Diese Diphosphoinositolphosphate wurden in *Dictyostelium* bisher nicht gefunden. Alle identifizierten PP-InsPs in diesen Organismen wurden durch ihr Elutionsverhalten von Anionenaustauschern nachgewiesen. Mit Ausnahme von 5-PP-InsP₅, welches vermutlich das natürlich vorkommende InsP₇-Isomer in Säugetierzellen ist⁶⁹, sind aufgrund der geringen Mengen die Strukturen der Verbindungen bisher nicht bekannt. Die Metabolite besitzen möglicherweise abhängig von Organismus und Zelltyp unterschiedliche physiologische Funktionen⁷⁰.

1.5.2 Metabolismus der Diphosphoinositolphosphate

Nach bisherigen Studien ist in *D. discoideum* InsP₆ die Vorstufe von InsP₇ und InsP₈^{3,71}. Markierungsexperimente mit [³H]-InsP₆ in zellfreien Extrakten in Gegenwart von ATP führten zunächst zu der Vermutung, dass es einen raschen Substratzyklus zwischen diesen drei Verbindungen gibt. Auch Arbeiten zum Metabolismus in Säugetierzellen deuten auf einen schnellen Umsatz der PP-InsPs hin⁶⁶. In Experimenten, bei denen Fluorid als Phosphataseinhibitor eingesetzt wurde, konnte gezeigt werden, dass 20-50% des zellulären InsP₆ pro Stunde den Diphosphoinositolphosphatzyklus durchlaufen⁶⁷. Basierend auf diesen Studien wurde ein Modell aufgestellt, nach dem bis-(PP)-InsP₄ durch Phosphorylierung aus PP-InsP₅ und dieses wiederum aus InsP₆ entsteht. Der Abbau der diphosphorylierten Inositolphosphate erfolgt in umgekehrter Reihenfolge durch Dephosphorylierung. Für jeden

Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsschritt wird eine spezifische Kinase bzw. Phosphatase vorausgesetzt (Abb. 1-4). Durch diese Substratzyklen würden jedoch erhebliche Mengen ATP hydrolysiert. Deshalb wurde angenommen, dass den Diphosphoinositolphosphaten eine essentielle Bedeutung *in vivo* zukommt.

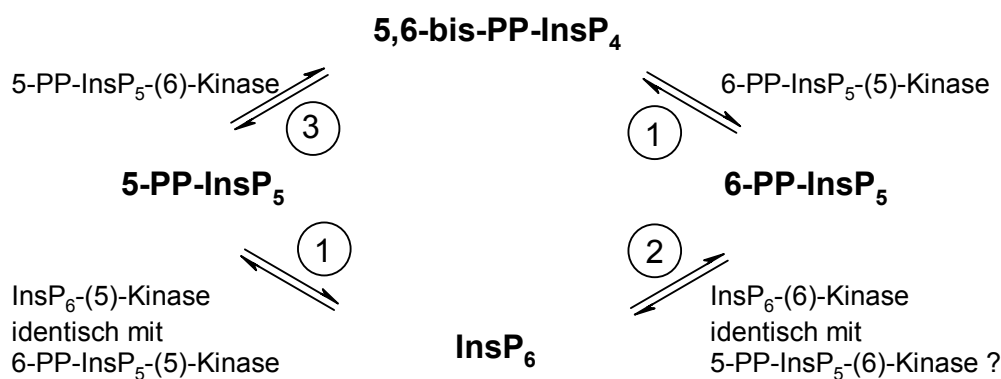


Abb. 1-4: Arbeitshypothese zum Stoffwechsel der Diphosphoinositolphosphate in *Dictyostelium discoideum*

1: identifiziertes und charakterisiertes Enzym; 2: identifiziertes Enzym, nicht charakterisiert; 3: postulierte, aber nicht identifizierte Enzymaktivitäten

Aus *D. discoideum* wurde eine 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase (InsP₇-Kinase) gereinigt und bezüglich ihrer Eigenschaften charakterisiert⁶. Dieses cytosolische Enzym katalysiert hochspezifisch die reversible Phosphorylierung von 6-PP-InsP₅ in 5-Position. Das Enzym zeigt daneben auch eine InsP₆-Kinaseaktivität mit geringerer Substrataffinität und Geschwindigkeit. Unter Berücksichtigung der Eigenschaften der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase kann für *Dictyostelium* ein schneller Stoffwechsel der Diphosphoinositolphosphate ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse bestätigen eher frühere Untersuchungen, die auf einen scheinbar trägen Stoffwechsel der diphosphorylierten Inositolphosphate hindeuten².

Eine InsP₆-Kinase aus *D. discoideum* wurde kloniert und überexprimiert⁷². Die Charakterisierung dieses Enzyms steht allerdings noch aus. Die InsP₆-Kinaseaktivität konnte bisher nicht in Zellextrakten nachgewiesen werden. Membranassoziierte Phosphatasen können die Pyrophosphatgruppen spalten, cytosolische Abbauaktivitäten wurden hingegen nicht gefunden.

Bisher wurde die Regulation des Diphosphoinositolphosphatstoffwechsels in *Dictyostelium* nicht im Detail untersucht. Es gibt aber einige Hinweise auf eine strikte Regulation. Die intrazellulären Konzentrationen der PP-InsPs sind bei *D. discoideum* abhängig von den Wachstumsbedingungen und der Differenzierungsphase. Da die PP-InsPs in

der späten exponentiellen Wachstumsphase oder unter Hungerbedingungen stark angereichert werden⁶³, liegt die Vermutung nahe, dass die Biosynthese dieser Verbindungen mit hoher Wahrscheinlichkeit über den „prestarvation response“ (PSR) der Zellen reguliert wird. Der PSR wird durch den Prestarvation Faktor (PSF) vermittelt, der für die Erkennung der Zelldichte verantwortlich ist und unter Hungerbedingungen akkumuliert. Die Expression von Genen, die Proteine des cAMP-Signalsystems codieren, wird unter anderem auch durch den PSF reguliert. Das cAMP-Signalsystem selbst reguliert die Expression der meisten entwicklungsabhängig regulierten Gene. Vegetative Gene werden durch einen Anstieg der cAMP-Konzentration reprimiert, während die Expression von Genen, die mit dem Aggregationsprozess assoziiert sind, induziert wird⁷³. Mit dem Anstieg der cAMP-Konzentration steigen auch die Konzentrationen der Diphosphoinositolphosphate stark an⁷². Damit könnte der Stoffwechsel der hochphosphorylierten Inositolphosphate in *Dictyostelium* auch über die cAMP-Konzentration reguliert werden.

In den letzten Jahren wurden viele Enzyme in Hefen und Säugetierzellen identifiziert, die an dem Stoffwechsel der Diphosphoinositolphosphate beteiligt sind (Abb. 1-5). Diphosphoinositolphosphate werden in Hefen und Säugetierzellen ausgehend von InsP₅ und InsP₆ gebildet. Katalytisch aktiv sind hierbei Inositolphosphatmultikinasen (IPMK)^{74,75} und eine Familie von InsP₆-Kinasen^{76,77,78} mit unterschiedlichen Lokalisierungen in den Zellen und unterschiedlichen Aktivitäten. Aus Rattenhirn wurde eine InsP₇-Kinase isoliert und charakterisiert⁷⁹. Bei der Charakterisierung der InsP₆-Kinasen und InsP₇-Kinase konnte die Reversibilität dieser Kinasereaktionen gezeigt werden. Diese Reversibilität und gleichzeitige ATP-Synthaseaktivität wurden als Besonderheit dieser Enzyme herausgestellt, sind aber in erster Linie die Konsequenz der fast identischen Phosphatgruppenübertragungspotentiale von Diphosphoinositolphosphaten und ATP. Dennoch hat die ATP-Synthaseaktivität zu der Vermutung geführt, dass PP-InsPs als Phosphatgruppendonoren für Proteine fungieren und damit möglicherweise Schalterfunktionen im Organismus übernehmen könnten.

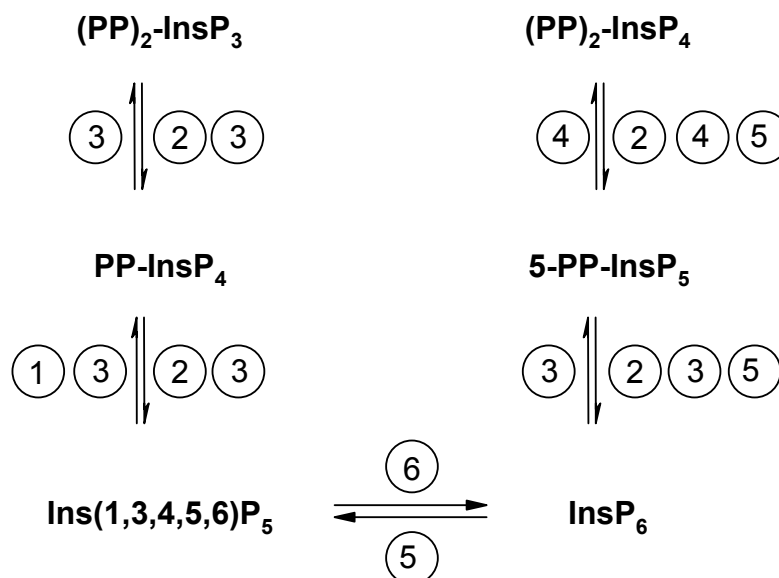


Abb. 1-5: Stoffwechsel der Diphosphoinositolphosphate in Hefen und Säugetierzellen

Die eingekreisten Zahlen stehen für die beteiligten Enzyme.

- 1 Inositol Polyphosphat Multikinasen (IPMK), ArgRIII
- 2 Diphosphoinositol Polyphosphat Phosphohydrolasen (DIPP)
- 3 Inositolhexakisphosphatkinase-Familie: InsP₆K, PiUS, Kcs1p
- 4 Diphosphoinositolpentakisphosphatkinase (InsP₇-Kinase)
- 5 Multiple Inositol Polyphosphat Phosphatasen (MIPP bzw. MinPP)
- 6 Inositolpentakisphosphat-(2)-Kinase (InsP₅-(2)-Kinase)

In Säugetierzellen kann der Abbau der Diphosphoinositolphosphate prinzipiell über drei unterschiedliche enzymatische Routen erfolgen³⁸. An erster Stelle stehen die reversen Kinasereaktionen. PP-InsPs können auch katalysiert durch Multiple Inositol Polyphosphat Phosphatasen (MIPP)⁸⁰ und Diphosphoinositol Polyphosphat Phosphohydrolasen (DIPP)^{81, 82, 83,84} unter Freisetzung von Phosphat dephosphoryliert werden. Welcher dieser Wege der metabolisch relevanteste Weg ist, lässt sich zur Zeit nicht beurteilen. Auf jeden Fall ist bei der Interpretation der Substratspezifitäten zu berücksichtigen, dass die Substrate wie auch die Produkte der jeweiligen Enzymreaktionen strukturell nicht eindeutig identifiziert wurden.

In höheren Zellen konnte ein Zusammenhang zwischen der cAMP-abhängigen Aktivierung β_2 -adrenerger Rezeptoren und der Abnahme der intrazellulären InsP₈-Konzentration gezeigt werden⁸⁵. Ebenso sinken nach der Zugabe von Thapsigargin, einem spezifischen Inhibitor der Ca²⁺-ATPase des endoplasmatischen Reticulums, die Konzentrationen von InsP₇ und InsP₈⁷⁰. Beide Prozesse verändern den Status der intrazellulären Ca²⁺-Pools. Möglicherweise sind diese Statusänderungen das Signal, welches die Syntheserate der Diphosphoinositolphosphate in höheren Organismen verändert.

1.5.3 Funktionen der Diphosphoinositolphosphate

Über die physiologische Bedeutung der Diphosphoinositolphosphate ist nur wenig bekannt. Diese Verbindungen sind synthetisch schwer und nur in begrenztem Maß zugänglich. Deshalb wurde bei vielen Studien InsP_6 , die Vorstufe der PP-InsPs, enzymatisch mit Hilfe von Zellextrakten oder rekombinanten Enzymen phosphoryliert bzw. radioaktiv markiert. Diese Reaktionsprodukte wurden gleichzeitig als Substrate und Referenzsubstanzen für *in vitro* Studien eingesetzt. Da die Strukturen der Diphosphoinositolphosphate in höheren Organismen nicht geklärt wurden, ist eine Interpretation der Ergebnisse in Bezug auf physiologische Funktionen häufig sehr spekulativ.

Gene können mit heute etablierten molekularbiologischen Methoden gezielt ausgeschaltet werden. Dies verhindert die Expression definierter Proteine oder Enzyme, die mutmaßlich am Stoffwechsel dieser hochphosphorylierten Verbindungen beteiligt sind. Die Untersuchung des Phänotyps solcher gendefekter Mutanten und die Analyse der auftretenden Inositolphosphatmuster erlaubt Rückschlüsse auf mögliche physiologische Funktionen der Diphosphoinositolphosphate. In vielen Fällen zeigen die entsprechenden Enzyme nicht nur enzymatische Aktivität einem einzigen Metaboliten gegenüber, vielmehr werden die Konzentrationen mehrerer Inositolphosphate moduliert. Damit bleiben die Rückschlüsse häufig sehr spekulativ.

PP-InsPs sind „energiereiche“ Verbindungen mit hohem Phosphatgruppenübertragungspotential, ähnlich dem von ATP. Als solche könnten sie eine Energiespeicherfunktion besitzen. Gerade bei *Dictyostelium*, wo die Diphosphoinositolphosphate in relativ hohen Konzentrationen auftreten, wäre diese Funktion möglich. Gegen diese Vermutung spricht allerdings die Tatsache, dass die 6-PP- InsP_5 -(5)-Kinase aufgrund ihrer enzymatischen Aktivität nicht in der Lage wäre, einen hohen ATP-Verbrauch hinreichend schnell durch Übertragung der β -Phosphatgruppe von 5,6-bis-PP- InsP_4 auf ADP zu kompensieren. Des Weiteren enthalten Dictyosteliden mehr als 10 mM Polyphosphat⁸⁶, das in frei reversibler Reaktion zur ATP-Synthese genutzt werden kann. Im Vergleich dazu sind die PP-InsPs-Konzentrationen zu gering, um in diesem Zusammenhang von Bedeutung zu sein⁶. Auch für höhere Organismen ist die Funktion als Energiespeichermolekül auszuschließen, da hier die Konzentrationen deutlich geringer sind als in Dictyosteliden⁶⁸.

Aufgrund ihres hohen Phosphatgruppenübertragungspotentials könnten die Diphosphoinositolphosphate Proteine spezifisch phosphorylieren und auf diesem Weg regulatorische

Aufgaben übernehmen. Die mögliche Funktion als direkter Phosphatgruppendonator für Proteine wurde bereits in der Literatur beschrieben^{38,79,87}.

Der Membranfluss ist ein physiologischer Prozess, der eventuell durch Diphosphoinositolphosphate moduliert werden kann. Diese Vermutung manifestiert sich inzwischen durch experimentelle Befunde. Diphosphoinositolphosphate binden stärker an die Assemblyproteine AP-2⁶⁶, AP-3⁵⁰ und AP-180³⁴ als InsP₆. Durch diese Wechselwirkung wird das Clathrinassembly wirkungsvoll inhibiert. Clathrin ist ein sehr prominentes Protein im Hirngewebe und das Assembly ist das Schlüsselereignis in der Endocytose. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass AP-3 und damit gleichzeitig die Endocytose durch die Dephosphorylierung von AP-3-gebundenem InsP₇ zu InsP₆ aktiviert werden⁷⁰. Im Vergleich zu InsP₆ ist die Bindungsaffinität von PP-InsPs zu Coatomer ebenfalls größer^{52,53}.

Effektiver als InsP₆ stimuliert InsP₇ eine Proteinkinase, die Pacsin/Syndapin I phosphoryliert und damit die Interaktion mit Dynamin I verstärkt. Diese Interaktion (s. auch Kap. 1.3.2) ist von essentieller Bedeutung für das synaptische Vesikelrecycling⁵⁴.

Untersuchungen verschiedener Knockout-Mutanten, denen die InsP₆-Kinaseaktivität und als Reaktion darauf die Diphosphoinositolphosphate fehlen, sprechen für eine Beteiligung dieser Verbindungen an endo- und exocytotischen Prozessen. Gerade die Beteiligung der Diphosphoinositolphosphate an endo- und exocytotischen Prozessen könnte für *Dictyostelium* besonders interessant sein, da diese Amöbenart ein professioneller Phagozyt ist. Die Deletion der InsP₆-Kinase in Hefen führte zu Defekten in der Vakuolenmorphogenese⁷⁶ und in der Endocytose⁸⁸. In *Saccharomyces cerevisiae* besitzt Kcs1p eine Diphosphoinositolpolyphosphat-Synthaseaktivität. Nach Mutationen und KCS1-Gendeletion zeigten die Mutanten Defekte in der Vakuolenbiogenese und der Zellwandintegrität sowie eine erhöhte Sensitivität gegenüber hyperosmotischem Stress⁸⁹. InsP₆-Kinase 1 bindet an GRAB (Guanin nucleotide exchange factor for Rab3A) und vermittelt die Exocytose von synaptischen Vesikeln. Inwiefern die Diphosphoinositolphosphate hier eine Rolle spielen, bleibt jedoch unklar⁹⁰.

Eine erhöhte InsP₆-Kinaseaktivität ebenso wie ein starker Anstieg der intrazellulären InsP₇- und InsP₈-Konzentrationen wurden während der Apoptose von Ovarialkrebszellen beobachtet. Durch Deletion der InsP₆-Kinase 2 konnte die Apoptose verhindert werden⁹¹.

Veränderte InsP₇/InsP₈-Konzentrationen beeinflussen außerdem die DNA-Hyperrekombination⁹² und DNA-Endjoining-Prozesse^{55,93}, ebenso wie den mRNA-Export aus dem Zellkern⁷⁵.

Durch Sequenzvergleiche wurde eine InsP₆-Kinase in *Dictyostelium discoideum* gefunden und das Gen ausgeschaltet⁷². Dieser Gendefekt führt dazu, dass weder InsP₇ noch InsP₈ gebildet werden, während die InsP₆-Konzentration unverändert bleibt. Die Mutanten zeigen im Vergleich zum Wildtyp keine Veränderungen in Pino- und Phagozytose, DNA-Reparaturmechanismen und während des programmierten Zelltods der Prästielzellen. Ebenso bleiben Wachstumsraten, Größe und Differenzierung der Zellen normal. Auffallend ist die schnellere Aggregation und die gesteigerte Sensitivität der Mutanten gegenüber geringeren cAMP-Konzentrationen. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass auch bei *Dictyostelium* die Konzentrationen der Diphosphoinositolphosphate cAMP-stimuliert schnell und stark ansteigen. InsP₇ konkurriert selektiv mit PtdIns(3,4,5)P₃ um die Bindung an Pleckstrin homologe (PH) Domänen. InsP₇ bindet an die PH-Domäne des cytosolischen Regulators der Adenylatcyclase (Crac), der an der cAMP-induzierten Chemotaxis von *D. discoideum* beteiligt ist. Dadurch wird die Verlagerung von Crac zum führenden Ende der Zelle und seine hochaffine Bindung an PtdIns(3,4,5)P₃ in der Plasmamembran⁹⁴ während der Chemotaxis inhibiert. Die Mutanten, denen InsP₇ fehlt, zeigen eine gesteigerte Verlagerung von Crac an die Zellmembran.

Alle Untersuchungen zu physiologischen Funktionen der Diphosphoinositolphosphate geben Hinweise auf die Rolle von InsP₇ und/ oder InsP₈ als intrazelluläre Signalmoleküle. Sie machen auch deutlich, dass Diphosphoinositolphosphate abhängig von Organismus und Zelltyp durchaus unterschiedliche Funktionen haben könnten. Ebenso lassen einige dieser Studien die strenge Regulation des Stoffwechsels dieser Verbindungen vermuten.

1.6 Das *Dictyostelium discoideum* Genom

Die *Dictyostelium*-DNA besteht aus drei Teilen: dem chromosomalen Genom, dem mitochondrialen Genom und einem rDNA-Palindrom.

Das chromosomale *Dictyostelium*-Genom ist ungefähr 34 Megabasen groß und besteht aus sechs Chromosomen mit einer Größe von 4-8 Mb. Die Chromosomen werden als akro- oder telozentrisch beschrieben⁹⁵. Das Zentromer ist eingebettet in einen großen Cluster langer terminaler, sich wiederholender Retrotransposons^{96,97}, die aus mehr als 40 Elementen

zusammengesetzt sind. Ungefähr 10% des gesamten Genoms sind komplexe Wiederholungen mit unterschiedlichen Größen bis zu 7 kb⁹⁸. Charakteristisch für die *Dictyostelium*-DNA ist ihr hoher Adenin/Thymin-Gehalt (AT) von durchschnittlich 78%. In den codierenden Bereichen treten Adenin und Thymin bevorzugt in der 3. Position der Basentriplets auf¹⁴.

Nach der vollständigen Sequenzierung und Analyse des Chromosoms 2 wurde eine Anzahl von ca. 12.000 Genen für *Dictyostelium* kalkuliert. Im Vergleich dazu besitzen beispielsweise *Saccharomyces cerevisiae*⁹⁹ 6.000, *Drosophila melanogaster*¹⁰⁰ 13.600 und *Caenorhabditis elegans*¹⁰¹ 19.000 Gene. DNA-Sequenzierungen von codierenden Regionen haben gezeigt, dass *Dictyostelium*-Gene mit durchschnittlich 1.600 Basen gegenüber Genen von Säugetieren relativ klein sind. Fast 70% aller Gene besitzen wenige, kleine Introns von 50 bis 150 Basen mit einem AT-Gehalt von 87%. Introns werden von charakteristischen Spleißstellen begrenzt, die ihre Erkennung erleichtern. Diese konservativen GT-AG Dinukleotide sind an der Innenseite der Introns zu finden. Die nichtübersetzten 3'-Regionen der Gene sind 150 Basen lang und enthalten das Signal für das 3'-Processing und die Polyadenylierung¹⁰². Sogenannte „Open Reading Frames“ (ORFs), die das korrekte Ablesen der Codons unterstützen, treten alle 3-4 kb auf und machen damit die Hälfte der Sequenz aus.

Die Gendichte von einem Gen pro 2,6 kb bei *Dictyostelium* ist vergleichbar mit der Gendichte von *Schizosaccharomyces pombe* (1 pro 2,5 kb) und wird nur von *Saccharomyces cerevisiae* (1 pro 2 kb) übertroffen. Im Vergleich dazu zeigt das menschliche Genom eine Dichte von 6 – 23 Genen pro Mb¹⁰³.

Neben dem chromosomalen Genom enthält jede Zelle ungefähr 200 Mitochondrien, die das zirkuläre mitochondriale Genom von 55 kb^{104,105} tragen. Das mitochondriale Genom von *Dictyostelium* mit einem Adenin/Thymin-Gehalt von 73% ist größer als das von Säugetieren. Während des vegetativen Wachstums kann der mitochondriale DNA-Anteil (mtDNA) bis zu 40% der Gesamt-DNA betragen.

Auf dem 88 kb großen extrachromosomalen rDNA-Palindrom sind die ribosomalen RNA-Gene lokalisiert. Der Zellkern enthält ungefähr 100 Kopien des Palindroms¹⁰⁶. Damit beträgt der Anteil dieses extrachromosomalen Elements ca. 20% der Kern-DNA.

1.6.1 Das *Dictyostelium*-Genomprojekt

Seit 1998 wird das Genom von *Dictyostelium discoideum* AX4 im Rahmen einer internationalen Zusammenarbeit verschiedener Arbeitsgruppen aus Deutschland, der

Europäischen Union und den USA sequenziert und analysiert¹⁰⁷. Tabelle 1-1 gibt einen Überblick über die Arbeitsgruppen und den Status des Genomprojektes. Die komplette Genomsequenz ist seit Januar 2004 verfügbar.

Neben den genannten Gruppen, die für die Sequenzierungen, das Zusammenfügen und die Annotation des Genoms zuständig sind, werden an der Princeton University (Princeton, NJ, USA) die Chromosomen getrennt und gereinigt. Seit 2002 ist außerdem die Northwestern University (Chicago, NJ, USA) für die DictyBase und die Aufbereitung genomischer Daten verantwortlich¹⁰⁸. DictyBase ist eine Datenbank, in der umfassende Informationsressourcen über die *Dictyostelium*-Forschung online zur Verfügung stehen. In dieser Datenbank werden genomische, genetische, phänotypische und funktionelle Informationen von *Dictyostelium discoideum* organisiert und präsentiert. Aktuell stellen alle beteiligten Arbeitsgruppen ihre Daten zusammen, um das Gesamtgenom zusammenzufügen.

Chromosom	Größe (Mb)	Anzahl vorhergesagter Gene	Status	Beteiligte Gruppen
1	5,5	1784 ^(b)	beendet	1, 2
2	7	2799 ^(b)	veröffentlicht	1, 2
3	5,3 ^(a)	2000 ^(c)	Shotgun-Sequenzierung komplett wird beendet	1, 2, 3
4	6,2 ^(a)	2300 ^(c)	Shotgun-Sequenzierung komplett wird beendet	3, 4
5	5,3 ^(a)	2000 ^(c)	Shotgun-Sequenzierung komplett wird beendet	3, 4, 5, 6
6	4,1 ^(a)	1500 ^(c)	wird beendet	1-7

Tab. 1-1: Sequenzierung der Chromosomen und der Status des *Dictyostelium*-Genomprojektes

a: Größe der Chromosomen basierend auf YAC mapping¹⁰⁹; **b:** Anzahl der Gene aufgrund der kompletten Sequenz vorhergesagt; **c:** Anzahl der Gene aufgrund der Chromosomengröße und Gendichte vorhergesagt

Gruppen des *Dictyostelium* Sequencing Konsortiums:

1 Universität Köln, Köln (<http://www.uni-koeln.de/dictyostelium>); **2** Genome Sequencing Center am Institut für Molekulare Biotechnologie, Jena (<http://genome.ibm-jena.de/dictyostelium>); **3** Baylor College of Medicine, Houston, USA (<http://dictygenome.bcm.tcm.edu/>); **4** Sanger Institute, Hinxton, UK (http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_discoideum/); **5** University of Dundee, Dundee, UK; **6** Medical Research Council, Cambridge, UK (<http://www.mrc-imb.cam.ac.uk:80/happy-homepage.html>); **7** Pasteur Institute, Paris, Frankreich; Die Gruppen 1, 4, 5, 6 und 7 sind Mitglieder des EUDICT Konsortiums.

Eine Herausforderung für die Sequenzierung und das Zusammenfügen dieser Sequenzen sind der hohe AT-Gehalt der DNA und die relativ großen Chromosomen gekoppelt mit der hohen Dichte repetitiver Elemente. Besonders die Introns und angrenzenden Bereiche mit AT-Gehalten von bis zu 98% waren ein Problem.

Das Chromosom 1 ist komplett sequenziert und analysiert. Mit einer Größe von 5,5 Mb trägt es 1784 proteincodierende Gene. Die Sequenz des größten Chromosoms 2 wurde Mitte 2002 veröffentlicht, es deckt ungefähr 25% des gesamten Genoms ab. Auf diesem Chromosom sind 2799 vorhergesagte proteincodierende Gene und 73 Transfer-RNA Gene lokalisiert. Für 40% der vorhergesagten Gene existieren ESTs (Expressed Sequence Tags). 45% aller Gene zeigen Homologien zu Genen anderer Organismen, während 55% einzigartig in *Dictyostelium* sind. Ungefähr die Hälfte der Proteine, deren Gene auf dem Chromosom 2 lokalisiert sind, besitzen bekannte Proteindomänen. Damit unterstützen ESTs, Proteine und Übereinstimmungen von Proteindomänen die Vorhersage vieler Gene.

Proteine können aufgrund von Homologien automatisch klassifiziert und Funktionen oder Prozessen zugeordnet werden. Für das Chromosom 2 konnten 37% der Genprodukte mit Hilfe der Genontologie-Terminologie eingeordnet werden, während 47% nicht klassifiziert und weitere 15% nicht kategorisiert werden konnten¹⁷. Viele der Gene zeigen größere Ähnlichkeiten zu Genen der Vertebraten als zu den Genen anderer komplett sequenzierter, eukaryontischer Genome. Diese Tatsache spricht für die evolutionäre Stellung von *D. discoideum*, die in Kapitel 1.2 bereits dargestellt wurde. Die übrigen 4 Chromosomen sind ebenso wie das mitochondriale Genom und das rDNA-Palindrom inzwischen sequenziert und größtenteils analysiert.

1.6.1.1 Sequenzierungsstrategie

An dieser Stelle soll ein kurzer Überblick über die Strategie (Abb. 1-6) des Genomprojektes gegeben werden. Aufgrund der Basenkomposition und Verteilung in der DNA, die zu Schwierigkeiten bei der Sequenzierung des Genoms führen¹⁰⁷, wurde Chromosom für Chromosom mit der „Shotgun“-Methode (whole-chromosome-shotgun, WCS) sequenziert. Dazu wurden zuerst die Chromosomen durch Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE)¹¹⁰ getrennt. Parallel wurden DNA-Segmente von 150 bis 200 kb in künstliche Hefechromosomen (YAC)¹⁰⁹ subkloniert, DNA-Fragmente von 1-4 kb in pUC-Vektoren kloniert und die Klone sequenziert. Diese „Shotgun“-Sequenzen wurden zusammengeführt, indem

zunächst einige Klonsequenzen als Ausgangspunkte definiert wurden und im Anschluss die weiteren Sequenzen durch Vergleiche der YAC-Sequenzen mit den WCS-Sequenzen mit Hilfe des BLAST-Algorithmus¹¹¹ eingebunden wurden. Diese längeren zusammengesetzten DNA-Sequenzen (Contigs) wurden mit Hilfe der HAPPY-Map-Methode entlang der Chromosomen geordnet. Diese Methode basiert auf *in-vitro*-PCR und untersucht die Kosegregation von Fragmenten zufällig geschnittener DNA mit kurzen DNA-Markern, die an definierten Stellen in der Sequenz positioniert werden^{112,113}. Genkarten¹¹⁴ und eine zirkuläre YAC-Bibliothek (BAC) wurden ebenfalls zur Validierung des Assemblys herangezogen. Die Sequenzierung und Analyse von 1 Mb DNA erfordert 20.000 bis 25.000 Einzelsequenzierungen. Diese Zahlen verdeutlichen den Arbeits- und Zeitaufwand für die komplette Entschlüsselung des Genoms von *Dictyostelium*.

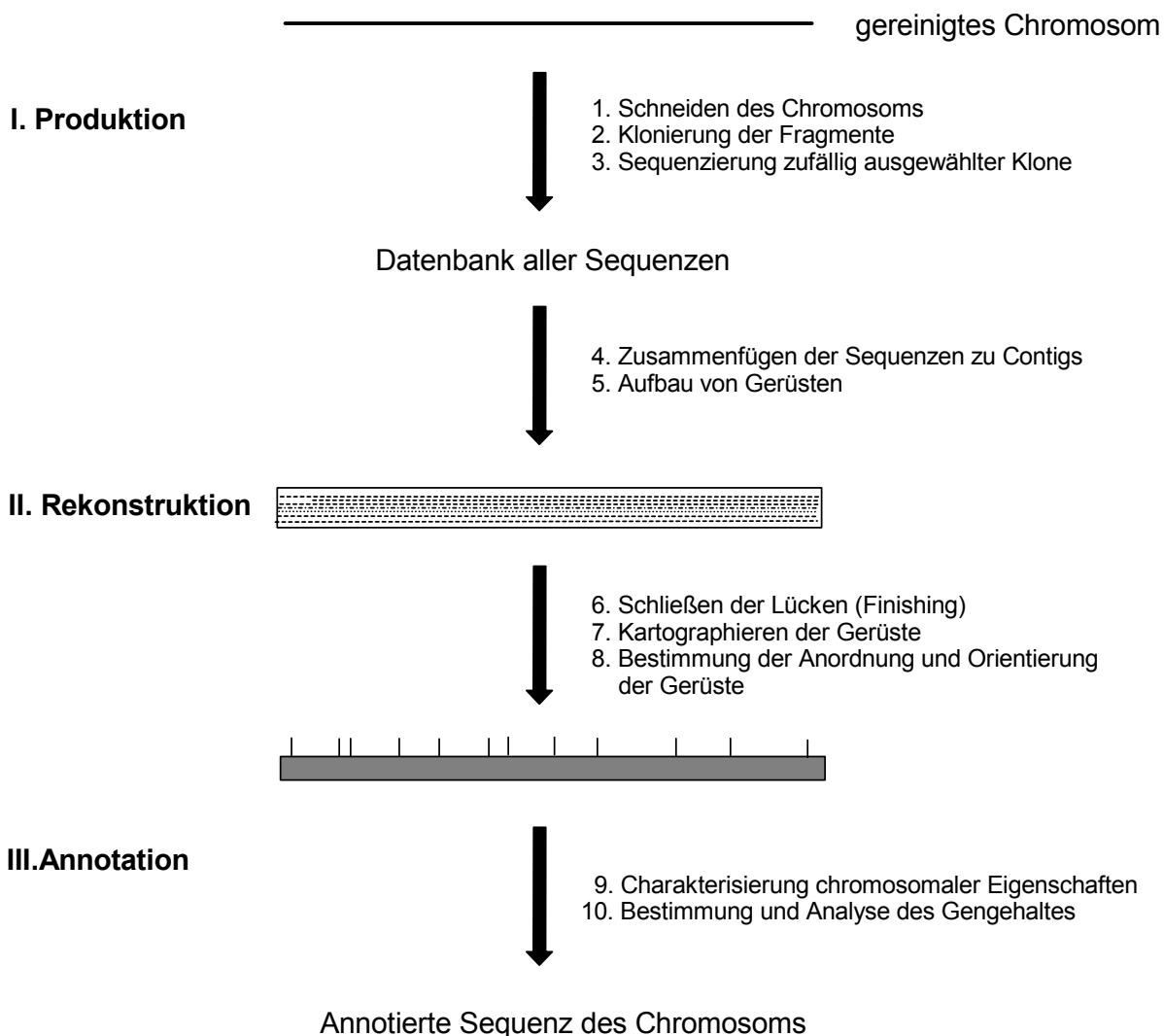


Abb. 1-6: Schematische Darstellung der Chromosomen „Shotgun“ Methode

1.6.2 Das *Dictyostelium* cDNA-Projekt

Das cDNA-Projekt in Japan wird von verschiedenen Universitäten unterstützt und dient dazu, exprimierte Gene in *Dictyostelium* zu identifizieren und zu analysieren. Ziel ist es, Gene in bestimmten Wachstums- und Entwicklungsstadien zu untersuchen, um Informationen über Struktur, Funktion und die Zusammensetzung der exprimierten Gene sowie den zeitlichen Verlauf der Genexpression zu erhalten¹¹⁵. Zu Beginn wurden spezifische cDNAs entsprechend ihrer Größe getrennt und daraus EST-Bibliotheken konstruiert. Die Sequenzanalyse führte zu einem Satz nichtredundanter ESTs, die für die Entdeckung von Genen große Bedeutung hatten¹¹⁶. Danach begann der Aufbau von cDNA-Bibliotheken, deren einzelne Klone meist komplette Gene enthalten. Gleichzeitig wurden cDNA-Klone aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien generiert, die Genfragmente enthalten. Insgesamt wurden mehr als 70.000 cDNA-Klone sequenziert und analysiert. 8361 nichtredundante Sequenzen und 6718 zugehörige Gene wurden bestimmt und stehen in der Datenbank zur Verfügung. Alle cDNAs sind in Clustern organisiert. Zu den Klonen und Clustern gibt es weitere Informationen über die Aminosäuresequenz und Ähnlichkeiten zu anderen Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen. Weitergehende BLAST- oder FastA-Analysen sind über die cDNA-Datenbank möglich.

1.6.3 Das PROTEOME-Projekt

Parallel zu den Genom- und cDNA-Sequenzierungen hat Proteome Systems (Australien) ein PROTEOME-Projekt begonnen¹¹⁷. Proteinidentifizierungen und Charakterisierungen im Mikromaßstab sind die Ziele von PROTEOME-Projekten („the entire PROTEin complement Expressed by a genOME“) ¹¹⁸. Das Proteinmuster eines Organismus kann in Abhängigkeit von Wachstumsbedingungen oder Gewebetypen sehr verschieden sein. Bezogen auf einen einzelligen Organismus können auch unterschiedliche Zellorganellen verschiedene Proteinmuster zeigen¹¹⁹. Auftretende posttranslationale Proteinmodifikationen können allein aufgrund des Genoms nicht vorhergesagt oder bestimmt werden. Die Proteinanalytik kann detaillierte Informationen über entwicklungspezifische Proteinexpression und posttranslationale Modifikationen liefern und möglicherweise auch zum Verständnis von Stoffwechselwegen beitragen. In der SWISS-2DPAGE-Datenbank wurde eine 2D-PAGE-Karte von *Dictyostelium discoideum*^{118,120} veröffentlicht. Auf dieser 2D-PAGE sind bislang

ungefähr 20 Proteinspots markiert, zu denen weitere Informationen in den Proteindatenbanken verfügbar sind. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass größer angelegte Proteomstudien erst kürzlich begonnen wurden. Nur die Verknüpfung aller Ergebnisse aus dem Genom-, dem cDNA- und dem Proteomprojekt kann eine umfassende Informationsbasis bilden, um die Gesamtheit von Veränderungen während der Entwicklung des Organismus zu untersuchen.

1.6.4 Der Umgang mit Sequenzdaten und Perspektiven nach der Entschlüsselung des Genoms

Bis jetzt sind von dem internationalen Konsortium ungefähr 1.000.000 Einzelsequenzen aus chromosomspezifischen Bibliotheken und der Gesamtgenombibliothek generiert worden. Die meisten Gene sind wahrscheinlich zumindest einmal sequenziert worden. Damit ist die Sequenzierungsphase abgeschlossen. Das Genomassembly und damit die Entschlüsselung des Genoms von *Dictyostelium discoideum* wurde im Januar diesen Jahres weitgehend beendet. Vorteilhaft bei der Definition aller *Dictyostelium*-Gene sind die Verteilung der Basenkomposition ebenso wie die relativ kleinen Gene, so dass codierende Regionen gut von nichtcodierenden Bereichen unterschieden werden können. Abbildung 1-7 gibt einen schematischen Überblick über die automatisierte Genomannotation und den Weg zum kompletten Genom¹¹⁷.

Genomsequenzierungen und die Analyse bieten einen Zugang zu funktionellen Genuntersuchungen¹²¹. Ungefähr 7000 cDNA-Klone, die 213 proteincodierende und exprimierte Gene repräsentieren¹²², wurden für Microarrays herangezogen. Mit diesen Tests können Veränderungen der Genexpression im Verlauf der Entwicklung aufgedeckt und möglicherweise neue zelltypspezifische Gene¹²³ identifiziert werden. Auch die Regulation der Genexpression kann mit Microarrays untersucht werden¹²⁴. Insgesamt stehen die Hälfte aller Gene von *Dictyostelium discoideum* für Transkriptionsstudien zur Verfügung. Eine Idee der Mikroarray-Studien war, dass die Funktion eines unbekanntes Gens durch die Regulation der Transkription aufgedeckt werden kann. Dies setzt voraus, dass die Genexpression und Funktion direkt miteinander verknüpft sind. In spezifischen Studien konnte dies für einzelne Gene nachgewiesen werden. Es bleibt aber fraglich, ob die Idee auch für Studien des gesamten Genoms anwendbar ist¹⁰⁷.

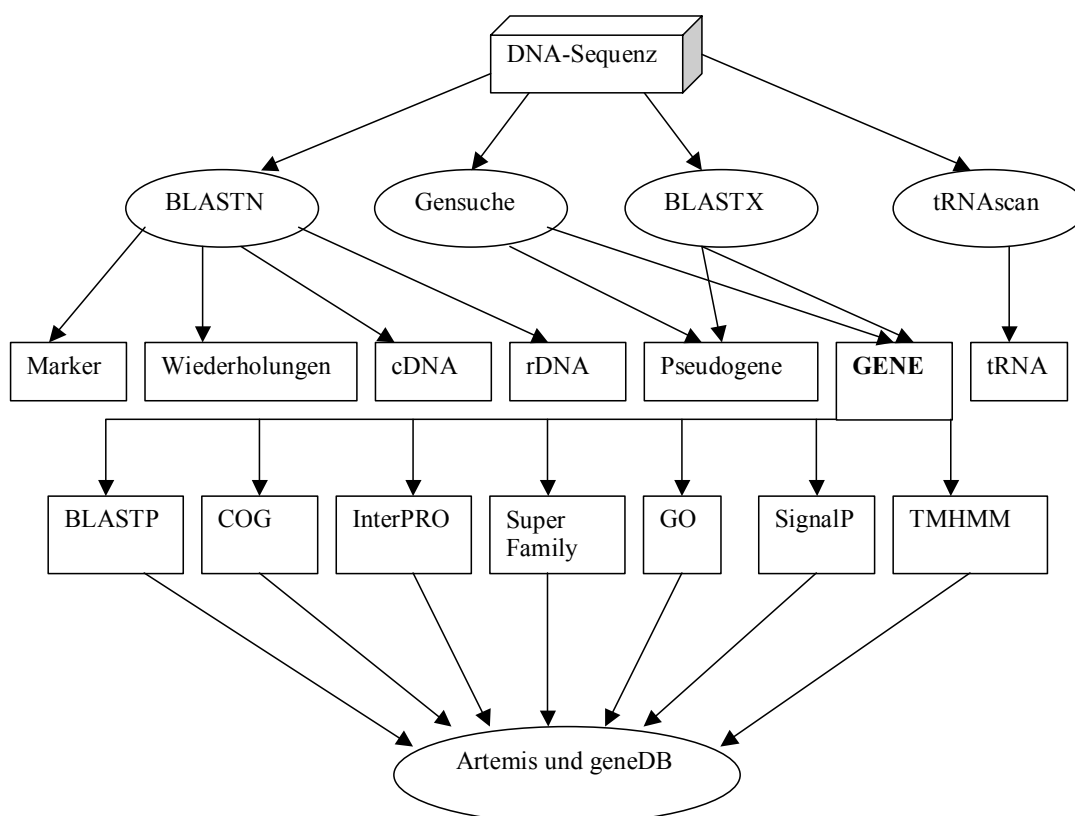


Abb. 1-7: Schematische Darstellung der automatischen Genomannotation

Die Graphik wurde in modifizierter Form von Dr. L. Eichinger übernommen.

Die DNA-Sequenzen aus dem Genomassembly werden mit Hilfe der Bioinformatik analysiert. BLASTN-Suchen werden gegen Marker, repetitive Elemente, cDNAs und rDNA durchgeführt. Die Genvorhersage erfolgt über geneID, HMMgene und genefinder. BLASTX-Suchen laufen gegen die Swiss-Prot-Datenbank. tRNAs werden über tRNAscan-SE gefunden. Vorhergesagte Gene werden durch BLASTP-Suchen gegen SWALL und Datenbanken von komplett sequenzierten Eukaryonten annotiert und gegen COG, InterPro und SuperFamily gescannt. Die Klassifizierung erfolgt mit Hilfe der Genontologie-Terminologie. Zusätzliche werden Vorhersagen für Signalpeptide (SignalP) und Transmembrandomänen (TMHMM) gemacht. Die Ergebnisse der Analysen werden manuell in Artemis überprüft und sind dann über geneDB öffentlich verfügbar. Alle Programme zur Analyse sind im Internet zugänglich.

Die komplette Genomsequenz von *Dictyostelium discoideum* kann Basis für biologische und biomedizinische Studien, für physiologische und phylogenetische Vergleiche mit anderen Organismen auf der Grundlage ihrer Genome wie auch für funktionelle Analysen des Transkriptoms und Proteoms sein. Auch für Untersuchungen konservierter eukaryontischer Funktionen, die z.B. in Hefen nicht experimentell zugänglich sind, könnte die Genomsequenz von Bedeutung sein und in dieser Hinsicht die Stellung von *Dictyostelium* als Modellorganismus zusätzlich rechtfertigen.

Das Genom eines Organismus trägt Hinweise darauf, welche Prozesse zu Verzweigungen im Evolutionsstammbaum geführt haben können. Dazu gehören unter anderem Sequenzveränderungen, Genverluste, Genverdopplungen, horizontaler Gentransfer und symbiontische Prozesse. Somit kann das bekannte Genom dazu beitragen, Verzweigungen des Evolutionsstammbaums besser zu verstehen und *Dictyostelium* endgültig phylogenetisch einzuordnen.

Die gesammelten Informationen aus DNA-Sequenzierungen und Proteinanalysen sind zunächst kaum nutzbar. Erst die Bioinformatik, die computerunterstützt alle Informationen speichert und verwaltet, ermöglicht die Verknüpfung dieser Informationen miteinander und erleichtert gleichzeitig weitere DNA- und Proteinanalysen. Organismusbezogene Bioinformatik beinhaltet daneben auch Stoffwechselwege, Proteinfunktionen, enzymatische Parameter, Proteininteraktionen und Informationen über Proteinkaskaden, die aus dem phänotypischen Vergleich von Wildtyp und Mutanten eines spezifischen Organismus abgeleitet werden. Die Fülle solcher Daten erfordert zwingend eine organismusbezogene Datenbank. Für *Dictyostelium discoideum* steht seit einiger Zeit die integrierte DictyBase-Datenbank zur Verfügung, in der genomische Daten manuell aufbereitet und mit weiteren Informationen verknüpft werden. Da zur Zeit täglich neue Sequenzdaten sowohl in die cDNA-Datenbank wie auch in die Datenbanken der Sequenzierungszentren eingespeist und bestehende Datensätze fortlaufend aktualisiert werden, ist es recht schwierig, einen Überblick über die Genomsequenz zu behalten. GenBank, eine organismusübergreifende genomische Datenbank, ist in Bezug auf *Dictyostelium* keine Quelle für Sequenzdaten oder Analysen. Dennoch sind alle vorhandenen Daten, zum Teil zwar noch als Rohdaten, über verschiedene Internetseiten (Tab. 1-2) abrufbar. Alle Sequenzierungszentren bieten entsprechende online-Analysen der Daten an. Zusätzlich ist eine Klassifizierung der Daten über das San Diego Supercomputer Zentrum möglich. Das Dicty Workbench Portal stellt BLAST-, RPS-BLAST- und PFAM-Analysendaten zur Verfügung. Mehr als 6000 Proteinsequenzen wurden bisher annotiert und wahrscheinlich sind ungefähr 98% aller *Dictyostelium*-Gene zumindest teilweise in den verschiedenen Datenbanken zu finden¹²⁵. Zur Zeit wird das DictyDB-Programm als Teil des Developmental Gene Program (DGP) weiterentwickelt¹²⁶, die aktuelle Version ist 2.5. Die Datenbank soll die Verknüpfung aller *Dictyostelium*-spezifischen Informationen ermöglichen und so ein umfassenderes Bild des Organismus liefern.

Institut/Datenbank	Internetseite (URL)
Universität Köln	http://www.uni-koeln.de/dictyostelium
Genome Sequencing Center Jena	http://genome.imb-jena.de/dictyostelium/
Baylor College of Medicine	http://dictygenome.bcm.tmc.edu/
Sanger Centre	http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_discoideum
San Diego Supercomputer Center	http://dicty.sdsc.edu/
DictyDB	http://www_biology.ucsd.edu/others/dsmith/dictydb.html
DictyBase	http://dictybase.org
Swiss-2D-PAGE	http://www.expasy.org/ch2d/publi/dicty.html
cDNA-Projekt	http://www.csm.biol.tsukuba.ac.jp/cDNAproject.html
Genontologie Terminologie	http://www.genontology.org/
InterPro	http://www.ebi.ac.uk/interpro
Medical Research Council	http://www.mrc-imb.cam.ac.uk:80/happy-homepage.html

Tab. 1-2: Internetadressen von Instituten und Datenbanken

Die angeführten Internetadressen ermöglichen einen Zugang zu Sequenzdaten und Programmen zur Analyse dieser Daten.

1.7 Ziel dieser Arbeit

Diese Arbeit soll dazu beitragen, mögliche physiologische Funktionen von „energiereichen“ Diphosphoinositolphosphaten in *Dictyostelium discoideum* aufzudecken. Diesen Verbindungen wird eine Beteiligung an fundamentalen Prozessen innerhalb der Zelle zugeordnet (s. auch Kap. 1.5.3), die auch für *D. discoideum* von Bedeutung sein könnten. Eine neue Studie⁷² belegt die Verbindung zwischen chemotaktischer Antwort auf die cAMP-Sekretion und den Diphosphoinositolphosphaten in diesem Organismus. Hier ist allerdings nicht eindeutig geklärt, ob dieser Effekt auf InsP₇ oder InsP₈ zurückzuführen ist, weil die Synthese beider Metabolite durch die Gendeletion einer InsP₆-Kinase unterbunden wurde.

Eine elegante, aber gleichzeitig zeitaufwändige Möglichkeit, Funktionen der Diphosphoinositolphosphate in *Dictyostelium* aufzuklären, beginnt mit der Sequenzierung der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase. Nach der Bestimmung der Primärstruktur dieses Enzyms durch Massenspektrometrie können Recherchen in Protein-, EST- sowie Genomdatenbanken helfen, das entsprechende codierende Gen zu finden und Homologien zu ähnlichen Enzymen in

anderen Organismen aufzuzeigen. Sobald das Gen identifiziert ist, führen möglicherweise Genmanipulationen und nachfolgend phänotypische Untersuchungen der generierten Mutanten zur Aufklärung physiologischer Funktionen dieser außergewöhnlichen Verbindungen. Vorversuche zur Bestimmung der Primärstruktur wurden bereits im Rahmen einer Diplomarbeit¹²⁷ durchgeführt.

Ein weiterer Ansatz sind Analysen von spezifischen Transphosphorylierungsreaktionen durch Diphosphoinositolphosphate. Die mögliche Funktion dieser Metabolite als primärer Phosphatgruppendonator für Proteine und die hochaffine Bindung von InsP_7 und InsP_8 an spezifische Proteine bzw. Enzyme wurden bereits beschrieben. Zellextrakte von *Dictyostelium discoideum* sollen mit isopenmarkierten Diphosphoinositolphosphaten inkubiert und autoradiographisch untersucht werden. Fragen der Identität der Proteine und der Spezifität der Phosphorylierung sind zu klären, wenn radioaktiv markierte Proteine nachgewiesen werden. Ebenso muss die Frage beantwortet werden, ob die Diphosphoinositolphosphate selbst spezifisch binden oder als Phosphatgruppendonator fungieren.

Der Stoffwechsel der Diphosphoinositolphosphate in *Dictyostelium discoideum* ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Vor allem die Verbindung zwischen diesem und dem Stoffwechsel der Inositolphosphate fehlt noch. Genetische Studien⁷² weisen auf die Existenz einer InsP_6 -Kinase hin, die dieses fehlende Bindeglied darstellen könnte. Im Rahmen dieser Arbeit soll nach dieser und weiteren am Stoffwechsel der Diphosphoinositolphosphate beteiligten Enzymaktivitäten gesucht werden. Im Vordergrund stehen hier Inkubationen von Zellextrakten mit den entsprechenden verfügbaren Substraten. Des Weiteren sollen Proteine identifiziert werden, die während der Reinigung der InsP_7 -Kinase an das verwendete InsP_6 -Affinitätsmaterial binden.

Ein weiterer interessanter Aspekt der Diphosphoinositolphosphate, deren Strukturen hinsichtlich der Anordnung der Pyrophosphatgruppen bereits bestimmt wurden, sind die Konformationen und Energieinhalte der natürlich vorkommenden Metabolite. Mit Hilfe des molekularen Modellings können Energien durch Kraftfeldmethoden theoretisch berechnet werden und damit optimale Strukturgeometrien von Molekülen ermittelt werden. Die Ergebnisse können dazu beitragen, die unterschiedlichen Affinitäten und Aktivitäten der InsP_7 -Kinase gegenüber ihren Substraten zu erklären.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur und Medien

2.1.1 Kultivierung und Lagerung von Dictyosteliden

Für die Experimente wurden der axenisch wachsende Stamm *Dictyostelium discoideum* AX2 (ATCC: 24397) und *Polysphondylium pallidum* (ATCC: 18421) verwendet.

D. discoideum und *P. pallidum* wurden auf Bakterienrasen (*Klebsiella aerogenes* oder *Escherichia coli* auf Standardmediumagar, Tab. 2-1) oder in Suspensionskultur mit Bakterien ($OD_{460} = 10$ in 34 mM Phosphatpuffer pH 6,5) aus Sporen angezogen, die bei -20°C in steriler Glycerinlösung (20% in 34 mM Phosphatpuffer pH 6,5) gelagert wurden. Der Stamm *D. discoideum* AX2 wächst auch in einem bakterienfreien Nährmedium (axenisches Medium, Tab. 2-1). Die einfache Handhabung dieser Flüssigkulturen erlaubt es, große Zellmengen für Enzympräparationen oder die präparative Isolierung von Inositolphosphaten heranzuziehen.

Die Kultivierung der Dictyosteliden erfolgte generell bei $22,5^{\circ}\text{C}$ in einem Brutschrank (Binder WTC). Flüssigkulturen mit Zelldichten zwischen $1 \cdot 10^5$ und $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml wurden bei 120 Upm auf einem Rundschüttler (Braun HT) inkubiert.

Sporen wurden in 49 ml axenisches Medium überführt und über Nacht in einem temperierten Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellkulturen bei 120 Upm geschüttelt. Nach ca. 24 Stunden waren die Zellen germiniert. Bei einer Verdopplungszeit von 8-10 Stunden erreichte die Suspension nach 3-4 Tagen eine Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml. Die Germination von *P. pallidum* erfolgte in Bakteriensuspension (*K. aerogenes* $OD_{460} = 10$ oder *E. coli* $OD_{600} = 10$, in 34 mM Phosphatpuffer pH 6,5, 80 mM KCl). Unter diesen Bedingungen bildet *P. pallidum* in Flüssigkultur bei hoher Zelldichte Mikrozysten aus. Die Verdopplungszeit in Bakteriensuspension betrug 3-6 Stunden.

Kulturen auf Bakterienrasen bilden nach 3-6 Tagen erneut Sporen aus. *P. pallidum* bildet auf Agarplatten keine Sporen sondern Mikrozysten aus, die mehrere Wochen bei 4°C auf den Platten gelagert werden können. Große Zellmengen, die für die Isolierung von 3,5-bis-PP-InsP₄ notwendig waren, wurden auf Agarplatten in 40 x 40 cm sterilen Edelstahlwannen angezogen. Die Mikrozysten können ebenso wie Sporen geerntet und bei -20°C gelagert werden.

2.1.2 Kultivierung von *Klebsiella aerogenes* und *Escherichia coli*

Als Nahrungsquelle diente *Klebsiella aerogenes* für *D. discoideum*, während sich *P. pallidum* auch von *E. coli* ernähren kann. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in Flüssigkulturen. Dazu wurden mit der Impföse bis zu 1 l Standardmedium (Tab. 2-1) angeimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Rundschüttler (120 Upm) geschüttelt. Kulturen auf Nährböden (Standard- oder Minimalmediumagar, Tab. 2-1) wurden ebenfalls bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.1.3 Kulturgefäße und Zellernte

Sterilisierte Erlenmeyerkolben (100-1000 ml) und Fermbachkolben (1,2 l aus Glas oder 2,4 l aus Kunststoff) dienten als Kulturgefäße. Die maximale Füllung betrug bei den Erlenmeyerkolben 10%, bei Fermbachkolben 30% ihres Nennvolumens, um eine optimale Belüftung der Zellsuspensionen zu gewährleisten. Bakterien wurden in sterilen Schikanekolben entsprechender Größe kultiviert.

Die Ernte der Dictyosteliden erfolgte normalerweise bei einer Zelldichte von maximal $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml bei 4°C durch Zentrifugation, wobei in Abhängigkeit vom Probevolumen eine Heraeus Variofuge K (2000 Upm, 1000 g) oder eine Beckmann J2-21 Zentrifuge (Rotor JA10, 3500 Upm, 2150 g) eingesetzt wurden. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem Puffer (17 mM Phosphatpuffer pH 6,5 oder 20 mM HEPES-Puffer pH 6,8) gewaschen. Grundsätzlich erfolgte die Aufarbeitung der Zellen unter Eiskühlung.

Sporen und Mikrozysten wurden in einer Heraeus Megafuge 1.0R (5000 Upm, 4332 g) zentrifugiert. Bakterien wurden in der Beckmann J2-21 Zentrifuge (Rotor JA10, 10000 Upm, 17700 g) geerntet und zweimal in eiskaltem Phosphatpuffer (17 mM, pH 6,5) gewaschen.

2.1.4 Medien und Nährböden

Medium oder Nährboden	Zusammensetzung	
Axenisches Medium ¹²⁸ für <i>Dictyostelium</i> <i>discoideum</i>	Fleischpepton (Gibco)	14,3 g/l
	Hefeextrakt (Oxoid)	7,15 g/l
	Glucose-Monohydrat (Merck)	15,4 g/l
	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O (Merck)	0,64 g/l
	KH ₂ PO ₄ (Merck)	0,48 g/l
	Dihydrostreptomycin · 3/2 H ₂ O (Sigma)	0,25 g/l
Standardmedium für Bakterien ¹²⁹	Fleischpepton (Gibco)	5,0 g/l
	Hefeextrakt (Oxoid)	0,5 g/l
	Glucose-Monohydrat (Merck)	5,0 g/l
	Magnesiumsulfat-Heptahydrat (Merck)	0,5 g/l
	K ₂ HPO ₄ · 3 H ₂ O (Merck)	0,9 g/l
	KH ₂ PO ₄ (Merck)	2,25 g/l
Standardmediumagar ¹²⁹ zur Anzucht von Sporen	Fleischpepton (Gibco)	10,0 g/l
	Hefeextrakt (Oxoid)	1,0 g/l
	Glucose-Monohydrat (Merck)	5,0 g/l
	Magnesiumsulfat-Heptahydrat (Merck)	1,0 g/l
	K ₂ HPO ₄ · 3 H ₂ O (Merck)	1,2 g/l
	KH ₂ PO ₄ (Merck)	2,2 g/l
	Agar (Oxoid)	10,0 g/l
Minimalmediumagar ¹²⁹ zur Anzucht von Mikrozysten auf Bakterienrasen	K ₂ HPO ₄ (Merck)	4,4 g/l
	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O (Merck)	5,0 g/l
	Trinatriumcitrat (Merck)	0,5 g/l
	Magnesiumsulfat-Heptahydrat (Merck)	0,1 g/l
	(NH ₄) ₂ SO ₄ (Merck)	1,0 g/l
	KCl (Merck)	0,5 g/l
	MgCl ₂ (Merck)	0,25 g/l
	Agar (Oxoid)	15,0 g/l
	Nach dem Autoklavieren werden 10 ml/l 20% Glucoselösung (sterilfiltriert) zugegeben.	

Tab. 2-1: Medien und Nährböden zur Kultivierung von Dictyosteliden

Medien wurden bei 120°C 15 min in 1l-Glasflaschen autoklaviert. Nährbodenmedien wurden ebenfalls bei 120°C 15 min in 1l-Glasflaschen autoklaviert, in Kunststoffpetrischalen (Greiner) oder Edelstahlwannen gegossen und bei 4°C aufbewahrt.

2.2 Bestimmung der Zelldichte von Dictyosteliden und Bakterien

Die Bestimmung der Zelldichte und die Kontrolle des Zellvolumens von Dictyosteliden erfolgte mit Hilfe eines Zellzählgerätes (Coulter Z2, Beckmann Coulter). Die Zelldichte von Bakterienkulturen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 460 oder 600 nm mit einem Photometer (Lambda 40 UV/ VIS-Spektrometer Perkin Elmer) und/ oder mit der Neubauerzählkammer bestimmt.

2.3 Präparative Isolierung und Analyse von Inositolphosphaten aus Dictyosteliden

2.3.1 Isolierung von Inositolphosphaten

Hochphosphorylierte Inositolphosphate wurden aus Zellmaterial analog der von Mayr beschriebenen Methode¹³⁰ isoliert. Gefrorenes Zellmaterial (ca. 50 - 200 g Feuchtgewicht pro Isolierung aus *Dictyostelium*) wurde mit 2 Teilen 2 M Perchlorsäure (Merck) pro g Feuchtgewicht und 1/10 (v/v) 100 mM EDTA (Sigma, pH 5) im Mixer bei Raumtemperatur aufgeschlossen. Das denaturierte Material wurde durch Zentrifugation (Beckmann J2-21, JA10, 10000 Upm, 17770 g, 10 min) abgetrennt, der Überstand abgenommen und das Pellet zweimal mit bidestilliertem Wasser abgespült. Zum Aufschluss der Mikrozysten von *P. pallidum* wurde das Zentrifugationspellet nach der ersten Perchlorsäurebehandlung mit 2 Teilen 6 M Perchlorsäure und EDTA nochmals aufgeschlossen. Nach der Vereinigung der Überstände wurden diese im Eisbad mit 4 M KOH (Merck) auf pH 5-6 eingestellt. Nach 30 min wurde das kristallisierte Kaliumperchlorat durch Zentrifugation entfernt. Wieder wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit bidestilliertem Wasser abgewaschen. Die vereinigten Überstände wurden mit fester Aktivkohle (Sigma, 2g/ 100 ml Extrakt) 10 min unter Eiskühlung inkubiert. Die Entfernung der Aktivkohle erfolgte zunächst durch Papierfiltration und anschließende Filtration mittels Membranfilter (Millipore S.A., Type HA 0,45µm).

Der Extrakt wurde auf eine Ionenleitfähigkeit von 10 mS cm⁻¹ verdünnt und auf eine Q-Sepharose-Säule (fast flow; Pharmacia, Länge 20 cm; ID 2,5 cm; Volumen ca. 100 ml; 8°C) mit 3 ml/min (peristaltische Pumpe Gilson miniplus 2) aufgetragen. Die Säule wurde mit dem doppelten Säulenvolumen eiskaltem, bidestilliertem Wasser gewaschen. Die Elution der

Inositolphosphate erfolgte mit dem doppelten Säulenvolumen 100 mM HCl / 600 mM LiCl (Merck, eiskalt). Das Eluat wurde in Fraktionen á 10 ml gesammelt. Fraktionen, die Inositolphosphate enthalten, wurden durch das unter 2.3.3 beschriebene Testverfahren auf Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen, Greiner Labortechnik) identifiziert.

Nach der Vereinigung von jeweils 3 Eluatfraktionen, die Inositolphosphate enthielten, wurden diese unter Eiskühlung mit 10 M LiOH (Merck) neutralisiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und über Nacht lyophilisiert (Christ Gefriertrocknungsanlage Alpha). Die festen Rückstände wurden zur Entfernung des Lithiumchlorids mit wasserfreiem Ethanol (Sigma, ca. 10-20 ml pro g LiCl) extrahiert und die unlöslichen Inositolphosphate abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0R, 3500 Upm, 10 min, 4°C). Die Sedimente wurden in bidestilliertem Wasser aufgenommen, auf eine Ionenleitfähigkeit von 5 mS cm⁻¹ mit bidestilliertem Wasser verdünnt und über den Kanal A der HPLC-Anlage auf eine Mono-Q-Säule (Pharmacia HR 10/10) mit einer Flussrate von 2 ml/min aufgetragen. Die Säule wurde dann mit 20 ml Wasser gespült. Die Elution der Inositolphosphate erfolgte in 60 Minuten bei einer Flussgeschwindigkeit von 1,5 ml/min mit einem Gradienten von 0 mM HCl/ 0 mM LiCl bis 100 mM HCl/ 600 mM LiCl ohne Nachsäulenderivatisierung. Eluatfraktionen á 1,5 ml wurden auf Inositolphosphate getestet. Fraktionen, die Inositolphosphate enthielten, wurden mit 10 M LiOH (Merck) unter Eiskühlung neutralisiert und gefriergetrocknet. Die Rückstände wurden mehrfach mit wasserfreiem Ethanol (Aldrich) ausgeschüttelt, um festes Lithiumchlorid zu entfernen. Nach Aufnahme der Sedimente in 500 µl bidestilliertem Wasser und erneuter Gefriertrocknung erhielt man die gereinigten Inositolphosphate als Feststoffe.

2.3.2 Lagerung und Handhabung von Inositolphosphaten

Die gereinigten hochphosphorylierten Inositolphosphate wurden als Feststoff oder in wässriger Lösung bei -86°C aufbewahrt. Die Lösungen sind stabil, wenn sie im aufgetauten Zustand auf Eis gehalten werden, und können so mehrfach aufgetaut und wieder eingefroren werden.

2.3.3 Qualitative Inositolphosphatbestimmung

Die Eluate der Säulenchromatographie wurden mit 4-(2-Pyridylazo)-resorcinol (PAR) analysiert. Dazu wurden 200 µl PAR-Reagenz (Tab. 2-2) mit 1 - 10 µl Eluat versetzt. Der

Farbumschlag des orangerot gefärbten Reagenzes nach gelb detektierte die Anwesenheit von Inositolphosphaten.

Volumentteile	Lösung
667	bidestilliertes Wasser
316	2 M Tris/HCl pH 8,5 (Roth)
10	1 mM $YCl_3 \cdot 6 H_2O$ (Aldrich)
7	10 mM PAR (Fluka) in Methanol (Merck)

Tab. 2-2: PAR-Reagenz

2.3.4 Quantitative Bestimmung des Phosphatgehaltes

Der Phosphatgehalt der gereinigten Inositolphosphate wurde nach der Methode von Lanzetta¹³¹ quantifiziert. Dazu wurden 50 μ l einer 0,2 - 1,5 mM Inositolphosphatlösung mit 20 μ l 10 M Schwefelsäure bei 170°C über Nacht vollständig hydrolysiert. 10 μ l des Hydrolysats wurden mit 100 μ l Phosphatreagenz (Tab. 2-3) in einer Mikrotiterplatte kurz vermischt und die Reaktion nach 1 min mit 10 μ l 25% Trinatriumcitratlösung (Merck) gestoppt. Nach erneutem Schütteln und 20minütiger Inkubation wurde die Extinktion der Lösung bei einer Wellenlänge von 595 nm mit einem Photometer (BioRad Microplate-Reader, Modell 450) gemessen. Die Eichung des Phosphattestes erfolgte mit Standardlösungen von getrocknetem Kaliumdihydrogenphosphat (Merck) in 1 M Schwefelsäure im Bereich von 0-200 μ M.

Volumentteile	Lösung
735	0,045% (w/v) Malachitgrün-Hydrochlorid (Sigma)
245	4,2% (w/v) Ammoniummolybdat (Merck) in 4 M HCl (24 h rühren)
20	2% (v/v) Tergitol NP-10 (Sigma)

Tab. 2-3: Phosphatreagenz

Das frisch hergestellte Phosphatreagenz wurde filtriert und bei 4°C dunkel aufbewahrt.

2.4 HPLC-MDD-Analytik von Inositolphosphaten

Mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) lassen sich Inositolphosphate säulenchromatographisch trennen und durch Nachsäulenderivatisierung

detektieren¹³². Ein direkter photometrischer Nachweis von Inositolphosphaten ist nicht möglich, da sie keine chromophoren Gruppen besitzen, die im UV- oder sichtbaren Bereich absorbieren. Nach der chromatographischen Trennung der Inositolphosphate werden diese mit einem Derivatisierungsreagenz vermischt. Das Reagenz enthält den gelben Farbstoff 4-(2-Pyridylazo)-resorcinol, der im alkalischen Medium mit Yttrium(III)-Ionen einen orangerot gefärbten Komplex bildet. Da Inositolphosphate stark komplexierend wirken, konkurrieren sie mit dem Farbstoff um die Metallionen. Die Komplexbildung bewirkt eine Farbverschiebung von orange-rot nach gelb, die als Extinktionsänderung bei 546 nm verfolgt werden kann. Dieses Verfahren der Nachsäulenderivatisierung wird als Metall-Indikator-Detektion (MDD) bezeichnet und ermöglicht den photometrischen Nachweis der Inositolphosphate.

2.4.1 Aufbau der HPLC-MDD-Anlage

Entsprechend vorbereitete Proben von Inositolphosphatgemischen wurden über einen Probengeber mit einer 1 ml Probenschleife in die HPLC-Anlage (Abb. 2-1) injiziert und auf die angeschlossene Anionenaustauschersäule aufgetragen. Die vom Säulenmaterial retardierten Inositolphosphate wurden mit einem pH- und Ionenstärkegradienten (Flussrate 1,5 ml/min) eluiert. Der Gradient wurde aus den Lösungen A und B mit Hilfe eines Gradientenmischers erzeugt. Das Eluat passierte zunächst ein Photometer (Wellenlänge 260 nm) zum Nachweis von UV-absorbierenden Substanzen wie z.B. Nukleotiden. Inositolphosphate absorbieren bei dieser Wellenlänge nicht. Zum Nachweis der Inositolphosphate wurde das Eluat in einer Mischschleife mit der Farbstofflösung (Flussrate 0,75 ml/min) gemischt. Die Extinktion des Gemisches wurde mit einem zweiten Photometer (Wellenlänge 546 nm) gemessen. Eine Unterscheidung zwischen Inositolphosphaten und Nukleotiden, die ebenfalls eine Extinktionsänderung des PAR-Indikators bewirken, wurde durch den Vergleich der Chromatogramme beider Photometer ermöglicht. Die Chromatogramme wurden mit dem Programm EZChrom Chromatography Data System dargestellt und ausgewertet. Die Steuerung der Pumpen, des Gradientenmischers und der Photometer erfolgte über einen Controller.

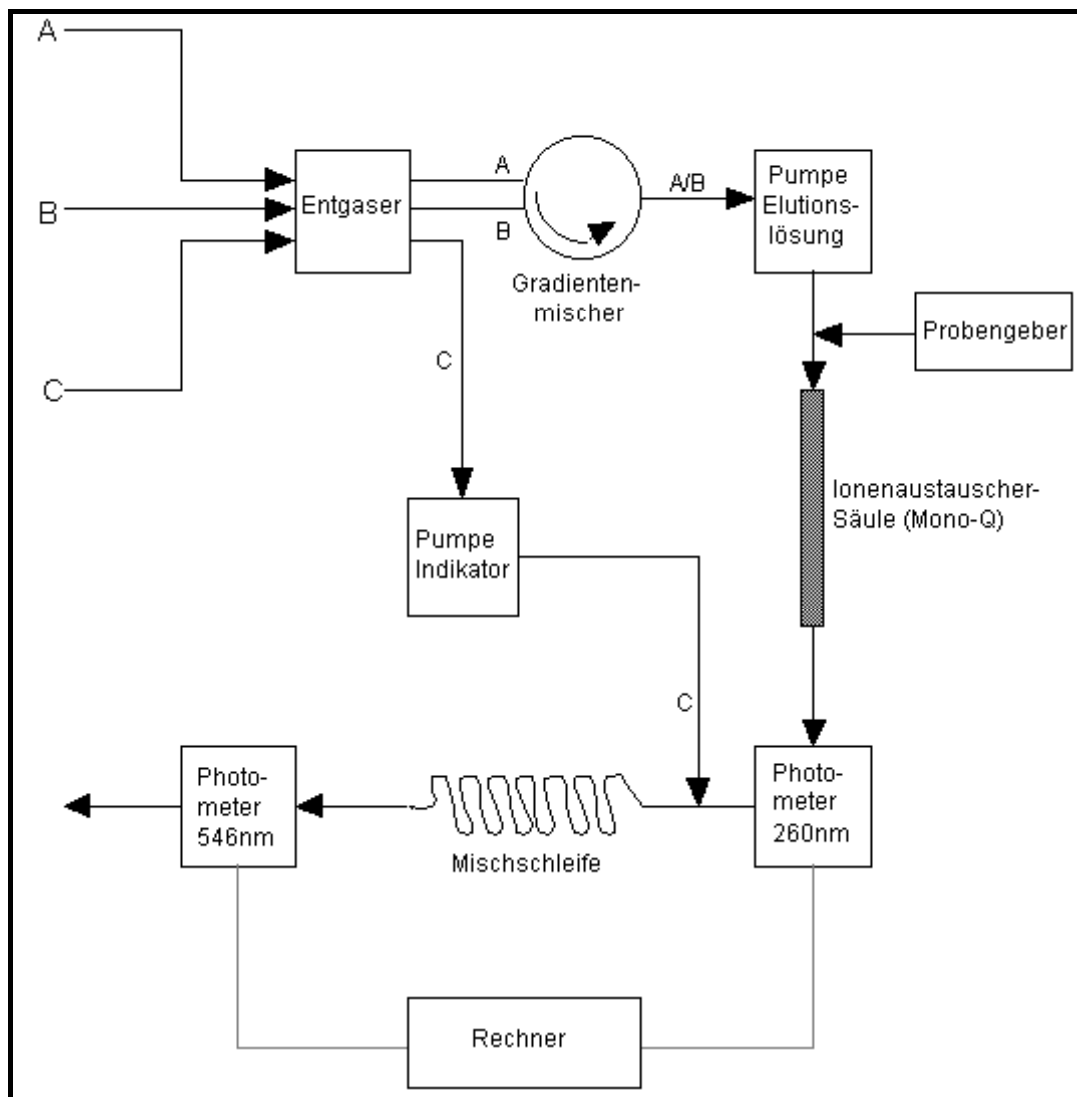


Abb. 2-1: Schematischer Aufbau der HPLC-MDD-Anlage

Gerät	Hersteller / Modell
Controller	Pharmacia LKB LC 2252
Entgaser	Uniflows Degasys DG 1310
Gradientenmischer	Pharmacia LKB Low-Pressure-Mixer
Pumpe	Pharmacia LKB HPLC-Pump 2248
Photometer	Pharmacia LKB VWM 2141
Probengeber	Autosampler Marathon
Säulen	Pharmacia Mono-Q HR 10/10 (Länge 10 cm, Durchmesser 1 cm, Volumen 8 ml)
	Pharmacia Resource-Q HR 5/5 (Länge 5 cm, Durchmesser 5 mm, Volumen 1 ml)

Tab. 2-4: Geräteliste HPLC

2.4.2 Säulen, Elutionssysteme und Gradienten zur Trennung von Inositolphosphaten

Generell eignen sich starke Anionenaustauscher mit einer quaternären Ammoniumfunktion, die über einen hydrophilen Spacer an die Matrix gebunden ist, gut zur chromatographischen Trennung von Inositolphosphaten. Die Trennleistung der Anionenaustauschersäulen wird im wesentlichen durch die Matrix beeinflusst, an der die austauschende Gruppe hängt. Die Matrix der Resource-Q-Säule (Pharmacia) besteht aus monodispersen Polystyrolpartikeln mit einem Durchmesser von 15 μm . Aufgrund der kleinen Porengröße von 20-1000 nm sollten die Proben keine Partikel enthalten, da sonst die Poren leicht verstopft werden können. Das Material weist eine gute Trennleistung auf und lässt sich für die analytische Trennung sehr gut verwenden. Eine bedeutend höhere Trennleistung kann mit der Mono-Q-Säule (Pharmacia) erreicht werden, deren Matrix aus 10 μm Polystyrolpartikeln besteht und entsprechend kleinere Porengrößen aufweist. Auch hier ist es wichtig, dass die Proben keine Partikel enthalten. Diese würden von dem Säulenmaterial zurückgehalten, was zu einer deutlichen Erhöhung des Gegendrucks führt und gleichzeitig die Trennleistung erheblich beeinträchtigt. Für die präparative Trennung der Inositolphosphate wurde der Mono-Q-Säule HR 10/10 eine Resource-Q-Säule HR 5/5 vorgeschaltet. Das Elutionssystem (Tab. 2-5) in Verbindung mit einem flachen Gradienten gewährleistete eine hohe Auflösung.

Lösung	Zusammensetzung
A	bidestilliertes Wasser
B	100 mM HCl / 600 mM LiCl
C (Farbstofflösung)	2 M Tris/HCl pH 8,5 (Roth) 200 μM PAR (Fluka) 30 μM YCl ₃ (Aldrich) 10% (v/v) Methanol (Roth) in bidestilliertem Wasser

Tab. 2-5: Elutionslösungen für die präparative Trennung von Inositolphosphaten

Die Elution der hochphosphorylierten Inositolphosphate erfolgte in 120 min mit einem Gradienten von 0 – 100% B.

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde eine schnelle Analysenmethode mit steilem Gradienten und dem HCl-Elutionssystem (Tab. 2-6) auf der Resource-Q-Säule HR 5/5 eingesetzt. Diese Methode bedingt eine geringere Auflösung, die dennoch eine genaue Quantifizierung erlaubt.

Lösung	Zusammensetzung
A	2 mM HCl (Roth)
B	500 mM HCl (Roth)
C (Farbstofflösung)	2 M Tris/HCl pH 8,5 (Roth) 200 μ M PAR (Fluka) 30 μ M YCl ₃ (Aldrich) 10% (v/v) Methanol (Roth) in bidestilliertem Wasser

Tab. 2-6: Elutionslösungen für die Analyse von Inositolphosphatgemischen

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurden die hochphosphorylierten Inositolphosphate in 20 min mit einem Gradienten von 40–100% B eluiert. Die Analyse von ATP-Inositolphosphat-Gemischen erfolgte in 30 min mit einem Gradienten von 0–100% B.

Auch die Analyse von ATP-Inositolphosphat-Gemische bei Synthese von radioaktiv-markiertem [β -³²P-5]-PP-InsP₅ und [β -³²P-5],6-bis-PP-InsP₄ erfolgte mit einer schnellen Methode. Hier wurde ein steilerer HCl-Gradient auf der Resource-Q-Säule HR 5/5 verwendet, um die Nukleotide nachweisen zu können.

2.4.3 Kalibrierung der HPLC-Anlage

Der Phosphatgehalt und damit die Konzentration isolierter Inositolphosphate (InsP₆, 6-PP-InsP₅ und 5,6-bis-PP-InsP₄) wurden nach dem unter 2.3.4 beschriebenen Verfahren bestimmt. Diese Inositolphosphate wurden als Standards verwendet und zu Beginn jeden Messzyklus dreifach gemessen.

2.4.4 Regenerierung der HPLC-Säulen

Die HPLC-Säulen wurden nach zehn (Mono-Q HR 10/10) bzw. zwanzig Messungen (Resource-Q HR 5/5) regeneriert. Bei gleichzeitiger Elution mit bidestilliertem Wasser wurden jeweils viermal 1 ml 2 M NaOH (Merck), 1 ml 2 M NaCl (Merck) und 1 ml 1 M HCl (Roth) über den Probengeber injiziert. Alle zwei bis drei Monate wurden die Säulen vor dem oben beschriebenen Regenerierungsverfahren routinemäßig über Nacht mit einer Pepsin-Lösung (1 mg/ml Pepsin (Sigma) in 100 mM Essigsäure (Roth) mit 500 mM NaCl) inkubiert. Zur Entfernung der Enzymlösung wurden die Säulen mit bidestilliertem Wasser gespült.

2.5 Proteinanalytik

2.5.1 Proteinbestimmung

Die Proteingehalte der Proben wurden mit kommerziell erhältlichen Fertigkits auf der Basis von Farbreaktionen funktioneller Gruppen der Proteine mit farbstoffbildenden Reagenzien quantifiziert. Die Intensität der gebildeten Farbstoffe korreliert direkt mit der Konzentration der reagierenden Gruppen und kann photometrisch gemessen werden. Zur Bestimmung des Proteingehaltes im Bereich von 0,2 mg/ml bis 2 mg/ml Protein wurde der BioRad D_C Protein Assay verwendet, der auf einer modifizierten Methode nach Lowry beruht. Proteinkonzentrationen im Bereich von 2 µg/ml bis 20 µg/ml wurden mit dem Micro BCA Protein Assay (Pierce) bestimmt. Dieser Test kombiniert die Biuret-Reaktion mit Bicinchinonsäure als farbstoffbildendem Reagenz. Die Eichung der Proteintests erfolgte mit Standardlösungen von Rinderserumalbumin (BSA, Sigma) in den entsprechenden Konzentrationsbereichen.

2.5.2 SDS-Disk-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese¹³³ (SDS-PAGE) wurde nach der von Laemmli¹³⁴ beschriebenen Methode in einem Tris-Chlorid-Glycinat-Puffersystem durchgeführt. Für alle Versuche wurden 10-12%ige Acrylamidgele verwendet. Eine Mini-Protean II Gelkammer (BioRad) wurde für die Gelelektrophorese benutzt. Die Bestimmung der relativen Molekülmassen der elektrophoretisch getrennten Proteine erfolgte durch den Vergleich der Mobilitäten dieser Proteine mit denen von Markerproteinen. Dazu wurden zwei Standards eingesetzt: Premixed Protein Molecular Weight Marker low range (Boehringer Mannheim) und SDS-Standard low range (BioRad). Je nach Proteingehalt der Proben wurden die SDS-Polyacrylamidgele mit Silber oder Coomassie-Brillantblau R250 gefärbt.

2.5.3 Western-Blotting

Proteine wurden von SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch auf Nitrocellulosemembranen (B85 , 0,45 µm, Schleicher & Schüll) in einer Mini Trans Blot® Kammer (BioRad) transferiert. Als Transferpuffer wurde 48 mM Tris, 39 mM Glycin pH 9,1 verwendet und die Proteine bei 100 V (max. 300 mA) in 60 – 90 Minuten immobilisiert.

Zur unmittelbaren Kontrolle des Transfers wurde der Precision Protein Standard Dual Color (BioRad) verwendet. Die Westernblots wurden nach einer Standardmethode mit Ponceau S (Serva) angefärbt.

2.5.4 Immunochemische Nachweisreaktionen

Dotblots und Westernblots wurden mit Primärantikörpern (Penta-His-Antikörper, Qiagen; Inositolhexakisphosphatkinase-Antikörper, Affinity Bioreagents) inkubiert. Zum Nachweis der spezifischen Bindung wurde ein mit Alkalischer Phosphatase konjugierter Anti-Mouse Ig/ Anti-Rabbit-IgG-Antikörper (BM Chromogenic Western Blotting Kit, Roche) verwendet. Die Bindung des Sekundärantikörpers wurde durch die Farbreaktion mit BCIP/ NBT (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat/ Nitroblue Tetrazolium) als blau-violette Färbung nachgewiesen¹³⁵. Das Protokoll für die immunochemische Nachweisreaktion von Proteinen ist in Tabelle 2-7 wiedergegeben.

Lösung	Zusammensetzung	Dauer
TBS	10 mM Tris/HCl 150 mM NaCl pH 7,5	zweimal 10 min
Blocking-Reagenz	3% BSA in TBS	1 h oder über Nacht
TBS/ Tween/ Triton	20 mM Tris/HCl 500 mM NaCl 0,05% Tween 20 (Sigma) 0,2% Triton X 100 pH 7,5	zweimal 10 min
TBS		10 min
Primärantikörper	in Blocking-Reagenz ^(a)	1 – 2 h
TBS/ Tween/ Triton		zweimal 10 min
TBS		10 min
Sekundärantikörper Anti-Mouse Ig/ Anti-Rabbit-IgG-AP	8 U/ 10 ml in Blocking-Reagenz	1 h
TBS/ Tween/ Triton		dreimal 10 min

Tab. 2-7: Protokoll für immunochemische Nachweisreaktionen

^a Der Primärantikörper wurde entsprechend den Vorgaben der Hersteller verdünnt.

2.6 Enzymtests

2.6.1 Photometrischer Enzymtest durch eine gekoppelte enzymatische Reaktion

Dieser von Laussmann⁶⁵ entwickelte Assay ermöglichte eine schnelle halbquantitative Bestimmung der Enzymaktivität der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase im Mikromaßstab. 4 nmol 5,6-bis-PP-InsP₄ wurden auf einer Mikrotiterplatte mit 50 µl Probe und 50 µl Testreagenz (Tab. 2-8) versetzt und 20 Minuten inkubiert. Das Testreagenz wurde kurz vor Gebrauch frisch hergestellt. Die Blaufärbung zeigte die Enzymaktivität an. Die photometrische Bestimmung der Extinktion bei 540 nm erlaubte die Abschätzung der Enzymaktivitäten der einzelnen Fraktionen relativ zueinander.

Substanz	Stocklösung	Entnahme Stocklösung [µl]	Konzentration im Testreagenz
Bidestilliertes Wasser		404	
HEPES-Puffer pH 6,8 (Roth)	200 mM	1000	50 mM
MgCl ₂ (Merck)	50 mM	800	10 mM
EDTA (Sigma)	5 mM	400	0,5 mM
Triton X-100 (Biomol)	1% (v/v)	400	0,1%
Nitro-Blue (Boehringer Mannheim)	5 mM	400	0,5 mM
Glucose-Monohydrat (Merck)	10 mM	400	1 mM
ADP (Dinatriumsalz, Boehringer Mannheim)	10 mM	40	0,1 mM
NADP ⁺ (Boehringer Mannheim)	2 mM	80	40 µM
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Sigma)	700 U/ml	29	5 U/ml
Diaphorase (Sigma)	25 U/ml	40	0,25 U/ml
Hexokinase (Sigma)	2270 U/ml	7	4 U/ml

Tab. 2-8: Testreagenz für den 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase-Farbttest

2.6.2 Nachweis der Enzymaktivität mit HPLC-MDD-Analyse

Die quantitative Bestimmung der Aktivität der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase erfolgte mit der HPLC-MDD-Analyse. Dazu wurden nach den einzelnen Anreicherungs-schritten die

Fraktionen, die Aktivität im optischen Farbttest zeigten, vereinigt. Die zu testende Probe wurde mit 6 nmol 6-PP-InsP₅ und 20 mM HEPES-Puffer pH 6,8 auf ein Volumen von 500 µl verdünnt und mit 500 µl Testlösung (Tab. 2-9) bei 25°C im Heizblock inkubiert. Die Reaktion wurde zu verschiedenen Zeitpunkten durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff gestoppt. Die eingefrorenen Proben wurden mit 1 ml bidestilliertem Wasser in ein HPLC-Probengefäß überführt, nach dem Auftauen direkt in die HPLC-Anlage injiziert und analysiert.

Komponente	Konzentration in der Testlösung
HEPES-Puffer pH 6,8 (Roth)	25 mM
MgCl ₂ (Merck)	10 mM
ATP (Dinatriumsalz, Boehringer Mannheim) pH 6,8	2 mM
Creatinphosphatkinase (Sigma)	2 U/ml
Creatinphosphat (Sigma)	10 mM

Tab. 2-9: Testlösung zur Phosphorylierung von 6-PP-InsP₅

Durch die graphische Auftragung der gemessenen InsP₇-Umsätze gegen die Inkubationszeiten wurde die Enzymaktivität der Proben nach der Methode der Anfangsgeschwindigkeiten bestimmt.

2.7 Anreicherung der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase

2.7.1 Zellaufschluss

2400 ml Zellsuspension ($1 \cdot 10^7$ Zellen/ml) wurden in der Beckmann Zentrifuge (Rotor TA20, 3-4000 Upm, 5 min) zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets zweimal mit 400 ml kaltem 20 mM HEPES-Puffer pH 7,2 (Roth) gewaschen. Das Pellet wurde in 50 mM HEPES pH 6,8 zu einer Zelldichte von $1,5 \cdot 10^8$ pro ml resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit einer Spritze durch einen Membranfilter mit 5 µm Porengröße (Nucleopore PC-Membran) gepresst¹³⁶ und das Lysat nach mikroskopischer Kontrolle zentrifugiert (Beckmann Ultrazentrifuge L7-55, Rotor 70Ti, 45000 Upm, 30 min). Die Überstände wurden abdekantiert und mit kaltem 50 mM HEPES-Puffer pH 6,8 auf das dreifache Volumen verdünnt. Das schwammige Pellet, das Membranen und Zellorganellen enthält, wurde verworfen. Aus dem cytosolischen Extrakt wurde die 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase angereichert.

Mit dem Ziel, das Anreicherungsverfahren zu optimieren, wurden Zellen außerdem durch Einfrieren und Auftauen sowie durch die Zugabe von 1% Triton X100 aufgeschlossen. Abweichend von dem etablierten Filteraufschluss wurden $1 \cdot 10^{10}$ Zellen aufgeschlossen und kleinere Säulen für die Ionenaustauschchromatographie verwendet (Q-Sepharose: 20 ml Volumen; SP-Sepharose: 2 ml Volumen, 10 ml NaCl-Gradient zur Elution).

2.7.2 Säulenchromatographie

Die Anreicherung der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase erfolgte säulenchromatographisch bei 8°C. Mit einer peristaltischen Pumpe (Pharmacia peristaltic pump P1) wurden die Proben aufgetragen und eluiert. Die Extinktion der Eluate wurde bei 280 nm durch ein UV-Photometer (Pharmacia LKB Uvicord SII, Iodlampe) gemessen und mit einem Schreiber (Pharmacia LKB Bromma 2210 2-channel recorder) registriert. Ein Fraktionskollektor (Pharmacia LKB Bromma 2111 Multirac) ermöglichte die automatische Fraktionierung der Eluate. Die Aktivität der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase wurde qualitativ durch den optischen Farbttest bestimmt. Die quantitative Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte durch HPLC-MDD-Analysen.

2.7.2.1 Ionenaustauschchromatographie an Q- und SP-Sepharose fast flow

Als Säulenmaterialien wurden Q-Sepharose, ein starker Anionenaustauscher mit einer quaternären Trimethylaminogruppe, und SP-Sepharose, ein starker Kationenaustauscher mit einer Sulfopropylgruppe, verwendet. Sepharose, die Matrix beider Ionenaustauscher, ist eine quervernetzte Agarose mit einer Korngröße von 45-165 µm. Die Vorteile dieser Matrix sind ihre hohe Bindekapazität, hohe chemische und physikalische Stabilität sowie die einfache Handhabung bezüglich Regenerierung und Reinigung.

Der Rohextrakt wurde mit einer Flußrate von 3ml/min auf die Q-Sepharose-Säule (Pharmacia, Länge 20 cm, ID 2,5 cm, Volumen ca. 100 ml) aufgetragen. Diese Säule war mit der SP-Sepharose-Säule (Pharmacia, Länge 10 cm, ID 1,4 cm, Volumen ca. 20 ml) verbunden, so dass die Proteine des Rohextraktes, die nicht von der Q-Sepharose retardiert werden, direkt auf die SP-Sepharose aufgetragen wurden. Die Säulen wurden mit 250 ml 50 mM HEPES-Puffer pH 6,8 (Roth) gespült und anschließend voneinander getrennt. Eluiert wurde die 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase von der SP-Sepharose durch einen 100 ml Gradienten von

0-150 mM NaCl in 50 mM HEPES pH 6,8 mit einer Flußrate von 1 ml/min. Fraktionen á 2 ml wurden gesammelt und die aktiven Fraktionen vereinigt. Zwischen 52 ml (80 mM NaCl) und 72 ml (110 mM NaCl) wurden die Fraktionen mit der höchsten InsP₇-Kinaseaktivität eluiert.

Die Säulen wurden nach jedem Gebrauch mit 1 M NaCl in 50 mM HEPES pH 6,8 regeneriert.

2.7.2.2 Affinitätschromatographie an InsP₆-Gel

Das InsP₆-Gel wurde von der Arbeitsgruppe Prestwich¹³⁷ synthetisiert. Die 6-PP-InsP₅-(5)-Kinasepräparation wurde nach der Ionenaustauschchromatographie mit 10% (v/v) Glycerin (Roth) zur Stabilisierung versetzt und mit 50 mM HEPES pH 6,8 auf das doppelte Volumen verdünnt. Dieser Extrakt wurde auf eine InsP₆-Gelsäule (Länge 6,5 cm, ID 1 cm, Volumen ca. 5 ml) mit einer Flussrate von 0,35 ml/min aufgetragen. Die Säule wurde dann mit dem doppelten Säulenvolumen 50 mM NaCl in 50 mM HEPES pH 6,8 gespült. Die Elution der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase erfolgte mit einem Puls von 0,7 ml 100 µM InsP₆ (Sigma), 50 mM NaCl in 50 mM HEPES pH 6,8 und anschließendem Spülen mit dem doppelten Säulenvolumen Waschpuffer. Die 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase wird durch InsP₆ inhibiert, deshalb wurde InsP₆ durch eine nachgeschaltete Q-Sepharose-Säule (BioRad, Volumen 1 ml) direkt entfernt. Während der Elution wurden Fraktionen á 1 ml gesammelt und die Aktivität überprüft. Nach der Vereinigung der aktiven Fraktionen wurden diese mit 20% (v/v) Glycerin stabilisiert und bei -86°C aufbewahrt.

Das InsP₆-Gel wurde nach jedem Gebrauch mit 2 M NaCl in 50 mM HEPES pH 6,8 regeneriert. Eine zusätzliche Reinigung des Affinitätsmaterials erfolgte nach jeweils 5 Läufen mit 100 mM EDTA pH 9 (Sigma). Das Material wurde unter 20% Ethanol (Roth) aufbewahrt.

2.7.2.3 Affinitätschromatographie an anderen Materialien

Die Affinitätschromatographie an 5'-AMP-Sepharose, ADP-Agarose und ATP-Agarose (Sigma) erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie die InsP₆-Affinitätschromatographie. Abweichend wurden 1 ml Säulen verwendet. Die Elution erfolgte mit einem Puls von 0,5 ml 100 µM ATP in 50 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 6,8 und anschließendem Spülen mit dem doppelten Säulenvolumen Waschpuffer.

Von der Arbeitsgruppe Falck (Department of Biochemistry, UT Southwestern Medical Center, Dallas, USA) wurde ein 5-PP-InsP₅-Derivat zur Verfügung gestellt. Zur Synthese eines weiteren Affinitätsmaterials wurde 1 µmol dieses Derivats an 0,5 ml N-Hydroxysuccinimid-aktivierte Sepharose 4 (NHS, fast flow, Pharmacia) in Carbonatpuffer pH 9,2 gekoppelt. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C konnte durch die HPLC-MDD-Analyse kein freier Ligand mehr nachgewiesen werden. Freie reaktive Gruppen der Matrix wurden mit Ethanolamin blockiert. Das InsP₇-Affinitätsmaterial wurde zur Anreicherung der InsP₇-Kinase analog zu dem InsP₆-Affinitätsmaterial verwendet.

2.8 Charakterisierung der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase durch Massenspektrometrie

6-PP-InsP₅-(5)-Kinasepräparationen wurden nach der Affinitätschromatographie mit Strataclean™ Harz (Stratagene) entsalzt und aufkonzentriert. Die gebundenen Proteine wurden durch SDS-PAGE elektroeluiert und elektrophoretisch getrennt. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt und anschließend die Bande der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase knapp ausgeschnitten. Der Gelspot wurde weiter zerkleinert und in ein silikonisiertes Eppendorfcup überführt. Zur Entfärbung wurde mit 100 µl 25 mM Ammoniumcarbonatpuffer pH 8 / 50% Acetonitril 10 min gevortext. Der Überstand wurde verworfen und dieser Waschschriff solange (drei- bis viermal) wiederholt, bis die Gelstücke vollständig entfärbt waren. Vor dem „In-Gel-Verdau“ wurden sie einmal mit reinem Acetonitril gewaschen und mindestens 30 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

Für den „In-Gel-Verdau“ der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase wurde eine Trypsinlösung (0,1 mg/ml in 25 mM Ammoniumcarbonat pH 8) frisch hergestellt. Die getrockneten Gelstücke wurden mit dieser Lösung (10 – 20 µl) rehydratisiert. Vor der Inkubation war ein eventueller Überschuss zu entfernen, um die Autoproteolyse des Trypsins zu minimieren. Das rehydratisierte Gel wurde mit 25 mM Ammoniumcarbonatpuffer pH 8 überschichtet und 12 bis 16 h bei 37°C inkubiert. Nach dem „In-Gel-Verdau“ wurden die entstandenen Peptide der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase aus dem Gel extrahiert (Tab. 2-10). Die vereinigten Überstände wurden in einer Vakuumzentrifuge eingeeengt und lyophilisiert.

Schritt	Extraktionslösung	Dauer
Extraktion	20 –40 µl bidestilliertes Wasser	
Vortex und Ultraschallbad		je 5 min
Extraktion	20 –40 µl 5% Ameisensäure, 50% Acetonitril	einmal wiederholen
Vortex und Ultraschallbad		je 5 min
Extraktion	20 – 40 µl reines Acetonitril	
Vortex und Ultraschallbad		je 5 min

Tab. 2-10: Protokoll zur Extraktion der Peptide nach dem „In-Gel-Verdau“

Bei der Nanoelektrosprayionisation werden sehr feine Kapillaren verwendet. Salze, insbesondere Kationen, in den Proben beeinflussen zum einen stark die Auflösung der Spektren und führen zum anderen dazu, dass diese Kapillaren durch Kristallbildung sehr schnell verstopft werden. Deshalb wurden die proteolytischen Fragmente unmittelbar vor der Aufnahme der ESI-Massenspektren mit ZipTip_{µC18} (Eppendorf) entsalzt und konzentriert¹³⁸. Das Peptidgemisch wurde in 10 µl 1% Ameisensäure/ 4% Methanol aufgenommen und an das entsprechend vorbereitete Säulenmaterial gebunden. Nach dem Waschen wurden die Peptide schrittweise mit jeweils 6 µl 1% Ameisensäure/ 60% Methanol und 1% Ameisensäure/ 80% Methanol eluiert. Mit 1% Ameisensäure/ 60% Methanol, der standardmäßig verwendeten Elutionslösung, konnten nur wenige Peptide eluiert werden. Erst die Erhöhung der Methanolkonzentration auf 80% führte zu der effektiven Elution der offenbar hydrophoben Fragmente der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase von dem C18-Harz.

2.8.1 Aufnahme und Auswertung der ESI-Massenspektren

Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte in Kooperation mit Frau Dr. S. Metzger (Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum, Analytisches Zentrallabor, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf). Die Massenspektren wurden an einem Elektrospray Quadrupol Time-of-flight Tandemmassenspektrometer (QSTAR Pulsar I, Applied Biosystems MDS Sciex, Forster City, USA) mit einer Nanoelektrospray-Ionenquelle (Protana, Odense, Dänemark) aufgenommen. Ausgewählte Peptide wurden im Tandemmassenspektrometrie-modus analysiert. Dazu wurden mit Hilfe eines Gitters nur Ionen einer bestimmten Molekülmasse in eine Stoßkammer durchgelassen, in der durch Zuführung eines inerten Stoßgases der Zerfall dieses Peptids induziert wurde. Für jedes Peptid wurde die Stoßgaskonzentration und die Kollisionsenergie so ausgewählt, dass auswertbare CID-Massenspektren (collision induced decay) aufgenommen werden konnten. Die erhaltenen Fragmentationenspektren wurden mit dem Programm Analyst® QS/ Bioanalyst (Applied Biosystems MDS Sciex) teilweise *de-novo* sequenziert. Die Massenfingerprints der Peptide wurden gegen eine Proteindatenbank (NRDB; European Bioinformatics Institute) mit Hilfe des Mascot-Suchalgorithmus (<http://www.matrixscience.com/cgi/index.pl?page=/>) abgeglichen. Die Peptidsequenzen wurden auch dazu verwendet, Datenbanken mit Hilfe der BLAST- and TBLAST-Programme zu durchsuchen.

2.9 Identifizierung des Gens der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase mit molekularbiologischen Methoden

Mit den Aminosäuresequenzen der einzelnen Peptide aus ESI-MS/MS-Analysen wurden Protein-, DNA- und EST-Datenbanken durchsucht, um Homologien zu bereits bekannten Proteinen oder sequenzierten und analysierten Genen zu finden. Zur Identifizierung des Gens wurden molekularbiologische Methoden eingesetzt, die in Abbildung 2-2 schematisch dargestellt sind und im Anschluss beschrieben werden.

2. Material und Methoden

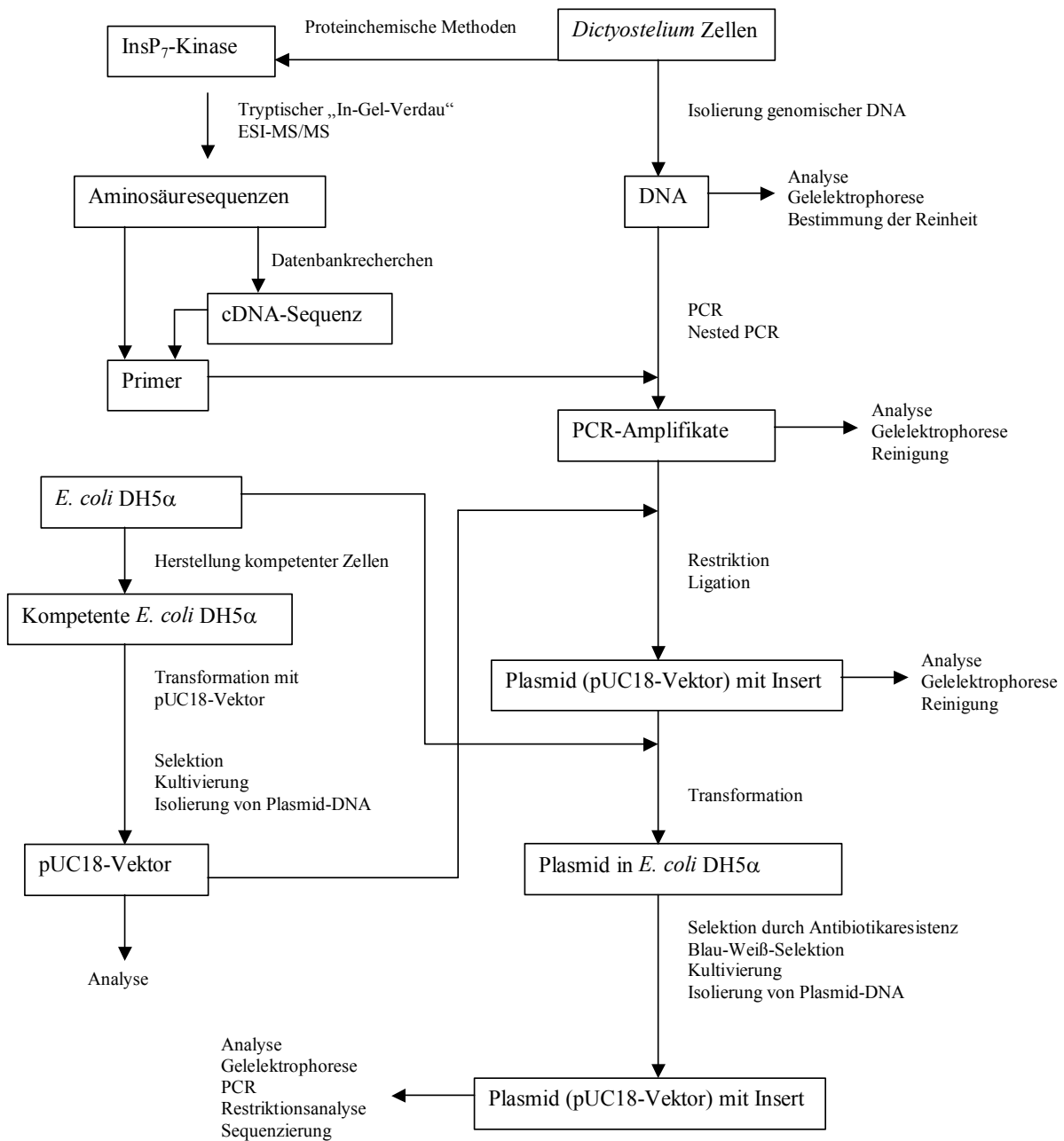


Abb. 2-2: Schematische Darstellung der angewendeten molekularbiologischen Methoden

2.9.1 Verwendete Lösungen und Medien

Lösung / Medium und Verwendung	Zusammensetzung
I. Lösungen zur DNA-Isolierung	
1. Kernpuffer	Tris (Roth) pH 7,6 20 mM Magnesiumacetat (Merck) 5 mM EDTA (Sigma) 0,5 mM Saccharose (Merck) 5% sterilfiltriert
2. Protease K Puffer	Tris (Roth) pH 7,5 100 mM EDTA (Sigma) 5 mM Proteinase K (Roth) 0,1 mg/ml SDS 1% sterilfiltriert
3. NP40-Lysepuffer zur Isolierung von Zellkernen ¹³⁹	HEPES (Roth) pH 7,5 30 mM Magnesiumacetat (Merck) 10 mM NaCl (Roth) 10 mM Saccharose (Merck) 10% Nonidet P 40 2% sterilfiltriert
4. SDS-Lysispuffer zur Isolierung von Zellkernen ¹³⁹	NaCl (Roth) 400 mM Tris (Roth) 10 mM SDS 0,2% pH 8 sterilfiltriert
5. TE-Puffer	Tris (Roth) 10 mM EDTA (Sigma) 10 mM pH 8 sterilfiltriert
II. Lösungen für die Gelelektrophorese von DNA	
6. 50x TAE Puffer für die Agarosegelelektrophorese ¹⁴⁰	Tris (Roth) 2 M Essigsäure (Roth) 1 M EDTA (Sigma) 0,1 M pH 8,3, autoklavieren bei 120°C 15 min
7. 6x DNA-Probenpuffer	Bromphenolblau (Biomol) 0,25% Xylencyanol FF (Biomol) 0,25% Sucrose (Merck) 40% in sterilem, nukleasefreiem Wasser
8. Ethidiumbromid-Stocklösung	10 mg/ml in Wasser

III. Lösungen und Medien zur Anzucht von *E. coli* und Selektion von Transformanten

9. LB-Medium ¹⁴⁰ (Luria-Bertani) zur Anzucht von <i>E. coli</i>	Trypton (Roth) 10 g/l Hefeextrakt (Oxoid) 5 g/l NaCl (Roth) 10 g/l pH 7,5, autoklavieren bei 120°C, 15 min
10. LB-Agar zur Anzucht von <i>E. coli</i> und Selektion von Transformanten	wie 9. zusätzlich 7 g bzw. 15 g Agar (Oxoid), autoklavieren bei 120°C, 15 min nach dem Abkühlen Zugabe von Ampicillin und/oder X-Gal LB-Amp-Platten Ampicillin 100 µg/ml LB-Amp-X-Gal-Platten Ampicillin 100 µg/ml X-Gal 40 µg/ml
11. X-Gal-Stocklösung (Roth)	40 mg/ml in Dimethylformamid
12. Ampicillin-Stocklösung (Sigma)	10 mg/ml in Wasser, sterilfiltriert

IV. Medien und Lösungen für Transformationen

13. SOB-Medium	Trypton (Roth) 20 g/l Hefeextrakt (Oxoid) 5 g/l NaCl (Roth) 0,5 g/l KCl (Merck) 25 mM autoklavieren bei 120°C, 15 min, auf 10 mM MgCl ₂ mit 1M Stammlösung einstellen
14. SOC-Medium	wie 13., nach dem Autoklavieren zusätzlich auf 20 mM Glucose mit sterilfiltrierter Stammlösung einstellen
15. TB-Puffer	HEPES (Roth) 10 mM CaCl ₂ (Merck) 15 mM KCl (Merck) 250 mM pH 6,7 mit KOH einstellen, MnCl ₂ 55 mM sterilfiltrieren

Tab. 2-11: Verwendete Puffer, Lösungen und Medien

2.9.2 Isolierung und Analyse von genomischer DNA

Genomische DNA wurde aus *Dictyostelium discoideum* mit dem DNeasy Tissue Kit (Qiagen) entsprechend dem Herstellerprotokoll isoliert. Dabei wurde die Ausgangszellmenge variiert ($0,5-4 \cdot 10^7$ Zellen). Polysaccharide und RNA sind bei DNA-Isolierungen problematisch. Da in *Dictyostelium* hohe Konzentrationen von Polysacchariden zu finden sind, die offensichtlich zu sehr geringen Ausbeuten bei der Isolierung von genomischer DNA mit dem Tissue Kit führen, wurde DNA auch aus den Zellkernen nach konventionellen Methoden isoliert.

DNA wurde nach einer Vorschrift aus dem Labor von W. Nellen¹³⁹ isoliert. $1 \cdot 10^8$ axenisch gewachsene Zellen wurden durch Zentrifugation (3000 Upm, 10 min) geerntet und zweimal mit eiskaltem bidestilliertem Wasser gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1 ml Kernpuffer (Tab. 2-11, 1) aufgenommen und nach der Zugabe von 200 μ l 20% Triton X100 5 min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation des Zellysats (6000 Upm, 5 min) wurde das Kernpellet in 300 μ l Protease K Puffer (Tab. 2-11, 2) aufgenommen. Die Lösung wurde 20 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert und anschließend mit 300 μ l Phenol (Roth) versetzt. Die wässrige Phase wird abgenommen und mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, Roth) durch vorsichtiges Mischen extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit Ether zur Entfernung von Phenolresten gegengeschüttelt. Die DNA wurde durch Zugabe von 2,5 Volumenteilen Ethanol gefällt. Das DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, kurz an der Luft getrocknet und bei Raumtemperatur in 50 μ l TE-Puffer (Tab. 2-11, 5) mit 10 μ l / ml RNase A (100 mg / ml Stammlösung) inkubiert. Die DNA wurde erneut mit Ethanol gefällt, gewaschen, kurz an der Luft getrocknet und in 50 μ l TE-Puffer gelöst.

DNA wurde nach einem Protokoll von T. Winckler (persönliche Mitteilung) isoliert. $2 \cdot 10^9$ Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und zweimal mit eiskaltem bidestilliertem Wasser gewaschen. Das Zellpellet wurde in 10 ml Lysepuffer (Tab. 2-11, 3) aufgenommen und 5 min kräftig geschüttelt. Nach der Zentrifugation des Zellysats (10.000 g, 15 min) wurde das Kernpellet in 3ml SDS-Lysispuffer (Tab. 2-11, 4) aufgenommen. Nach Zugabe von 75 μ l Proteinase K-Lösung (Qiagen, 20mg/ml) wurde die Lösung 2 h bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Der Ansatz wurde mit 9 ml Ethanol (Roth) überschichtet und die DNA aufgespult. Die DNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen, kurz an der Luft getrocknet und bei Raumtemperatur 2 Tage in TE-Puffer (Tab. 2-11, 5) gelöst.

Da auch mit den konventionellen Methoden DNA nur in geringen Ausbeuten oder mit starken Verunreinigungen isoliert werden konnte, wurde genomische DNA aus *Dictyostelium* mit dem DNeasy Plant Kits (Qiagen) isoliert. Die Ausbeute wurde zunächst bezüglich der eingesetzten Zellmenge als Ausgangsmaterial optimiert. Bis zu einer Zellzahl von $4 \cdot 10^7$ wurde eine Ausbeute von 25% erreicht. Bei einer größeren Ausgangszellmenge reduziert sich die Ausbeute. Weitergehend wurden Zellen vor der chemischen Zellyse mechanisch durch Einfrieren und Auftauen aufgebrochen und die Lysiszeit verkürzt, um die Ausbeute zu optimieren. Hier zeigte sich, dass nach dem Gefrieraufschluss eine Inkubationszeit von 1 min in dem Lysispuffer ausreicht, um die Zellen vollständig zu lysieren. Eine längere

Inkubationszeit führte wiederum zu einer geringeren Ausbeute. Unter diesen Bedingungen wurden ca. 10 µg DNA mit guter Reinheit erhalten, was einer Ausbeute von 50% entspricht.

DNA wurde durch Agarosegelelektrophorese in horizontalen Flachbettkammern (Mini oder Mini Wide Sub Cell, BioRad) identifiziert, bei denen die Gele direkt im Puffer lagen. Für den Nachweis wurden 0,5 oder 0,7%ige Agarose (NEEO, Roth) in 1x TAE-Puffer (Tab. 2-11, 6) verwendet. Um die DNA zu visualisieren wurde den Agarosegelen und dem Elektrophoresepuffer Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) zugesetzt. Die Proben wurden mit DNA-Probenpuffer (Tab. 2-11, 7) im Verhältnis 5:1 vermischt. Die Elektrophorese erfolgte mit einer Spannung von 5 – 10 V/cm Laufstrecke. Nach der Elektrophorese konnte die DNA mit einem Geldokumentationssystem (GelDoc 2000, Biorad) unter UV-Licht (366 nm) detektiert werden. Die Bestimmung der Größe und die Quantifizierung der DNA erfolgte durch den Vergleich mit dem DNA-Längenstandard III (Roche). Die Reinheit der DNA wurde photometrisch durch das Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 280 nm bestimmt. Reine DNA zeigt ein Absorptionsverhältnis A_{260}/A_{280} von 1,7 bis 1,9. Die Absorption bei 260 nm erlaubt gleichzeitig die Quantifizierung der DNA ($A_{260} = 1 \cong 50\mu\text{g/ml}$).

2.9.3 Primerdesign und Polymerasekettenreaktion

Primer für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden zum einen von den ermittelten Peptidsequenzen unter Berücksichtigung der *Dictyostelium*-spezifischen Codons¹⁴¹ abgeleitet (Tab. 2-12). Dabei wurde darauf geachtet, dass der Degenerierungsgrad der Primer aufgrund der vorgegebenen Aminosäuren möglichst niedrig gehalten wurde. Zum anderen wurden Primer von den entsprechenden DNA- bzw. cDNA-Sequenzen abgeleitet (Tab. 2-13). Die Sequenzen der jeweils eingesetzten Primerpaare wurden mit dem Programm PrimerFind 3.0 hinsichtlich ihrer Schmelz- und Hybridisierungstemperatur, eventuell auftretender Sekundärstrukturen sowie der Dimerisierung analysiert. Die Primer wurden von der MWG-Biotech AG synthetisiert.

Primer	Sequenz
TL1 s ^(a)	5'-GATTTTTTTGAAAATAATCCAGATTA-3'
TL2 as ^(a)	5'-TAATCTGGATTATTTTCAAAAAA(AG)TC-3'
TL3 s ^(b)	5'-ATIGATT(CT)ACICATACIAA-3'
TL4 as ^(b)	5'-TTIGTATGIGT(AG)AAATCIAT-3'
CT1 s ^(b)	5'-ATTGATT(CT)AC(ACT)CATAC(ACT)AA-3'
CT2 as ^(b)	5'-TT(AGT)GTATG(AGT)GT(AG)AAATCAAT-3'
CT3 s ^(c)	5'-GATCT(CT)AAAATGGGTAC(AT)AGACAACA-3'
CT4 as ^(c)	5'-TGTTGTCT(AT)GTACCCATTTT(AG)AGATC-3'
CT5 s ^(a)	5'-GA(CT)TT(CT)TT(CT)GA(AG)AATAATCC(AT)G-3'
CT5 as ^(a)	5'-C(AT)GGATTATT(CT)TC(AG)AA(AG)AA(AG)TC-3'
CT6 s ^(b)	5'-TTAATTGATTT(CT)ACTCATACTAAA-3'
CT6 as ^(b)	5'-TTTAGTATGAGT(AG)AAATCAATTAA-3'
CT11.1s ^(d)	5'-C(AT)CCAAC(AT)(CT)T(AC)GA(AG)GA(CT)TTTGA(AG)GAAAA-3'
CT11.2s ^(d)	5'- C(AT)CCAAC(AT)(CT)T(AC)GA(AG)GA(CT)TTTGA(AG)GAGAA -3'
CT11.1as ^(d)	5'-TT(CT)TC(CT)TCAAA(AG)TC(CT)TC(GT)A(AG)(AT)GTTGGAG-3'
CT11.2as ^(d)	5'- TT(CT)TC(CT)TCAAA(AG)TC(CT)TC(GT)A(AG)(AT)GTTGGTG -3'
CT12s ^(e)	5'-GC(AT)AT(ACT)CCAAA(CT)GG(ACT)GT(AT)GA(CT)AT(ACT)TATTGG-3'
CT12.1as ^(e)	5'-CCATA(AGT)AT(AG)TC(AT)AC(AGT)CC(AC)TTTGG(AGT)ATAGC-3'
CT12.2as ^(e)	5'- CCATA(AGT)AT(AG)TC(AT)AC(AGT)CC(AC)TTTGG(AGT)ATTGC -3'

Tab. 2-12: Übersicht über die verwendeten degenerierten Oligonukleotide, die von Peptidsequenzen abgeleitet wurden

In Klammern sind die Basen angegeben, die als Primermischung vorliegen. I: Inosin wurde anstelle von 4 möglichen Basen eingesetzt; s: Primer in 5'-Richtung; as: Primer in 3'-Richtung (revers komplementär); **a**: Peptidsequenz DFFENNPDY; **b**: Peptidsequenz LIDFHTK; **c**: Peptidsequenz DLKMGTRQH, Teil der konservativen Inositolphosphatbindestelle, die in allen InsP₆-Kinasen auftritt; **d**: Peptidsequenz TPTLEDFEEK; **e**: Peptidsequenz AIPNGVDIYW; **f**: Peptidsequenz QFYESLSPDNE

Primer	Sequenz	Anmerkungen ^(a)
CT7 s	5'-GAAGATTTAACCTATTTATGTAAATATCCT-3'	nt 178-207 JAX4a216b11.r1 ^(b)
CT7 as	5'-AGGATATTTACATAAATAGGTAAATCTTC-3'	nt 178-207 JAX4a216b11.r1 ^(b)
CT8 s	5'-CGCTCCAATTGAGAAAATAAAT-3'	nt 122-133 JAX4a216b11.r1 ^(b)
CT8 as	5'-ATTTATTTTCTCAATTGGAGCG-3'	nt 122-133 JAX4a216b11.r1 ^(b)
CT9 s	5'-GGGTTTATTAATAAATAACATACTTTTA-3'	nt 21-50 JAX4a216b11.r1 ^(c)
CT9 as	5'-TAAAAGTATGTTATTAATTTAATAAACCC-3'	nt 21-50 JAX4a216b11.r1 ^(c)
CT10 s	5'-CAAAATTTGGTGAATTTGAACTT-3'	nt 326-349 JAX4a216b11.r1 ^(c)
CT10 as	5'-AAGTTCAAATTCACCAAATTTTG-3'	nt 326-349 JAX4a216b11.r1 ^(c)
CT15 s	5'-AAATAAAAATAGGTACCATGGTCCTTAGTAAACAAATTGTA-3'	cDNA VFM264 ^(d)
CT16 as	5'-TTGATTTTATTTTATTCTAGATACAATTTTACCATCATTTTA-3'	cDNA VFM264 ^(d)
5' AOX1 Pichia	5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'	AOX1 Gen ^(e)
3' AOX1 Pichia	5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'	AOX1 Gen ^(e)

Tab. 2-13: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide, die von DNA-Sequenzen abgeleitet wurden

a: Die Oligonukleotide wurden von DNA-Sequenzen der angegebenen Klone abgeleitet. nt: Position der Nukleotide in der Sequenz; **b:** Sequenz der Inositolphosphatbindestelle eines *Dictyostelium* Klons aus dem Genomsequenzierungszentrum Jena, die Homologien zu InsP₆-Kinasen zeigt; **c:** Primer zur Amplifikation der kompletten Sequenz des Klons aus dem Genomsequenzierungszentrum Jena; **d:** Primer für die Überexpression mit zwei neu generierten Restriktionsstellen an den Enden der cDNA-Sequenz, um das PCR-Produkt in der richtigen Orientierung in den pPIC6α A-Expressionsvektor einzusetzen; **e:** Primer für die Amplifikation des Alkoholoxidase1-Gens in *Pichia pastoris* Transformanten

Die PCR zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde in einem Thermocycler (Tpersonal, Biometra) durchgeführt. Es wurden Taq- und Vent-DNA-Polymerasen eingesetzt (Tab. 2-14). Ebenso wurden hot-start-PCRs unter Verwendung des HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen) durchgeführt, um unspezifische Produktbildungen zu minimieren. Die Polymerase-Kettenreaktion musste bei *Dictyostelium* aufgrund des hohen AT-Gehaltes der DNA und des Degenerierungsgrades einiger Primer optimiert werden. Dazu wurde der Einfluss der Template-, Primer- und Mg^{2+} -Konzentration untersucht. Bei der Amplifikation AT-reicher DNA ist es sinnvoll, die Extensionstemperatur zu reduzieren um die Ausbeute zu erhöhen¹⁴². Der Einfluss der Extensionstemperatur auf die Ausbeute wurde untersucht. Tabelle 2-15 gibt optimale Zeiten und Temperaturen der einzelnen Schritte wieder.

	Taq-DNA-Polymerase (Roche)	Vent-DNA-Polymerase (Promega)
10x Polymerasepuffer	10%	10%
dNTP-Mix 3 (Roth)	0,2 mM	0,2 mM
Primer I	0,2 – 1 μ M	0,2 – 1 μ M
Primer II	0,2 – 1 μ M	0,2 – 1 μ M
MgCl₂	0 – 4 mM	0 – 4 mM
Template-DNA	5 ng - 1 μ g	5 ng - 1 μ g
Polymerase	1 U/ 50 μ l	0,5-1U/ 50 μ l
nukleasefreies Wasser	ad 50 μ l	ad 50 μ l

Tab. 2-14: Zusammensetzung der PCR-Ansätze

Als Template-DNA wurden entweder 0,1 – 1 μ g genomische DNA oder 5 – 200 ng Plasmid-DNA eingesetzt.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	
1	94	0,5 - 1	Denaturierung
2	37 – 60	1	Annealing der Primer
3	68	1 - 2	Amplifikation
4	68	8	Extension
5	26	1	Abkühlen

Tab. 2-15: PCR-Programm

Bei der hot-start-PCR wurden die Reaktionsansätze zu Beginn 15 min auf 94°C erhitzt, um die Polymerase zu aktivieren. Die Annealing-Temperatur ist abhängig von den verwendeten Primerpaaren und dem DNA-Template. Die Schritte 1–4 wurden in einer Programmschleife 25-35mal wiederholt.

PCR-Amplifikate wurden je nach Größe in 0,7–1,2% Agarosegelen analysiert. In Abhängigkeit von der weiteren Verwendung wurden die PCR-Produkte nach präparativer Elektrophorese aus dem Gel mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) extrahiert oder direkt aus den PCR-Ansätzen mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Boehringer Mannheim) gereinigt. Abweichend von den Protokollen der Hersteller wurden die PCR-Produkte generell mit 50 mM Tris pH 8,5 eluiert.

2.9.4 Klonierung von DNA-Fragmenten in Vektoren, Transformation in *E. coli* und Plasmidisolierung

DNA-Fragmente, die in den pUC18-Vektor eingesetzt werden sollten, wurden durch PCR mit Vent-Polymerase in 100 µl-Reaktionsansätzen synthetisiert und gereinigt. Vektor-DNA (4 µg) wurde mit 30 U SmaI (Roche) blunt-end geschnitten. Die linearisierte Plasmid-DNA wurde 20 min bei 65°C zur Deaktivierung des Restriktionsenzym inkubiert und anschließend mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) gereinigt. 25 ng Vektor-DNA und 50 ng PCR-Produkt wurden für die blunt-end Ligation eingesetzt. Die Ligation erfolgte mit dem Rapid DNA Ligation Kit (Roche) nach Vorschrift und wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft.

Transformationskompetente Zellen (*E. coli* DH5α) wurden nach der Vorschrift von Inoue¹⁴³ hergestellt. Dazu wurde *E. coli* DH5α in 100 ml SOB-Medium (Tab. 2-11, 13) bei 22,5°C bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 angezogen. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (< 2000 g, 4°C, 5 min). Das Zellpellet wurde in 30 ml TB-Puffer (Tab. 2-11, 15) resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und wieder zentrifugiert. Nach der Resuspension in 8 ml TB-Puffer wurde Dimethylsulfoxid (Sigma, Endkonzentration 7%) zugegeben, weitere 10 min auf Eis inkubiert und 200 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Vor der Transformation wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut.

10 µl des Ligationsansatzes wurden zu 200 µl kompetenten DH5α-Zellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock (42°C, 30 s) wurden die transformierten Zellen 3 min auf Eis gekühlt und nach der Zugabe von 800 µl SOC-Medium (Tab. 2-11, 14) 1 h bei 37°C inkubiert. Auf LB-Amp-X-Gal-Platten (Tab. 2-11, 10) wurden 10 – 200 µl Zellsuspension ausgestrichen und bei 37°C über Nacht bebrütet. Einzelne weiße Kolonien wurden von den Selektiv-Agarplatten gepickt, in 30 ml LB-Medium (Tab. 2-11, 9, 100 µg/ml

Ampicillin) überführt und über Nacht bei 37°C unter Selektionsdruck mit 120 Upm geschüttelt. Diese Übernachtskulturen wurden erneut ausplattiert.

Aus Übernachtskulturen wurde Plasmid-DNA mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, 3-4·10⁹ Zellen) oder präparativ mit dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen, 2-5·10¹¹ Zellen) gereinigt. Die Restriktionsanalyse der Plasmide wurde mit 10 U Restriktionsendonucleasen in den entsprechenden Reaktionspuffern in einem Gesamtvolumen von 50 µl nach Angaben der Hersteller durchgeführt und in Agarosegelen (1,2%) überprüft. Einige Plasmide wurden sequenziert.

2.9.5 Überexpression einer cDNA in *Pichia pastoris*

Durch BLAST-Suchen in der cDNA-Datenbank (Tsukuba, Japan) konnten einige Peptidsequenzen aus der *de-novo*-Sequenzierung von ESI-CID-Massenspektren einem cDNA-Klon (VFM264) zugeordnet werden. Die cDNA befindet sich zwischen den DraIII-Restriktionstellen der Multicloningsite des Ampicillin-resistenten Plasmidvektors pME18SFL3, der in *E. coli* DH10B transformiert vorlag. Die erhaltene Stockkultur wurde auf LB-Agarplatten (50 µg Ampicillin/ ml) ausgestrichen und Flüssigkulturen (LB-Medium, 50 µg Ampicillin/ ml) angeimpft. Die Plasmid-DNA wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) isoliert und sequenziert.

Das Gen wurde mit Hilfe des pPIC6α A Expressionsvektors (pPIC6α Starter Kit, Invitrogen) in das *Pichia pastoris* Genom integriert. Es wurde versucht, das sekretierte rekombinante Protein über den Polyhistidin-Tag nachzuweisen und zu reinigen. Dieser Versuch wurde nach den mitgelieferten Skripten der Firma Invitrogen durchgeführt (pPIC6α A, B, C: *Pichia* expression vectors for selection on blasticidin and purification of secreted recombinant proteins, instruction manual; EasySelect *Pichia* Expression Kit: A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ und pPICZα in *Pichia pastoris*; *Pichia* Expression Kit: A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*; Invitrogen, www.invitrogen.com). Als Kontrolle diente ein mitgeliefertes pPIC6α/HSA Plasmid.

2.9.5.1 Verwendete Lösungen und Medien

Lösung / Medium und Verwendung	Zusammensetzung
I. Lösungen und Medien zur Anzucht von <i>E. coli</i> und Selektion von Transformanten	
1. LB-Medium (Low salt) zur Anzucht von <i>E. coli</i>	Trypton (Roth) 10 g/l Hefeextrakt (ICN) 5 g/l NaCl 5 g/l pH 7,0, autoklavieren bei 120°C, 15 min
2. LB-Agar zur Anzucht von <i>E. coli</i> und Selektion von Transformanten	wie 2. zusätzlich 15 g Agar (Oxoid), autoklavieren bei 120°C, 15 min, nach dem Abkühlen Zugabe von Blasticidin (50 µg/ml)
3. Blasticidin-Stocklösung (Invitrogen)	10 mg/ml in Wasser
II. Lösungen für die Transformation von <i>Pichia pastoris</i> und die Selektion	
4. YPD-Medium	Trypton 20 g/l Hefeextrakt 10 g/l autoklavieren bei 120°C, 15 min, Zugabe von 100 ml/l 20% sterilfiltrierter Glucoselösung je nach Verwendung werden 300 µg/ml Blasticidin zugesetzt
5. YPDS-Agarplatten	Trypton 20 g/l Hefeextrakt 10 g/l Sorbitol 1 M Agar 20 g/l autoklavieren bei 120°C, 15 min, Zugabe von 100 ml/l 20% sterilfiltrierter Glucoselösung je nach Verwendung werden 300 µg/ml Blasticidin zugesetzt
6. Sorbitollösung	1 M
III. Puffer für die Isolierung genomischer DNA aus <i>Pichia pastoris</i>	
7. Sorbitolpuffer	Sorbitol 1 M Natriumcitrat 10 mM EDTA 10 mM Dithiotreitol 10 mM pH 7,5

IV. Medien und Lösungen zur Expression des rekombinanten Proteins

8. 500x Biotin (Sigma)	0,2% in Wasser sterilfiltriert
9. 10x YNB (Yeast Nitrogen Base)	YNB 17 g/ 500 ml (NH ₄) ₂ SO ₄ 50 g/ 500 ml sterilfiltriert
10. Kaliumphosphatpuffer	K ₂ HPO ₄ 1M 132 ml KH ₂ PO ₄ 1 M 868 ml pH 6,0 autoklavieren bei 120°C 15 min
11. BMGY	Trypton 20 g/l Hefeextrakt 10 g/l Autoklavieren bei 120 °C 20 min Nach dem Abkühlen Zugabe von 2 ml /l 500x Biotin, 100 ml/l 10 x YNB, 100 ml 10% Glycerin und 100 ml/l 1M Kaliumphosphatpuffer
12. BMMY	Wasser autoklavieren bei 120 °C 20 min Nach dem Abkühlen Zugabe von 2 ml /l 500x Biotin, 100 ml/l 10 x YNB und 100 ml/l 1 M Kaliumphosphatpuffer und 0,5% Methanol
13. Aufschlusspuffer für <i>Pichia pastoris</i>	Na ₃ PO ₄ 50 mM EDTA 1 mM Glycerin 5% pH 7,5 frisch hergestellt, unmittelbar vor Gebrauch wird PMSF (1 mM Endkonzentration) zugegeben
14. Phenylmethylsulfonylfluorid	100 mM in Ethanol

V. Lösungen für die Reinigung rekombinanter Proteine an Ni-Chelatsäulen

15. NaCl	600 mM pH 7,4
16. Waschpuffer	Na ₃ PO ₄ 20 mM NaCl 500 mM pH 7
17. Elutionspuffer	wie 16. mit 500 mM Imidazol

VI. Lösungen für Northern-Blots

(alle Lösungen wurden mit RNase-freiem Wasser hergestellt)

18. AE-Puffer	Natriumacetat EDTA (Sigma) pH 5,3 sterilfiltriert	50 mM 1 mM
19. Natriumacetat	3 M, pH 5,3 sterilfiltriert	
20. 10x Puffer für die Agarosegelelektrophorese	MOPS (Roth) Natriumacetat · H ₂ O (Merck) EDTA (Sigma) pH 7 mit NaOH, autoklavieren bei 120°C 15 min	200 mM 50 mM 10 mM
21. FA-Laufpuffer	Puffer (20.) Formaldehyd (Sigma)	1x 2,5 M
22. 5x RNA-Probenpuffer	Bromphenolblau (Biomol) EDTA (Sigma) Formaldehyd (Sigma) Glycerin (Roth) Formamid (Sigma) FA-Puffer in sterilem, RNase-freiem Wasser	0,25% 4 mM 0,9 M 20% 30,1% 4x
23. 20x SSC	NaCl Tri-Natriumcitrat pH 7	3 M 0,3 M
24. SDS	2%	
25. NaOH	0,05 M	
26. Hybridisierungspuffer	SSC Blockierungsreagenz N-Lauroyl-Sarcosin NaCl SDS Formamid Verwendung als Prähybridisierungslösung und Hybridisierungslösung nach Zugabe DIG-markierter Sonden	5x 2% 0,1% 0,1% 0,02% 50%
27. Maleinsäurepuffer	Maleinsäure (Sigma) NaCl pH 7,5 autoklavieren bei 120°C 15 min	0,1 M 0,15 M
28. Waschpuffer	wie 27. mit 0,3% Tween 20	
29. Blockierungslösung	10x Blockierungsstammlösung Maleinsäurepuffer	10 ml/100 ml 90 ml/100 ml
30. Detektionspuffer	Tris NaCl pH 9,5	0,1 M 0,1 M

Tab. 2-16: Puffer, Lösungen und Medien für die Überexpression in *P. pastoris*

RNase-freies Wasser wurde durch Zugabe von 0,1% Diethylpyrocarbonat hergestellt. Das Wasser wurde 24 h bei 37°C inkubiert und dann 15 min bei 120°C autoklaviert.

2.9.5.2 Konstruktion und Transformation der Vektoren in *Pichia pastoris*

Von der cDNA-Sequenz VFM264 wurden Primer vom 5'-Ende (CT15s: 5'-AAATAAAAATAGGTACCATGGTTCTTAGTAAACAAATTGTA-3') und 3'-Ende (CT16as: 5'-TTGATTTTATTTTATTTCCTAGATACAATTTTACCATCATTTT-3') abgeleitet. Dabei wurde das Startcodon des Gens beibehalten, während das Stopcodon ausgeschlossen wurde. Mit Hilfe der Primer wurden zwei neue Restriktionsschnittstellen (5'-Ende: KpnI; 3'-Ende: XbaI) generiert, um das Gen in der richtigen Orientierung in den Expressionsvektor einzusetzen. Von den im Kit enthaltenen Vektoren wurde der pPIC6 α A verwendet, so dass das rekombinante Protein das sekretorische Signal am N-terminalen Ende und den Polyhistidin-Tag am C-terminalen Ende besitzt. Die PCR wurde mit dem HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen) in 100 μ l-Ansätzen bei einer Annealing-Temperatur von 55°C in 30 Zyklen durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde gereinigt, mit KpnI und XbaI (Roche) geschnitten und nochmals gereinigt. Die Ligation des PCR-Produkts in den linearisierten pPIC6 α A-Vektor erfolgte mit dem Rapid DNA-Ligation Kit (Roche). 10 μ l des Ligationsansatzes wurden in *E. coli* DH5 α transformiert und die Transformanten auf LB-Agarplatten (Tab. 2-16, 2) mit geringer Salzkonzentration unter Selektionsdruck (50 μ g/ml Blasticidin, Invitrogen) ausgestrichen. Es wurden Klone gepickt, in LB-Medium (Tab. 2-16, 1) angezogen und Plasmid-DNA isoliert. Zur Kontrolle wurden die Plasmide mit KpnI/XbaI geschnitten. Nach präparativer Plasmidisolierung wurde die DNA (18 μ g) mit 25 U SacI (Roche, 1000 μ l Gesamtvolumen) linearisiert, aufkonzentriert (Microcon 100, Amicon) und gereinigt. Die Plasmid-DNA wurde gefriergetrocknet und in 10 μ l sterilem, bidestilliertem Wasser aufgenommen.

Pichia pastoris X33 wurde in YPD-Medium (Tab. 2-16, 4) nach Skript angezogen und für die Elektroporation präpariert. 80 μ l kompetente Zellen wurden mit 8 μ g linearisierter Vektor-DNA vermischt. Die Transformation erfolgte durch Elektroporation mit dem Genepulser (BioRad, 0,2 cm-Küvette, 1 μ F, 1kV) mit einem bzw. drei Pulsen. Nach der Inkubation bei 30°C wurden jeweils 50 und 200 μ l der Transformationsansätze auf YPDS-Agarplatten (Tab. 2-16, 5, 300 μ g/ml Blasticidin) ausgestrichen und 2 bis 3 Tage bei 30°C inkubiert. Es wurden 15 Klone gepickt und erneut auf YPDS-Agarplatten unter Selektionsdruck ausgestrichen.

Durch PCR von genomischer DNA der Transformanten und Einzell-PCR mit den Primerpaaren CT15s/ CT16as und 5'AOX1/ 3'AOX1 wurde überprüft, ob der Expressionsvektor in das Genom integriert wurde. Zur Isolierung von genomischer DNA aus *Pichia pastoris* wurden $1 \cdot 10^7$ Zellen bei 5000g 10 min zentrifugiert, in 800 μ l Sorbitolpuffer (Tab. 2-16, 7) resuspendiert und 2 h mit 300 U Lyticase (Sigma) bei 37°C inkubiert. Die Spheroplasten wurden durch Zentrifugation geerntet und DNA anschließend mit dem QIAmp Tissue Kit (Qiagen) isoliert. Für die Einzell-PCR wurden einzelne Klone von YPDS-Agarplatten gepickt, in 10 μ l Wasser resuspendiert, mit 25 U Lyticase 10 min bei 37°C inkubiert und dann in flüssigem Stickstoff 10 min tiefgefroren. 5 μ l des aufgetauten Lysats wurden mit den Primerpaaren CT15s/ CT16as oder 5'AOX1/ 3'AOX1 amplifiziert.

2.9.5.3 Methanolinduzierte Expression des rekombinanten Proteins

Die Expression rekombinanter Proteine in *Pichia pastoris* erfolgte nach dem EasySelect *Pichia* Expression Skript. Zur Kontrolle wurde die Mutante, die rekombinantes Humanserumalbumin sekretiert, und der Wildtyp X33 untersucht. 2 Klone, die das cDNA-Gen enthalten (CT3/ CT5), wurden kultiviert. Abweichend vom Skript wurden 500 μ l Vorkulturen (YPD-Medium mit 300 μ g/ ml Blasticidin) von YPDS-Agarplatten angesetzt und bei 30°C mit 220 Upm über Nacht geschüttelt. Mit diesen Kulturen ($OD_{600} = 2-6$) wurden 100 ml BMGY-Medium (Tab. 2-16, 11) angeimpft und über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden zentrifugiert (1500 g, 5 min) und in BMM-Medium (Tab. 2-16, 12) resuspendiert ($OD_{600} = 1$). Während der Expression wurden alle 24 h Proben genommen und Methanol (0,5% Endkonzentration) ergänzt. Von den Proben wurde die OD_{600} zur Wachstumskontrolle bestimmt. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -76°C aufbewahrt.

Der Überstand wurde durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Der immunochemische Nachweis des Polyhistidin-Tags der sekretierten rekombinanten Proteine erfolgte mit dem Penta-His Antikörper (Qiagen) und dem BM Chromogenic Western Blotting Kit (Roche; s. Kap. 2.5.4). Für diese Analysen wurde der Überstand direkt verwendet oder aufkonzentriert. Dazu wurde entweder Strataclean Harz (Stratagene, vor der SDS-PAGE) eingesetzt oder die Proben ultrafiltriert (Microcon YM 10 für Volumina bis 1 ml, Centriprep YM 10 für größere Volumina, Amicon).

Die Zellpellets wurden nach Skript in Aufschlusspuffer (Tab. 2-16, 13) resuspendiert und mit Glasperlen (Roth) aufgeschlossen. Die Überstände des Zellysats wurden nach Zentrifugation analog zu den Proben des Mediums analysiert.

Es wurde versucht, die rekombinanten Proteine über Nickel-beladene HiTrap Chelatsäulen (Pharmacia, 1 ml-Fertigsäulen) zu reinigen. Dazu wurden die Proben mit dem doppelten Volumen 600 mM NaCl versetzt, der pH auf 7,4 eingestellt und mit 1,5 ml/min auf die Säulen aufgetragen. Die Säulen wurden mit 10 ml Waschpuffer (Tab. 2-16, 16) gewaschen und das rekombinante Protein mit 5 ml Elutionspuffer (Tab. 2-16, 17) eluiert. Die Eluate wurden mit Centripreps aufkonzentriert und mit 50 mM HEPES pH 6,8 umgepuffert.

Alle Proben wurden nach der Inkubation mit 6-PP-InsP₅ durch HPLC-MDD-Analyse (Kap. 2.6.2) auf Aktivität der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase untersucht.

2.9.5.4 Northern-Blot-Analyse der *Pichia* Mutanten

Durch Northern-Blot-Analyse sollte die Transkription des Gens überprüft werden. Die Gesamt-RNA wurde aus *Pichia pastoris* nach einem Standardprotokoll (EasySelect *Pichia* Expression Handbuch) isoliert, in Formaldehyd-Agarosegelen (1,2%, Tab. 2-16, VI) getrennt und auf eine Nylonmembran (Schleicher & Schüll) transferiert. Dazu wurde das fertige Gel 10 min in RNase-freiem Wasser, 15 min in 0,05 M NaOH und anschließend 10 min in 10x SSC-Puffer inkubiert. Der Transfer erfolgte in 20 – 40 h in 20x SSC-Puffer. Die Membran wurde 1 min in 10x SSC-Puffer gewaschen und die RNA durch Erhitzen auf 80°C im Vakuum (2h) fixiert.

Für die Hybridisierung der mRNA wurden DIG-markierte DNA-Sonden mit dem PCR DIG-Probe Synthesis Kit (Roche) durch PCR von der cDNA synthetisiert (Primer CT 15s/CT16as, Annealing-Temperatur 50°C, 30 Zyklen). Zur Hybridisierung der mRNA mit den Sonden wurde das DIG-DNA Labelling Kit (Roche) verwendet. Die Membran wurde 3 h in einer Prähybridisierungslösung (Tab. 2-16, 26) bei 42°C inkubiert. Die Sonden wurden kurz vor Gebrauch 5 min auf 95°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und 1:1000 in Hybridisierungspuffer verdünnt. Der RNA-Blot wurde 36 h bei 42°C hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurde die Membran in mehreren Schritten gewaschen (Tab. 2-17). Die Detektion der Markierung erfolgte nach der Standardvorschrift. Der Blot wurde auf einem Hyperfilm βmax 17 bzw. 48 h exponiert.

Lösung	Bedingungen
2x SSC 0,1% SDS	zweimal 5 min bei Raumtemperatur
2x SSC 0,1% SDS	zweimal 15 min bei 42°C
1x SSC 0,1% SDS	10 min bei 42°C
1x SSC 0,1% SDS	10 min bei 42°C
0,5x SSC 0,1% SDS	10 min bei 65°C
0,1x SSC 0,1% SDS	10 min bei 65°C

Tab. 2-17: Protokoll der Waschschritte nach der Hybridisierung von mRNA

2.10 Experimente zu physiologischen Funktionen der PP-InsPs

2.10.1 Radioaktive Markierung von 5-PP-InsP₅ und 5,6-bis-PP-InsP₅ mit [γ -³²P]-ATP

In einem Gesamtvolumen von 10 ml wurden 30-40 mU einer 6-PP-InsP₅-(5)-Kinasepräparation (nach Ionenaustauschchromatographie) mit [γ -³²P]-ATP (Amersham, Redivue Code AA0018, Standard Code Pb 10218, 100 μ Ci) und InsP₆ oder 6-PP-InsP₅ (12 μ M, isoliert aus *D. discoideum*) über Nacht bei 20°C unter ATP-regenerierenden Bedingungen inkubiert (Tab. 2-18).

Komponente	Konzentration im Inkubationsansatz
ATP (Dinatriumsalz, Boehringer Mannheim)	100 μ M
[γ - ³² P]-ATP (Amersham, 100 μ Ci)	0,02 μ M
Creatinphosphat (Sigma)	200 μ M
Creatinphosphatkinase (Sigma)	2 U / ml
MgCl ₂ (Merck)	10 mM
6-PP-InsP ₅ -(5)-Kinase (aus <i>D. discoideum</i> angereichert)	6 - 10 mU/ml

Tab. 2-18: Inkubationsansatz für die radioaktive Markierung von PP-InsPs

Zur Isolierung der radioaktiv markierten Diphosphoinositolphosphate wurde der Inkubationsansatz auf eine mit 0,5 ml Q-Sepharose fast flow gefüllte Poly-Prep-Säule (Bio-Rad) aufgetragen. Nach dem Spülen mit 5 ml bidestilliertem Wasser wurde ATP mit 20 ml 200 mM NaCl eluiert. Im Anschluss wurden die radioaktiv markierten Diphosphoinositolphosphate mit einem Puls von 500 μ l 2 M NaCl und 1000 μ l bidestilliertem Wasser von der

Säule gelöst. Zur vollständigen Abtrennung von ATP wurde das Eluat 10 Minuten mit Aktivkohle (Sigma) inkubiert und die Aktivkohle durch Ultrafiltration (Micropure 0,22 µm, Amicon) entfernt. Die Markierung der Diphosphoinositolphosphate wurde durch Szintillationsmessung quantifiziert.

2.10.2 Präparation der Zellextrakte

2.10.2.1 Cytosolische und Membranextrakte

Für die nachfolgenden Markierungsversuche von Zellextrakten mit [β - 32 P-5]-PP-InsP₅ und [β - 32 P-5],6-bis-PP-InsP₄ wurden $2 \cdot 10^9$ Zellen aufgeschlossen. Die gewaschenen Zellen wurden in 20 ml Puffer (10 mM MgCl₂, 50 mM HEPES pH 6,8) aufgenommen und durch einen Membranfilter mit 5 µm Porengröße (Nucleopore PC-Membran) gepresst. Der cytosolische Extrakt wurde nach der Ultrazentrifugation (Beckmann Ultrazentrifuge L7-55, Rotor 70Ti, 45000 Upm, 20 min) aufbewahrt. Das Pellet wurde 2mal mit Aufschlusspuffer gewaschen und lieferte die Membranpräparation.

2.10.2.2 Kernfraktion und solubilisierte Membranproteine

$5 \cdot 10^9$ Zellen wurden nach dem Waschen in 100 ml Puffer (0,5 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂ in 50 mM HEPES pH 8,2) resuspendiert und durch einen Filter aufgeschlossen. Das Zellysate wurde zentrifugiert (3000 Upm, 20 min) und das Kernpellet 2mal gewaschen. Die vereinigten Überstände wurden erneut zentrifugiert (45000 Upm, 20 min). Nach der Resuspension des Membranpellets in 7,5 ml Puffer wurden Membranproteine entweder mit 10 mM EDTA oder mit 250 mM NaCl solubilisiert, zentrifugiert (45000 Upm, 20 min) und gewaschen. Die Überstände wurden entsalzt (Microcon YM 10, Amicon) und die Pellets in Aufschlusspuffer resuspendiert.

2.10.3 Phosphorylierung von Proteinen durch Diphosphoinositolphosphate

Für die Phosphorylierungsexperimente wurden die Zellextrakte (1 mg/ml Protein) mit Creatinphosphat (10 mM) und Creatinphosphatkinase (2 U/ml) 30 Minuten vorinkubiert, um sicherzustellen, dass in den Zellextrakten vorhandenes ADP zu ATP phosphoryliert wird. Die

Inkubationen erfolgten bei Raumtemperatur mit jeweils 275 μM $[\beta\text{-}^{32}\text{P}\text{-}5],6\text{-bis-PP-InsP}_4$ oder $[\beta\text{-}^{32}\text{P}\text{-}5]\text{-PP-InsP}_5$. Zur Kontrolle wurden die Zellextrakte unter den gleichen Bedingungen mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (275 μM) inkubiert. Als weitere Kontrolle wurde Rinderserumalbumin analog zu den Zellextrakten eingesetzt.

Untersucht wurden die Zeitabhängigkeit der Markierung, indem die Inkubationen mit $[\beta\text{-}^{32}\text{P}\text{-}5]\text{-PP-InsP}_5$, $[\beta\text{-}^{32}\text{P}\text{-}5],6\text{-bis-PP-InsP}_4$ bzw. $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ nach 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60 und 120 min durch Kochen der Proben mit SDS-Probenpuffer oder durch Zugabe von 10% Trichloressigsäure (Endkonzentration 3%) gestoppt wurden.

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Markierung von der eingesetzten Proteinkonzentration wurden 100, 200, 300, 400 und 500 μg cytosolische Proteine mit 10 μM isotopenmarkierten Diphosphoinositolphosphaten 10 min inkubiert. Die Proteine wurden mit TCA gefällt, abzentrifugiert und resuspendiert.

Proben wurden 10 min mit 16, 59, 97, 160 und 270 μM (nur InsP_8) isotopenmarkierten PP-InsPs inkubiert. Nach den Inkubationen wurden die Proteine durch Zugabe von TCA gefällt und zentrifugiert. Die Abhängigkeit der Proteinmarkierung von der Diphosphoinositolphosphatkonzentration wurde nur szintigraphisch analysiert.

Außerdem wurden vor allem die Membranfraktionen weiter vorbehandelt. Die Membranproteine wurden solubilisiert (1% SDS) oder denaturiert (95°C oder 1%SDS, 95°C). Des Weiteren wurde der Einfluss von Phosphataseinhibitoren (Phosphataseinhibitorcocktail I, Sigma) untersucht. Nach den Inkubationen wurden aus den Membranfraktionen die löslichen von den unlöslichen Proteinen durch Zentrifugation (3000 Upm, 3 min) getrennt und die Pellets resuspendiert. Zum Teil wurden Proteine durch Trichloressigsäure (3%) gefällt und vor der weiteren Analyse ebenfalls resuspendiert.

Die Phosphorylierung von Proteinen durch $[\beta\text{-}^{32}\text{P}\text{-}5],6\text{-bis-PP-InsP}_4$ oder $[\beta\text{-}^{32}\text{P}\text{-}5]\text{-PP-InsP}_5$ wurde durch Szintillationsmessung (Szintillationscocktail Quicksafe A, Zinsser) überprüft oder nach einer SDS-PAGE auf 12%igen Polyacrylamidgelen nachgewiesen. Die gefärbten und getrockneten Gele wurden auf einem Hyperfilm βmax bei -76°C exponiert. Nach 4 bis 8 Tagen wurden die Filme entwickelt.

2.11 Stoffwechsel von Diphosphoinositolphosphaten: Die Untersuchung anaboler und kataboler Enzymaktivitäten

2.11.1 Inkubationen von Zellextrakten

Zur Untersuchung des Stoffwechsels von Diphosphoinositolphosphaten in *Dictyostelium* wurden Zellextrakte mit den entsprechenden Substraten inkubiert. Zunächst wurden die partiell gereinigten Extrakte untersucht, die aus den einzelnen Schritten der InsP₇-Kinaseanreicherung erhalten wurden (Kap. 2.7). Des Weiteren wurden Zellen abweichend von diesem Vorgehen in 100 mM NaCl, 50 mM HEPES-Puffer pH 6,8 aufgenommen und mit dem Filter aufgeschlossen. Um störende Inositolphosphate, vor allem InsP₆, abzutrennen, wurden 300 µl der cytosolischen Fraktion durch Micropurefilter (Amicon, Porengröße 0,22 µm), die mit 100 µl Q-Sepharose gefüllt waren, zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0R, 5000 Upm, 3 min). Das Ionenaustauschermaterial wurde mit 200 µl Puffer gewaschen. Parallel wurden diese cytosolischen Extrakte über Q-Sepharose-Säulchen (2 ml) per Schwerkraft vorgereinigt. So erhaltene Proteingemische wurden mit Ammoniumsulfat oder Ethanol gefällt und in 50 mM HEPES-Puffer pH 6,8 resuspendiert.

Kerne von $8 \cdot 10^8$ Zellen wurden präpariert. Die Zellen wurden zweimal mit 17 mM Phosphatpuffer pH 6,5 gewaschen und in Lysispuffer II (1/10 des Ausgangsvolumens, Tab. 2-19) resuspendiert. Es wurde Nonidet P 40 zu einer Endkonzentration von 1% zugesetzt und das Zellysat bei 5000 Upm 5 min zentrifugiert. Nach der Resuspension des Pellets in Lysispuffer II wurden intakte Zellen (mikroskopische Kontrolle, Zentrifugation 1000 Upm, 5 min) entfernt. Kerne wurden durch Zentrifugation (6000 Upm, 5 min) geerntet, das Kernpellet mit Lysispuffer I (Tab. 2-19) gewaschen und in 2 ml 50 mM HEPES-Puffer pH 6,8 aufgenommen. Die Kerne wurden durch einen doppelten 3 µm-Filter (Nucleopore PC-Membran) aufgeschlossen, feste Bestandteile abzentrifugiert und der Überstand auf Enzymaktivitäten untersucht.

Lysispuffer I	Lysispuffer II
50 mM HEPES pH 7,5 (Roth)	50 mM HEPES pH 7,5 (Roth)
40 mM MgCl ₂ (Merck)	40 mM MgCl ₂ (Merck)
20 mM KCl (Merck)	20 mM KCl (Merck)
5% Sucrose	5% Sucrose
14 mM Mercaptoethanol (Sigma)	14 mM Mercaptoethanol (Sigma)
	10% Percoll (Roth)

Tab. 2-19: Zusammensetzung der Lysispuffer zur Isolierung von Zellkernen

Zur Bestimmung von katabolen Enzymaktivitäten ($\text{InsP}_x + \text{ADP} \rightarrow \text{InsP}_{x-1} + \text{ATP}$) wurden 100-500 μl Proben mit 6-8 μM InsP_6 , 5-PP- InsP_5 , 6-PP- InsP_5 , 5,6-bis-PP- InsP_4 oder 3,5-bis-PP- InsP_4 und der Testlösung „Dephosphorylierung“ (Tab. 2-20) bei 25°C inkubiert.

Komponente	Konzentration in der Testlösung
HEPES-Puffer pH 6,8 (Roth)	25 mM
MgCl ₂ (Merck)	10 mM
ADP pH6,8 (Dinatriumsalz, Boehringer Mannheim)	2 mM
Hexokinase (Sigma)	5 U/ml
Glucose (Merck)	1 mM

Tab. 2-20: Testlösung „Dephosphorylierung“

Zur Bestimmung von anabolen Enzymaktivitäten ($\text{InsP}_x + \text{ATP} \rightarrow \text{InsP}_{x+1} + \text{ADP}$) wurden die Proben mit 6-8 μM InsP_6 , 5-PP- InsP_5 oder 6-PP- InsP_5 und der Testlösung „Phosphorylierung“ (Tab. 2-9) bei 25°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff beendet und die Aktivitäten mit der HPLC-MDD-Analyse (Kap. 2.6.2) bestimmt.

2.11.2 Immunochemischer Nachweis von Proteinen mit einem Inositolhexakisphosphatkinase-Antikörper

InsP_6 -Kinasen bzw. Enzyme, die Homologien zu InsP_6 -Kinasen¹⁴⁴ zeigen, können immunochemisch mit einem kommerziell erhältlichen Inositolhexakisphosphatkinase-Antikörper⁷⁷ (Affinity Bioreagents) nachgewiesen werden. Cytosolische Zellextrakte (Rohextrakt, Eluate nach Ionenaustausch- und InsP_6 -Affinitätschromatographie, siehe Kap. 2.7)

wurden mit diesem Antikörper untersucht. Die Zellextrakte wurden mit Lysispuffer (8 M Harnstoff, 0,1 M NaH₂PO₄, 10 mM Tris) denaturiert. Native und denaturierte Zellextrakte (1–6 µl) wurden auf Nitrocellulosemembranen getüpfelt. Des Weiteren wurde ein Western-Blotting mit den Zellextrakten durchgeführt (Kap. 2.5.3). Als Kontrolle wurden Rohextrakte von Rattenhirn und –hoden⁷⁹ eingesetzt. Der immunochemische Nachweis erfolgte mit dem Inositolhexakisphosphatkinase-Antikörper (1:1000 / 1:2000 verdünnt in Blocking-Reagenz, siehe Kap. 2.5.4).

2.12 Simulationen zur Ermittlung von Molekülgeometrien von InsP₆, 6-PP-InsP₅ und 5,6-bis-PP-InsP₄

Molekülmechanische Simulationen wurden mit der AMBER-Methode durchgeführt. Als Startgeometrie wurden die von Cyclohexan bekannten und energetisch günstigen Sesselkonformationen gewählt. Weitergehend wurden diese Molekülgeometrien zunächst hinsichtlich der Ringkonformationen mit semi-empirischen Simulationen unter Verwendung von AM1- (Austin-Methode 1) und PM3-Kraftfeldern (Parametrische Methode 3), die in dem Programmpaket HyperChem 5.0 implementiert sind, durch Einzelpunktkalkulationen optimiert. Für 6-PP-InsP₅ wurden außerdem die Torsionen um die frei drehbaren O-P-Bindungen der Diphosphatgruppe in 6-Position bei der Konformationssuche berücksichtigt. Dabei wurden sequentiell in 10° Inkrementen die freien Energien der Konformere mit HyperSpin, einem Konformationsmodul von HyperChem, berechnet. Die dreidimensionale Darstellung der ermittelten Konformere erfolgte in einem Energieprofil mit Origin 6.0 (OriginLab).

Mit den so ermittelten Molekülgeometrien wurden für InsP₆, 6-PP-InsP₅ und 5,6-bis-PP-InsP₄ *ab-initio*-Optimierungen mit dem Programmpaket GAMESS¹⁴⁵ (US, PC-Unix-Version 3.7.2003 R1) sowohl im Vakuum wie auch in wässriger Umgebung auf einem Linux-Cluster (Suse Linux System, 4 x 2 Dualprozessoren á 2 GHz) durchgeführt. Dichtefunktionalrechnungen erfolgten mit der Hybriddichtefunktionalmethode B3LYP und dem Split-Valenz-Basissatz 6-311G. Die gewählten Parameter für die *ab-initio*-Simulationen sind in Tab. 2-21 zusammengestellt.

Parameter	
MAXIT = 60	60 SCF Iterationscyclen
NZVAR = 156 für IP ₆	gibt die Anzahl der Freiheitsgrade des Moleküls an (3N-6 mit N = Anzahl der Atome)
ICHARG = 0	keine Molekülladung
MULT = 1	Multiplizität des elektronischen Zustands (Singulett)
COORD = ZMTMPC	Molekülgeometrie wird im MOPAC-Format eingegeben
GBASIS = N311	Pople's „triple split“ N311G Basissatz
NGAUSS = 6	Anzahl der Gaußfunktionen
POLAR = PopN311	Exponent der Polarisationsfunktionen
DIRSCF	Nach jedem Schritt werden die Integrale direkt neu berechnet
DFTTYP = B3LYP	Hybridmethode, die 5 Funktionssysteme kombiniert (Becke, Slater, Hartree-Fock Elektronenaustauschfunktionen, LYP und VWN5 Korrelationen)
OPTTOL = 0,0005	Grenzwert der Energiedifferenzen zwischen zwei Iterationszyklen, bei dessen Erreichen der Simulationsprozess beendet wird
Zusätzliche Parameter für die Simulationen in Wasser	
PCM	Integralformalismus, der die Effekte des Lösungsmittels berücksichtigt
ICAV = 1	Berechnung der Kavitationsenergie nach Pierotti und Claverie
IDISP = 1	Berechnung der Dispersions- und Abstoßungsenergien nach Floris und Tomasi
IFIELD = 1	Berechnung des elektrischen Potentials und des elektrischen Feldes, das durch die Oberflächenladung der Kerne generiert wird
SOLVNT = Water	Berechnungen in wässriger Umgebung

Tab. 2-21: Parameter für die *ab-initio*-Molekülsimulationen mit GAMESS

Verwendete Abkürzungen: SCF Self Consistent Field; DFT Density Function Theory; PCM Polarizable Continuum Method

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Präparative Isolierung von Diphosphoinositolphosphaten aus *Dictyostelium discoideum* und *Polysphondylium pallidum*

6-PP-InsP₅ (InsP₇), 5,6-bis-PP-InsP₄ (InsP₈) und 3,5-bis-PP-InsP₄ wurden für die Untersuchung der Enzymaktivität der 6-PP-InsP₅(5)-Kinase und weiteren Enzymen, die möglicherweise am Stoffwechsel der Diphosphoinositolphosphate beteiligt sind, sowie für die Synthesen von [β -³²P-5]-PP-InsP₅ und [β -³²P-5],6-bis-PP-InsP₄ benötigt. Sie wurden aus *Dictyostelium discoideum* und *Polysphondylium pallidum* isoliert.

Diphosphoinositolphosphate werden in der spätexponentiellen und stationären Wachstumsphase in *Dictyosteliden* angereichert⁶³. Da große Substanzmengen der hochphosphorylierten Inositolphosphate benötigt wurden, wurden *Dictyostelium*-Zellen bei einer Zelldichte von $1\text{-}2\cdot 10^7$ Zellen/ml geerntet. Mikrozysten von *Polysphondylium* wurden zur Isolierung von 3,5-bis-PP-InsP₄ geerntet. Die Isolierung erfolgte dann in mehreren Schritten. Die Mikrozysten von *P. pallidum* ließen sich im Gegensatz zu Zellen von *D. discoideum* mit 2 M Perchlorsäure schwieriger aufschließen. Erst nach dem Einsatz von 6 M Perchlorsäure waren nach mikroskopischer Kontrolle nur noch wenige intakte Mikrozysten zu erkennen.

InsP₆ und Diphosphoinositolphosphate wurden aus *D. discoideum* mit einer Ausbeute von 70-85% und einer Reinheit von 90-95% (Tab. 3-1) erhalten. 3,5-bis-PP-InsP₄ wurde aus *P. pallidum* mit einer Reinheit von 95% isoliert. Die Ausbeute betrug 65%.

InsP _x	isolierte Menge ^(a)	Ausbeute ^(a) [%]	Reinheit ^(a) [%]
InsP ₆ ^(b)	31,3 ± 2,0 μmol	82 ± 3	
InsP ₇ ^(b)	12,5 ± 0,3 μmol	74 ± 4	94 ± 2
5,6-bis-PP-InsP ₄ ^(b)	18,9 ± 0,8 μmol	76 ± 6	92 ± 3
3,5-bis-PP-InsP ₄ ^(c)	0,9 μmol	75	95

Tab. 3-1: Isolierte Inositolphosphate aus *D. discoideum* und *P. pallidum*

a: berechnet aus HPLC-Chromatogrammen; b: isoliert aus insgesamt ca. $2\cdot 10^{11}$ Zellen von *Dictyostelium* (500 g Feuchtgewicht); c: isoliert aus ca. $1,5\cdot 10^{11}$ Mikrozysten von *Polysphondylium* (60 g Feuchtgewicht); Die Werte ergeben sich als Mittelwert ± Standardabweichung aus 4 getrennten Aufarbeitungen außer 3,5-bis-PP-InsP₄.

3.2 Anreicherung der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase

Aus Zellen von *Dictyostelium discoideum* AX2 wurde bereits ein Enzym angereichert und charakterisiert, das am Stoffwechsel von InsP₇ und InsP₈ beteiligt ist. Dieses Enzym katalysiert Mg²⁺-abhängig unter Beteiligung von ATP die Phosphorylierung von 6-PP-InsP₅ zu 5,6-bis-PP-InsP₄ (Abb. 3-1).

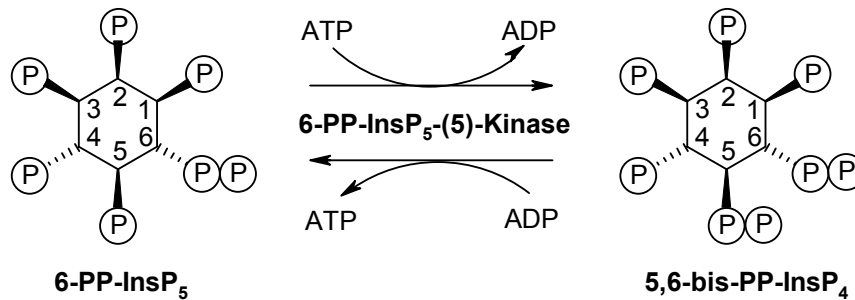


Abb. 3-1: Die durch die 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase katalysierte Reaktion

Das Enzym wird aufgrund seiner katalytischen Aktivität als „6-PP-InsP₅-(5)-Kinase“ bezeichnet. 5,6-bis-PP-InsP₄ und ATP besitzen sehr ähnliche Phosphatgruppenübertragungspotentiale ($\Delta G_{\text{Hydrolyse}} = -32,2 \text{ kJ mol}^{-1}$), deshalb ist die Reaktion mit einer Gleichgewichtskonstante von $0,51 \pm 0,05$ frei reversibel⁶. In Tabelle 3-2 sind die bekannten Charakteristika der InsP₇-Kinase zusammengestellt.

Aus cytosolischen Extrakten von *D. discoideum* wurde die 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase durch Ionenaustauschchromatographie und anschließende Affinitätschromatographie an dem InsP₆-Gel 10.000fach mit einer Ausbeute von 30% angereichert. Diese Methode der Anreicherung war bereits etabliert und die einzelnen Anreicherungsschritte wurden dokumentiert^{4-6,127}.

Zellen von *Dictyostelium discoideum* enthalten ca. 10.000 Kopien der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase pro Zelle⁶. Sie gehört somit zu den „seltenen“ Enzymen in diesem Organismus. Selbst bei der Aufarbeitung von $2 \cdot 10^{10}$ Zellen können maximal 0,5-1 μg (geschätzt) der Kinase isoliert werden. Berücksichtigt man die Ausbeuteschwankungen, so wird deutlich, dass die Proteinmenge das größte Problem für die weitere Charakterisierung des Enzyms darstellt.

Die InsP₇-Kinase wurde durch Chromatographie an Hydroxylapatit vor der Affinitätschromatographie weitgehend homogen erhalten⁶. Dieser zusätzliche Reinigungsschritt ist jedoch mit sehr großen Ausbeuteverlusten (Ausbeute < 3%) verbunden.

Allgemeine Eigenschaften	
Molekulargewicht	40 ± 2 kDa
pH-Optimum	7,25 ± 0,75
Isoelektrischer Punkt	8,15 ± 0,05
K_M [μM]	
6-PP-InsP ₅	0,34 ± 0,08
5,6-PP-InsP ₄	0,42 ± 0,06
InsP ₆	3,7 ± 0,5
ATP	12,0 ± 2,2
ADP	2,6 ± 0,6
V_{max} [U/mg]	
Phosphorylierung: 6-PP-InsP ₅ → 5,6-PP-InsP ₄	5,2 ± 2,2
Dephosphorylierung: 5,6-PP-InsP ₄ → 6-PP-InsP ₅	1,3 ± 0,7
Phosphorylierung: InsP ₆ → 5-PP-InsP ₅	0,2 ± 0,1
Wechselzahlen [s⁻¹]	
Phosphorylierung: 6-PP-InsP ₅ → 5,6-PP-InsP ₄	3,5 ± 1,5
Dephosphorylierung: 5,6-PP-InsP ₄ → 6-PP-InsP ₅	0,9 ± 0,5
Phosphorylierung: InsP ₆ → 5-PP-InsP ₅	0,15 ± 0,05
K_i [μM]	
5,6-PP-InsP ₄ (Phosphorylierungsreaktion)	0,54 ± 0,15
5-PP-InsP ₅ (Phosphorylierungsreaktion)	0,43 ± 0,05
InsP ₆ (Phosphorylierungsreaktion)	8,10 ± 2,30
6-PP-InsP ₅ (Dephosphorylierungsreaktion)	0,28 ± 0,07
5-PP-InsP ₅ (Dephosphorylierungsreaktion)	0,51 ± 0,08
InsP ₆ (Dephosphorylierungsreaktion)	2,39 ± 0,80

Tab. 3-2: Eigenschaften der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase⁶

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase gereinigt, um ausreichendes Material für Proteinsequenzierungen und die Synthese von isotopenmarkierten Diphosphoinositolphosphaten zu erhalten. Dabei wurde durch Variationen des Anreicherungsverfahrens versucht, die Ausbeute des Enzyms zu erhöhen und das Enzym bis zur Homogenität anzureichern.

3.2.1 Zellaufschluss

In axenischem Medium angezogene Zellen von *Dictyostelium discoideum* wurden bei einer Zelldichte von $6 \cdot 10^6$ Zellen/ml geerntet. Die Lyse von $1 \cdot 3 \cdot 10^{10}$ Zellen durch

Membranfiltration hat sich als optimale Aufschlussmethode bewährt. Der Gefrierenaufschluss, bei dem Zellen eingefroren und wieder aufgetaut werden, führt zum Verlust der Enzymaktivität. Dieser Verlust lässt sich auf den physikalischen Prozess des Einfrierens zurückführen, bei dem die Proteinkonformation wahrscheinlich durch Eiskristalle zerstört wird. Die Lyse durch Zugabe von Triton X100 führt ebenfalls zum Verlust der Enzymaktivität. In diesem Fall verursacht vermutlich die Zerstörung von Zellorganellen die Freisetzung von Proteasen, die das Enzym abbauen.

Die Ausbeute konnte durch den Zusatz von Proteaseinhibitoren (Phenylmethylsulfonylfluorid, E64) nicht wesentlich gesteigert werden⁶. Auch die Verwendung des Proteaseinhibitorcocktails I während der Membranfiltration führte zu keiner höheren Ausbeute. Bei der Membranfiltration bleiben offensichtlich Protease enthaltende Zellorganellen weitgehend intakt und können durch Ultrazentrifugation vom Cytosol getrennt werden. Durch diesen schonenden Zellaufschluss werden Verluste der Enzymaktivität minimiert.

Der Nachweis der Enzymaktivität erfolgte durch die HPLC-MDD-Analyse. Mit dieser Methode lassen sich Edukt- und Produktkonzentration exakt quantifizieren. Durch die Wahl der Inkubationsbedingungen kann aufgrund der freien Reversibilität der Kinasereaktion die Phosphorylierungs- oder Dephosphorylierungsreaktion forciert werden. Aus der Konzentrationszunahme des Produkts der Kinasereaktion in Abhängigkeit von der Reaktionszeit wurde die Enzymaktivität berechnet. Die Nachteile dieser Analysemethode sind der zeitliche Aufwand und die diskontinuierliche Messung der Enzymkinetik. Die Reaktion muss für die HPLC-Analyse zu verschiedenen Zeitpunkten gestoppt werden. Daraus ergibt sich ein höherer Verbrauch des Enzyms und der Substrate, die immer aus *D. discoideum* isoliert werden müssen.

3.2.2 Ionenaustauschchromatographie

Für die ersten Reinigungsschritte wurden Anionenaustauschchromatographie und Kationenaustauschchromatographie miteinander kombiniert. Der cytosolische Extrakt wurde auf eine Anionenaustauschersäule aufgetragen. Q-Sepharose retardierte die 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase bei pH 6,8 nicht, bindet aber einen großen Teil der Begleitproteine. Die Verbindung beider Säulen erlaubt die direkte Auftragung des Durchlaufes von der Q-Sepharose auf die Kationenaustauschersäule. Hier wird die 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase adsorbiert. Nach der

Trennung beider Säulen kann die Kinase durch einen NaCl-Gradienten eluiert werden. Die meisten von der SP-Sepharose retardierten Proteine werden im Bereich von 20-70 mM NaCl eluiert. Fraktionen mit hoher 6-PP-InsP₅-(5)-Kinaseaktivität werden erst zwischen 70 und 110 mM NaCl eluiert. Zur schnellen qualitativen Aktivitätsbestimmung von Fraktionen der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase während der Anreicherung wurde der enzymatisch gekoppelte Farbstest eingesetzt.

3.2.3 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie ist eine sehr effiziente Methode zur Reinigung von Enzymen. Als Materialien werden Substanzen verwendet, die hohe Affinitäten zu dem zu reinigenden Enzym aufweisen. Das können Inhibitoren sein, die vom Enzym selbst nicht umgesetzt werden, sowie Substrate oder Substratanaloga, die leicht regenerierbar sind und spezifisch binden.

3.2.3.1 InsP₆-Affinitätschromatographie

InsP₆ ist ein kompetitiver Inhibitor der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase mit einer relativ kleinen Inhibitorkonstante von 8 μM⁶. Das von der Arbeitsgruppe Prestwich (Department of Medicinal Chemistry, University of Utah, USA) synthetisierte InsP₆-Gel (Abb. 3-2) besteht aus einer Agarosematrix (Affigel 10, BioRad), an der InsP₆ über einen „C₆-Spacer“ und die Phosphatgruppe in 2-Position gebunden ist.

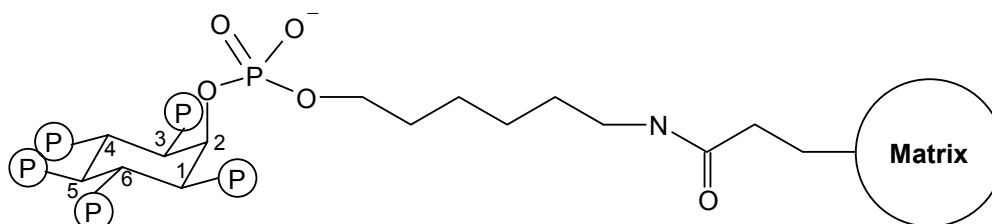


Abb. 3-2: InsP₆-Affinitätsgel zur Anreicherung der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase

Neben der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase werden auch einige andere Proteine von dem InsP₆-Affinitätsgel eluiert. Dieses Affinitätsmaterial ist in Bezug auf die Anreicherung der InsP₇-Kinase offensichtlich nicht ideal. Außerdem stand es nicht in gleichbleibender Qualität und

ausreichender Menge zur Verfügung, da die Synthese sehr aufwändig ist. Deshalb wurde nach anderen Affinitätsmaterialien gesucht.

Die Affinitätschromatographie an 5'-AMP-Sepharose, ADP-Agarose und ATP-Agarose führte nicht zu einer spezifischen Bindung der InsP₇-Kinase¹²⁷, obwohl die gebundenen Liganden Cosubstrate der Kinase mit niedrigen K_M-Werten bzw. ein Cosubstratanalogon (AMP) sind. Bei der ADP- und ATP-Agarose sind die Liganden über die Purinbase an die Matrix gebunden. Das Verhalten der Kinase gegenüber diesen Affinitätsmaterialien kann das von Laussmann postulierte Modell des aktiven Enzymzentrums (Abb. 3-3) stützen. Die Bindung der Cosubstrate erfolgt vermutlich über Adenosin, so dass die Di- bzw. Triphosphatgruppe der Cosubstrate in räumliche Nähe zum Substrat gebracht werden kann.

Da die Cosubstrate augenscheinlich nicht als potentielle Affinitätsliganden in Frage kommen, wurden Substratanaloga gesucht. In dem Arbeitskreis Altenbach (Organische Chemie, Bergische Universität Wuppertal) wurde N-Acylamino-InsP₅ synthetisiert. Die NMR-Spektren des mit HPLC-MDD gereinigten und analysierten Reaktionsproduktes zeigten, dass zu über 90% die 6-Position des *myo*-Inositolrings derivatisiert ist. Da die Phosphatgruppe in 6-Position essentiell für die Bindung des Enzyms ist und eine Inhibierung der InsP₇-Kinase durch das Derivat ebenfalls nicht festgestellt werden konnte, ist dieses InsP₅-Derivat als Affinitätsligand für die Kinaseanreicherung ungeeignet.

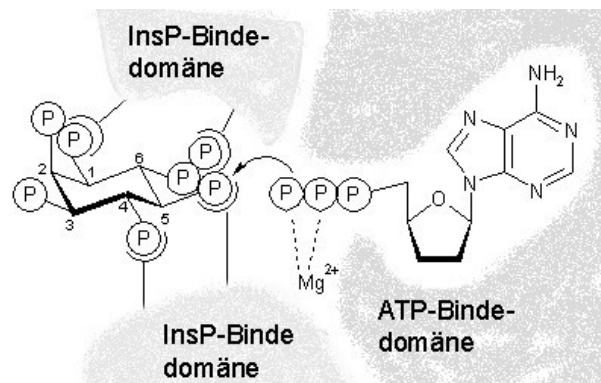


Abb. 3-3: Modell des aktiven Zentrums der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase nach Laussmann⁶
Nach diesem Modell bindet zunächst das Cosubstrat an das Enzym.

3.2.3.2 InsP_7 als potentieller Affinitätsligand für die 6-PP- InsP_5 -(5)-Kinase

Die InsP_7 -Kinase wird durch 5-PP- InsP_5 sowohl in Phosphorylierungsrichtung wie auch in Dephosphorylierungsrichtung inhibiert. Gleichzeitig ist dieser Metabolit auch Substrat der InsP_7 -Kinase. Von der Arbeitsgruppe Falck (Department of Biochemistry, UT Southwestern Medical Center, Dallas, USA) wurde ein 5-PP- InsP_5 -Derivat (Abb. 3-4) synthetisiert, das potentiell als Affinitätsligand zur effektiven Reinigung des Enzyms in Frage kommt.

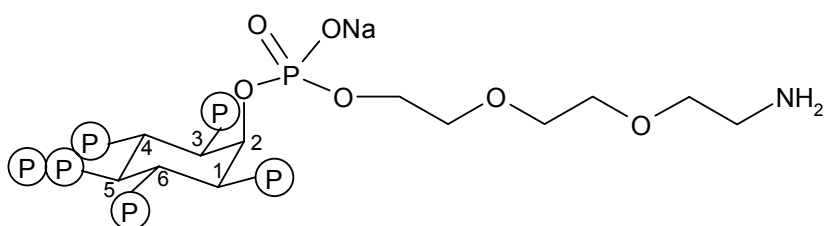


Abb. 3-4: InsP_7 -Derivat als potentieller Ligand zur Affinitätschromatographie

Dieses Derivat ist über die Phosphatgruppe in 2-Position mit einem hydrophilen Ether verestert und besitzt eine primäre Aminogruppe, welche die Anbindung an eine aktivierte Affinitätsmatrix erlaubt. Das synthetisierte Affinitätsmaterial wurde zur Anreicherung der InsP_7 -Kinase eingesetzt. Es konnte keine spezifische Bindung des Enzyms festgestellt werden. Die aufgetragene Kinaseaktivität wurde im Durchlauf und während des Spülens der Säule vollständig wiedergefunden.

Die Ursache für dieses Verhalten der Kinase kann zum einen in dem Liganden und zum anderen im synthetisierten Affinitätsmaterial selbst liegen. Bisher konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob 5-PP- InsP_5 kompetitiv im aktiven Zentrum das Enzym inhibiert. Erfolgt die Inhibierung über einen anderen Mechanismus, so kann dieses Derivat nicht zur Affinitätschromatographie eingesetzt werden. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die Ursache im Affinitätsmaterial selbst liegt. Es standen nur geringe Mengen des InsP_7 -Derivats zur Verfügung, so dass der Kopplungsversuch nicht wiederholt und der Erfolg der Kopplung nicht weiter untersucht werden konnte. Obwohl der Ligand unter den Kopplungsbedingungen stabil ist, ist nicht auszuschließen, dass die NHS-Estergruppen der Matrix vor allem bei der langen Inkubationszeit und höheren pH-Werten hydrolysieren und damit eine effiziente Kopplung nicht mehr möglich ist. Selbst bei 100%iger Anbindung des Liganden können

maximal 5–10% der Bindestellen der Matrix mit dem Liganden besetzt sein, so dass die Effizienz des Materials zur Reinigung der InsP₇-Kinase sehr fraglich bleibt.

3.2.4 Zusammenfassung der Anreicherung der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase

Die etablierten Reinigungsschritte sind in der Tabelle 3-3 wiedergegeben.

Reinigungs- schritt	Proteinmenge [µg]*	Gesamt- aktivität [mU]*	Spezifische Aktivität [mU/mg]	Ausbeute [%]	Anreicherungs- faktor
Cytosol	453.000 ± 77.000	9,7 ± 1,2	0,03 ± 0,01		
Ionenaustausch	3.430 ± 840	3,79 ± 0,62	1,47 ± 0,29	39 ± 6	49 ± 10
Affinität	38 ± 12	2,96 ± 1,07	202,6 ± 14,7	30 ± 11	7.300 ± 2.300
Hydroxylapatit Affinität^(a)	0,2	0,2	1000	< 3	50.000

Tab. 3-3: Zusammenfassung der Reinigungsschritte der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase

Als Ausgangsmaterial wurden $1 \cdot 10^{10}$ axenisch gewachsene Zellen von *Dictyostelium discoideum* AX2 bei einer Zelldichte von $6 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingesetzt. * bezogen auf 10^{10} Zellen; Fehler: Standardabweichung der Mittelwerte aus mindestens 5 voneinander unabhängigen Enzymanreicherungen. 1 mU der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase phosphoryliert 1 nmol InsP₇ bei pH 6,8 und 25°C pro Minute. **a** Werte für die Anreicherung der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase durch Chromatographie an Hydroxylapatit vor der InsP₆-Affinitätschromatographie entnommen aus 6; Werte für die Proteinmenge, die spezifische Aktivität, Ausbeute und Anreicherungsfaktor sind aufgrund der geringen Proteinmenge geschätzt.

Bei den präparativen Aufarbeitungen traten starke Schwankungen bezüglich der Proteinmenge und der Enzymaktivität auf. Diese Schwankungen korrelieren nicht mit den Zelldichten und der aufgeschlossenen Gesamtzellzahl. Sie scheinen jedoch in Zusammenhang mit der Qualität der Medienchargen zu stehen. Des Weiteren sind die Schwankungen auch auf die sehr geringen Mengen der InsP₇-Kinase und die geringe Gesamtproteinkonzentration vor allem nach den ersten Anreicherungsschritten zurückzuführen. Ein weiterer Aspekt ergab sich aus einer Randbeobachtung. Bei dem Aufschluss kleinerer Zellmengen wurden bedeutend höhere Enzymaktivitäten in den Rohextrakten nachgewiesen. Dies ist zum einen dadurch bedingt, dass sich geringere Zellmengen bedeutend schneller aufschließen lassen. Zum anderen wird die Kinase schon durch geringe Substrat- und Produktkonzentrationen inhibiert. In den Rohextrakten reichen die vorhandenen Konzentrationen der hochphosphorylierten Inositolphosphate zumindest für eine teilweise Enzyminhibierung aus. Somit entsprechen die Enzymaktivitäten, die mittels HPLC-MDD-Analysen in Rohextrakten quantifiziert wurden,

nicht der tatsächlichen Aktivität der InsP₇-Kinase. Schwankungen der Enzymaktivität in Rohextrakten sind demzufolge auch auf Schwankungen der Diphosphoinositolphosphatkonzentrationen zurückzuführen.

Durch Veränderungen der Reinigungsschritte konnte keine effizientere Anreicherung der InsP₇-Kinase erzielt werden. Die spezifische Bindung der Kinase an andere Affinitätsmaterialien wurde bei keinem eingesetzten Material festgestellt.

Gerade für die Sequenzierung der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase durch Massenspektrometrie ist die Proteinmenge der limitierende Faktor. Es wurde versucht, eine ausreichende Menge des bis zur Homogenität gereinigten Enzyms zu erhalten. Dazu wurden mehrere aktive Enzympräparationen nach der Ionenaustauschchromatographie vereinigt und durch Chromatographie an Hydroxylapatit sowie anschließende Affinitätschromatographie an InsP₆-Gel gereinigt. Die Ausbeuteverluste durch diese beiden Reinigungsschritte waren jedoch so groß, dass die erhaltene Proteinmenge nicht für die Sequenzierung ausreichte. Zusätzlich wurde versucht, vereinigte Enzympräparationen nach der InsP₆-Affinitätschromatographie durch Chromatographie an Hydroxylapatit zur Homogenität zu reinigen und gleichzeitig eine größere Proteinmenge zu erhalten. Nach diesen Reinigungsschritten konnte keine Enzymaktivität mehr nachgewiesen werden. Die sehr geringe Konzentration der angereicherten InsP₇-Kinase bedingt vermutlich Verluste durch Adsorptionen an Gefäßwänden und führt gleichzeitig zu einer größeren Instabilität des Enzyms.

3.3 Sequenzierung der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase mit Matrix Assisted Laser Desorption Massenspektrometrie (MALDI-MS) und Edmanabbau

Für die Sequenzierung der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase mittels Massenspektrometrie sollte eine Proteinmenge ausreichen, die in SDS-Polyacrylamidgelen eine Coomassie gefärbte Bande ergibt. Die zur Homogenität gereinigte InsP₇-Kinase konnte nicht in ausreichender Menge erhalten werden. Das Enzym ist jedoch nach der InsP₆-Affinitätschromatographie elektrophoretisch gut von den Begleitproteinen separierbar. Außerdem wurde aufgrund einer 2D-SDS-PAGE⁶ angenommen, dass die 40 kDa-Bande der Kinase homogen ist. Deshalb wurde die partiell gereinigte 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase für die Ermittlung ihrer Primärstruktur verwendet (Abb. 3-5).

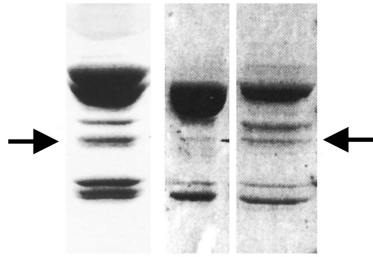


Abb. 3-5: Elektropherogramme der partiell angereicherten 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase
Bei allen drei Enzympräparationen ist die Kinase als Coomassie gefärbte Proteinbande nach der SDS-PAGE erkennbar.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Dr. H. E. Meyer (Ruhruniversität Bochum) wurde bereits während meiner Diplomarbeit die tryptisch verdaute InsP₇-Kinase mittels MALDI-MS analysiert und einzelne Peptide mit MALDI-MS/MS und Edmanabbau sequenziert. Aufgrund ihres leicht basischen isoelektrischen Punktes enthält die InsP₇-Kinase viele Lysin- und Argininreste, die von Trypsin angegriffen werden. Durch den Verdau mit dieser Serinprotease entstehen eher kleine Peptide mit ungefähr 10 Aminosäuren. Der MALDI-Massenfingerprint, d. h. der Satz von Peptiden, der durch die proteolytische Spaltung aus der Kinase entsteht, bestätigte diese Erwartung. Die Fingerprints von drei verschiedenen InsP₇-Kinasepräparationen zeigten ein charakteristisches Peptidmuster.

Die Massenspektrometrie in Kombination mit Datenbankrecherchen ist heute die Methode der Wahl zur Identifizierung von Proteinen. Die manuelle Auswertung von Massenspektren ist schwierig und zeitaufwändig. Hersteller von MS-Geräten stellen Soft- und Hardware zur automatisierten Datenauswertung zur Verfügung. Der Massenfingerprint kann zur Identifizierung bereits sequenzierter Proteine verwendet werden. Dazu wird das charakteristische Peptidmuster eines Proteins über spezielle Algorithmen mit Sequenzdatenbanken abgeglichen und kann so zur Proteinidentifizierung herangezogen werden. In der Regel reicht ein Datensatz von 12-15 Peptidmassen für eine eindeutige Identifizierung aus. Der Erfolg dieser automatisierten Datenbankrecherchen ist jedoch auch davon abhängig, ob das Genom eines Organismus vollständig sequenziert ist und alle Daten in den entsprechenden Datenbanken vorliegen. Auf der Basis der Massenfingerprints konnte die InsP₇-Kinase nicht identifiziert werden. Zum Zeitpunkt der MS-Analysen waren weder das Genom von *Dictyostelium discoideum* vollständig sequenziert, noch die vorhandenen Daten in allen Datenbanken verfügbar (s. auch Kap. 1.6). Auch Homologien zu bereits bekannten Proteinen wurden nicht gefunden.

Die tryptischen Peptide wurden chromatographisch getrennt und einzelne Peptide zum einen mittels MALDI-MS/MS und zum anderen durch Edmanabbau sequenziert. Nur homogene Peptide können durch Edmanabbau sequenziert werden. Aus der Sequenzierung

von Peptiden, deren Homogenität durch MALDI-MS und ihre UV-Absorption bei 213 nm überprüft wurde, resultierten die 3 kurzen Aminosäuresequenzen LYPSNM, DFFENNPDYR und LIDFTHTK. Der Edmanabbau eines weiteren Peptids zeigte, dass die InsP₇-Kinase wahrscheinlich N-terminal blockiert ist. Datenbankrecherchen mit den ermittelten Peptidsequenzen ergaben keine Übereinstimmungen zu bereits bekannten Proteinen oder Gensequenzen.

3.3.1 Versuch der Identifizierung des Gens der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase über die Peptidsequenzen DFFENNPDYR und LIDFTHTK

Durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) können spezifische DNA-Fragmente amplifiziert werden. Mit Hilfe der ermittelten Peptidsequenzen wurde versucht, das Gen der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase zu identifizieren. Ausgehend von Aminosäuresequenzen können nur degenerierte Primer für die PCR konstruiert werden, die eine spezifische Amplifikation erschweren. Deshalb mussten zunächst molekularbiologische Standardmethoden wie die DNA-Isolierung und die PCR für den sehr AT-reichen Organismus *D. discoideum* optimiert werden.

3.3.1.1 Isolierung von genomischer DNA aus *Dictyostelium discoideum*

Dictyostelium enthält in der exponentiellen Wachstumsphase ca. 5 µg DNA pro 1·10⁷ Zellen¹⁴⁶. Neben der DNA enthalten die Zellen je nach Wachstumsphase und Zelldichte unterschiedlich hohe RNA-Konzentrationen. Hohe Polysaccharidkonzentrationen und die RNA-Konzentration sind bei der Isolierung genomischer DNA aus *D. discoideum* problematisch. Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten insbesondere mit degenerierten Primern spielt die Qualität der Template-DNA eine entscheidende Rolle. Standardmäßig werden heute kommerziell erhältliche Fertigungskits zur DNA-Isolierung eingesetzt. Diese bieten gegenüber den klassischen Methoden den Vorteil, dass innerhalb kurzer Zeit sehr saubere DNA isoliert und gleichzeitig der Umgang mit Phenol und Chloroform vermieden werden kann.

Mit einem Fertigungskit, das für die Isolierung von genomischer DNA aus Zellkulturen geeignet ist, werden die Zellen zunächst lysiert. Nach dem Proteinabbau durch die Proteinase K erfolgt dann die Isolierung der DNA aus dem Zellysate durch Bindung an Anionenaustauschersäulen. In Gegenwart eines chaotropen Salzes bindet DNA aufgrund ihrer hohen

Ladung selektiv an die hier verwendete Silicagelmembran. Unabhängig von der Ausgangszellmenge und der Lysiszeit wurden 0,2–0,5 µg DNA mit hoher Reinheit aus *Dictyostelium* isoliert. Die geringe Ausbeute von 4–10% ist vermutlich auf die Anwesenheit größerer Polysaccharidmengen zurückzuführen. Die Polysaccharide können die Bindungsstellen der Membran besetzen, so dass eine effiziente Bindung der DNA nicht mehr möglich ist.

Da bei der Isolierung von DNA aus *Dictyostelium* mit diesem Fertigkit offensichtlich die Polysaccharidkonzentration zu erheblichen Ausbeuteverlusten führt, wurde genomische DNA auf dem klassischen Weg isoliert. Nach den klassischen Methoden werden zunächst Zellkerne isoliert. Die DNA wird anschließend durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln gereinigt und mit Ethanol gefällt. Auch aus Zellkernlysaten konnte durch Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließende Ethanolpräzipitation nur sehr wenig DNA isoliert werden. Die Konzentration der DNA während der Ethanolpräzipitation ist für eine effektive Fällung ausschlaggebend. Die DNA-Konzentration konnte bei der Ethanolfällung maximal 25 ng/µl betragen, womit sich die geringe Ausbeute erklären lässt.

Die Isolierung von genomischer DNA aus Zellkernlysaten durch direkte Ethanolpräzipitation führte zu einer guten Ausbeute von 60%. Die Analyse der isolierten DNA durch Gelelektrophorese und die Bestimmung des A_{260}/A_{280} -Verhältnisses zeigte jedoch eine starke Verunreinigung durch RNA und Proteine. Gegen diese Methode spricht außerdem der hohe zeitliche Aufwand für die Isolierung der DNA. Die mit Ethanol gefällte und getrocknete DNA muss 1-2 Tage in Tris-Puffer bis zur vollständigen Solvatisierung inkubiert werden.

Mit den bisher beschriebenen Methoden konnte genomische DNA aus *Dictyostelium* entweder nur mit sehr geringen Ausbeuten oder starken Verunreinigungen isoliert werden. Deshalb wurde DNA mit einem weiteren Kit isoliert, welches für die Isolierung von DNA aus Pflanzenzellen konzipiert ist. Pflanzenzellen enthalten generell mehr Polysaccharide als tierische Zellen. Hier werden zunächst Proteine und Polysaccharide durch eine hohe Salzkonzentration gefällt und durch Filtration entfernt. Die DNA-Isolierung erfolgt dann durch selektive Bindung der DNA an eine Silicagelmembran. Abweichend von den Standardvorschriften führte der Gefrieraufschluss und die anschließende einminütige Inkubation der Zellen in dem Lysispuffer zu einer optimalen DNA-Ausbeute von 50%. Aus $4 \cdot 10^7$ Zellen wurden 10 µg genomische DNA mit hoher Reinheit isoliert.

3.3.1.2 Versuch der Genidentifizierung durch PCR

Das Gen der InsP₇-Kinase konnte zunächst nur auf der Basis von Aminosäuresequenzen gefunden werden, deshalb mussten degenerierte Primer bzw. Primermischungen zur Amplifikation eingesetzt werden. Die PCR mit degenerierten Primern ist aufgrund der effektiven Anzahl verschiedener Primer von Natur aus unspezifischer. Die Primermischungen und besonders die AT-reichen Oligonukleotide schränken die Möglichkeit stark ein, die Spezifität der PCR über die Annealing-Temperatur zu steuern, da die Primer nur bei relativ niedrigen Temperaturen zwischen 30 und 45°C an die Template-DNA binden. In diesem Fall können nur optimale PCR-Bedingungen zu einer entsprechenden Sensitivität der PCR führen. Deshalb wurden zunächst die allgemeinen PCR-Bedingungen für die Amplifikation der AT-reichen genomischen *Dictyostelium*-DNA optimiert.

PCR-Amplifikate wurden detektiert, wenn 0,2–1 µg genomische DNA, 0,2 mM dNTPs und 0,4 µM Primer eingesetzt wurden. PCR mit der Vent-Polymerase, die glatte Fragmentenden generiert und gleichzeitig eine 3'-5'-Exonucleaseaktivität zur Korrektur von falsch eingebauten Basen besitzt, führt in Gegenwart von 2 mM MgSO₄ zu einem optimalen Ergebnis, während die PCR mit der Taq-Polymerase den Zusatz von 2 mM MgCl₂ erfordert. Die Taq-Polymerase besitzt keine 3'-5'-Exonucleaseaktivität und generiert überhängende Fragmentenden. Die Amplifikation von DNA-Fragmenten bei höherer Mg²⁺-Konzentration wird unspezifischer. Bei Konzentrationen von 4 und 6 mM Mg²⁺ binden teilweise die einzelnen Primer an DNA, zusätzlich entstehen mehrere Produkte. Dies ist neben der geringeren Spezifität auch auf die Primermischungen zurückzuführen. Die unspezifische Bindung der Primer an die DNA und die Primerdimerisierung, die häufig schon bei niedrigen Temperaturen in Gegenwart einer Polymerase auftreten, konnte durch die hot-start-PCR bei einigen Primerkombinationen minimiert werden. Die Ausbeute der PCR-Produkte konnte durch die Reduzierung der Extensionstemperatur von 72°C auf 68°C, bei der die Polymerasen noch hinreichend aktiv sind, erhöht werden¹⁴². Bei einigen Reaktionsansätzen wurden erst durch die reduzierte Extensionstemperatur DNA-Fragmente mit den verwendeten Primern amplifiziert. Je nach eingesetzter Primerkombination mussten bei den einzelnen PCR-Ansätzen die Annealing-Temperatur und die Anzahl der Zyklen entsprechend angepasst werden, um Amplifikate zu erhalten.

Ausgehend von den Peptidsequenzen DFFENNPDYR und LIDFTHTK wurden Primer für die PCR konstruiert. Unter Berücksichtigung der *Dictyostelium*-spezifischen Codons¹⁴¹ wurden die ganz seltenen Codons für einzelne Aminosäuren vernachlässigt. Die Aminosäuren R und L wurden aufgrund der möglichen Anzahl der Codons bei der Primerkonstruktion nicht berücksichtigt. Bei den Aminosäuren, die eine hohe Degenerierung der Primer durch viele mögliche Codons verursachen, wurde zunächst Inosin anstelle von drei oder vier Basen in die Primer integriert. Inosin ist eine seltene Base und kann mit allen Nukleotidbasen paaren, so dass hier keine Fehlpaarungen auftreten. Der Einbau von Inosin in die Primersequenzen reduziert jedoch gleichzeitig die Spezifität der Primer.

Durch PCR mit der Primerkombination TL2/TL3 wurde nur ein Fragment mit ca. 600 Basenpaaren amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in den Klonierungsvektor pUC18 kloniert und kompetente *E. coli* DH5 α Zellen mit dem Vektor transformiert. Die Restriktionsanalyse von Plasmiden aus 12 Klonen zeigte, dass zwei Plasmide (pCT00, pCT01) das DNA-Fragment enthalten. Die Insertion wurde außerdem durch PCR überprüft. Wie erwartet wurde das 600 bp große DNA-Fragment amplifiziert. Die Plasmide wurden sequenziert. Abbildung 3-6 dokumentiert die einzelnen Schritte bis zur Sequenzierung des Amplifikats.

Nachfolgende Datenbankrecherchen mit dieser DNA-Sequenz ergaben keine Homologien zu bekannten Enzymen, die am Inositolphosphatstoffwechsel beteiligt sind. Die DNA-Sequenz stimmt jedoch mit einem Teil der Gensequenz des Retrotransposons Tdd-3¹⁴⁷ aus *Dictyostelium* überein. In der Proteinsequenz treten die Peptide IDFTHTK und DFFENNPDY allerdings nicht auf. Offensichtlich gibt es aber ähnliche oder identische Nukleotidsequenzen auf genomischer Ebene, an welche die abgeleiteten Primer binden können. Gleichzeitig wird auch deutlich, dass das Primerpaar TL2/TL3 aufgrund der Degenerierung und der eingebauten Inosine zu unspezifisch an die DNA bindet. Dies kann dadurch belegt werden, dass in der Sequenz des PCR-Produktes die Primersequenz TL3 nicht vollständig gefunden wurde.

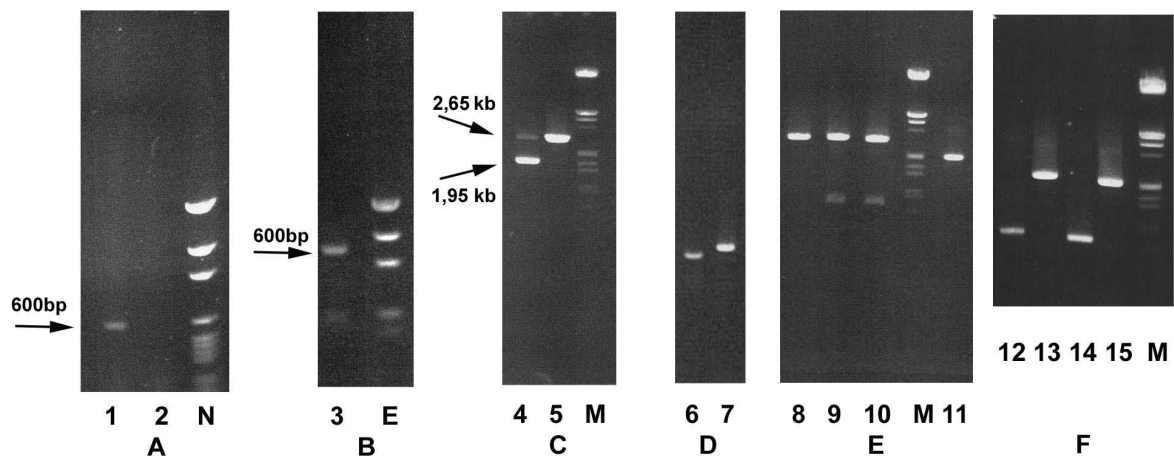


Abb. 3-6: Dokumentationsgele der PCR und Klonierung des PCR-Produktes in den pUC18-Vektor

- A PCR:** 200 ng genomische DNA, 1 U Vent-Polymerase, 2 mM MgSO₄, 30 Zyklen 35°C Annealing-Temperatur; 0,7% Agarosegel, N: D15-DNA-Marker (Novex), 1: Primer TL2/TL3; 2: Primer TL1/TL4
- B Nested PCR:** 4 µl PCR-Produkt (A1) wurden unter den gleichen Bedingungen wie unter A amplifiziert. Die Analyse erfolgte auf einem 1,2%igen Agarosegel. E: EZ Load Precision Molecular Mass Marker (BioRad)
- C Linearisierung des pUC18-Vektors mit SmaI:** 0,7% Agarosegel, M: DNA-Längenstandard III (Roche); 4: pUC18 Plasmid-DNA (100 ng, 1,95 kb, supercoiled); 5: linearisierte pUC18 Plasmid-DNA (100 ng, 2,65 kb)
- D, E Restriktion der Plasmide pCT00 und pCT01:** 6: pUC18 Plasmid-DNA mit HindIII geschnitten (2,65 kb); 7: pCT00 Plasmid-DNA geschnitten mit HindIII (3,2 kb); 8: pUC18 Plasmid-DNA mit HindIII und EcoRI geschnitten (2,65 kb); 9: pCT00 Plasmid-DNA mit HindIII und EcoRI geschnitten (600 bp Insert, 2,65 kb Plasmidrückgrat); 10: pCT01 Plasmid-DNA mit HindIII und EcoRI geschnitten (600 bp Insert, 2,65 kb Plasmidrückgrat); 11: pCT00 Plasmid-DNA (100 ng, 2,1 kb, supercoiled)
- F PCR:** 10 ng Plasmid-DNA, 1 U Vent-Polymerase, 2 mM MgSO₄, Primer TL2/TL3, 30 Zyklen 35°C Annealing-Temperatur, 0,9% Agarosegel; 12: pCT00 Plasmid-DNA als Template, 600 bp PCR-Produkt; 13: isolierte pCT00 Plasmid-DNA (2,1 kb, supercoiled); 14: pCT01 Plasmid-DNA als Template, 600 bp PCR-Produkt; 15: isolierte pCT00 Plasmid-DNA (2,1 kb, supercoiled)

Nach diesen ersten Ergebnissen wurden weitere Primer konstruiert, bei denen Inosin durch die entsprechenden Basen ausgetauscht und dabei nur die häufigsten Codons berücksichtigt wurden. Demzufolge wird einerseits die Spezifität der Primer und andererseits die Schmelztemperatur der Primer erhöht. Eine höhere Annealing-Temperatur führt dann möglicherweise zu einer größeren Sensitivität der PCR. Alle von den Peptidsequenzen abgeleiteten Primer wurden zur Amplifizierung von genomischer DNA eingesetzt. Das 600 bp-Fragment wurde mit den Primerkombinationen TL2/TL3 und TL2/CT1 amplifiziert. Mit den übrigen Primerpaaren konnte keine spezifischen PCR-Produkte generiert werden. Das

Kinasegen konnte auch durch die Hybridisierung von genomischer DNA mit den Primersequenzen nicht identifiziert werden (T. Winckler, pers. Mitteilung).

3.3.2 Versuch der Genidentifizierung über die konservative Inositolphosphatbindestelle der InsP₆-Kinasefamilie

Die Familie der InsP₆-Kinasen besitzt eine Inositolphosphatbindestelle mit der Aminosäuresequenz PCVLDLKMGRQHGDDAS, die in den untersuchten Organismen stark konserviert auftritt. Es wurde versucht das codierende Gen über diese konservative Sequenz zu finden, da eine Inositolphosphatbindestelle auch für die InsP₇-Kinase essentiell ist. Datenbankrecherchen mit der konservierten Aminosäuresequenz ergaben zunächst keine Hinweise auf homologe Proteine oder Gene in *Dictyostelium*, was darauf zurückzuführen ist, dass zu diesem Zeitpunkt erst 40–60% des *Dictyostelium*-Genoms bekannt waren. Dennoch wurden degenerierte Primer unter Berücksichtigung der spezifischen Codons von einem Teil dieser Peptidsequenz abgeleitet. Diese Primer wurden in Kombination mit Primern, die ausgehend von den Peptidsequenzen IDFTHTK und DFFENNPDY konstruiert wurden (Kap. 3.3.1.2), zur PCR eingesetzt. Mehrere Fragmente mit ca. 100 – 250 Basenpaaren wurden mit den Primerkombinationen TL2/CT3, TL4/CT3 und CT1/CT3 amplifiziert. Eine selektivere Amplifikation war aufgrund der Degenerierung der Primer nicht möglich. Das InsP₇-Kinasegen konnte auch mit Hilfe der konservativen Sequenz der Inositolphosphatbindestelle nicht identifiziert werden.

Datenbankrecherchen mit den vollständigen Sequenzen von InsP₆-Kinasen zeigten Sequenzhomologien zu einem *Dictyostelium* DNA-Klon JAX4a216b11 (Sequenzdaten von der Website des Genome Sequencing Center Jena <http://genome.imb-jena.de/dictyostelium/>). Nach der Translation dieser DNA-Sequenz wurde die konservative Inositolphosphatbindestelle gefunden und spezifische Primer vom 5'- (CT7) und 3'-Ende (CT8) der Bindestelle konstruiert. Durch hot-start-PCR konnte mit diesen Primern die Inositolphosphatbindestelle, ein 50-100 bp-Fragment, von genomischer DNA amplifiziert werden. Ebenso wurde mit spezifischen Primern (CT9 und CT10) die gesamte 700 bp-Sequenz des Klons amplifiziert. Die Kombination dieser Primer mit den Primern CT5 und CT6 (abgeleitet von den bekannten Peptidsequenzen) ergab jedoch keine PCR-Produkte.

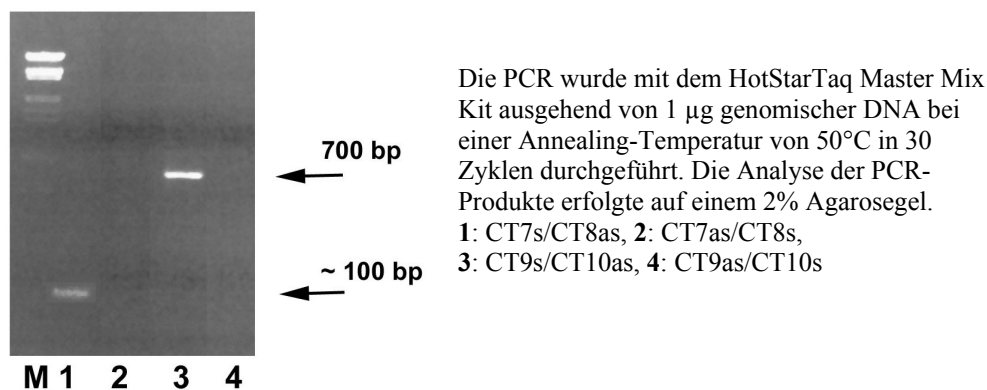


Abb. 3-7: PCR mit Primern, die von der Sequenz des DNA-Klons aus Jena abgeleitet wurde

Es ist nicht gelungen, das Gen der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase mit Hilfe der konservativen Inositolphosphatbindestelle zu identifizieren. Offensichtlich verhindert die starke Degenerierung der von den Peptidsequenzen IDFTHTK und DFFENNPDY abgeleiteten Primer die spezifische Amplifikation des Kinasegens. Es konnte aber gezeigt werden, dass die PCR mit spezifischen Primern nach der Optimierung der DNA-Isolierung und der allgemeinen PCR-Bedingungen zur Amplifikation entsprechender DNA-Fragmente führt.

3.4 Sequenzierung der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase mittels

Nanoelektrosprayionisations-Massenspektrometrie (Nano-ESI-MS)

Das Gen der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase konnte nicht durch PCR und Datenbankrecherchen auf der Basis der Sequenzinformationen aus den MALDI-MS-Analysen und der Edmansequenzierung identifiziert werden. Die MALDI-MS und der Edmanabbau liefern hier aufgrund der geringen Proteinmenge und dem ähnlichen Elutionsverhalten vieler tryptischer Peptide der InsP₇-Kinase, während ihrer Trennung durch Kapillar-HPLC, keine weiteren Sequenzinformationen. Die Möglichkeit, die Primärstruktur der Kinase durch Edmansequenzierung zu ermitteln, wurde durch den Hinweis auf eine N-terminale Blockierung ausgeschlossen. Eine weitere Standardmethode zur Proteinsequenzierung ist die ESI-MS. Sie kann eine Ergänzung zur MALDI-MS sein. Bedingt durch die verschiedenen Ionisationsverfahren der beiden Methoden können durch ESI-MS häufig Peptide detektiert werden, die durch MALDI-MS nicht zugänglich sind. Die Proteinmenge ist bei allen massenspektrometrischen Analysen der limitierende Faktor. Im Gegensatz zur MALDI-MS reichen jedoch für die ESI-MS durch die Verwendung einer Nanoelektrosprayionisationsquelle

kleinere Proteinmengen aus, um Sequenzinformationen zu erhalten. Gleichzeitig können mit der ESI-Tandemmassenspektrometrie auch Peptidgemische sequenziert werden, so dass eine vorherige Trennung der Peptide, die zu weiteren Probeverlusten führt, nicht erforderlich ist. Die 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. S. Metzger (BMFZ, Universität Düsseldorf) und Herrn Dr. T. Laussmann durch Nano-ESI-MS sequenziert. Auch hier wurde für die Sequenzierung die InsP₇-Kinase durch Ionenaustausch- und anschließende InsP₆-Affinitätschromatographie partiell angereichert und die Proteine durch SDS-PAGE getrennt. Wie bei den MALDI-MS-Analysen wurde die 40 kDa-Bande der InsP₇-Kinase tryptisch im Gel verdaut und das entstandene Peptidgemisch extrahiert.

3.4.1 ESI- und ESI-CID-Massenspektren

Zunächst wurden im Positivmodus Übersichtsspektren (Abb. 3-8 und Abb. 3-9) des Peptidgemisches aufgenommen. Nach dem tryptischen Verdau der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase enthält das Peptidgemisch viele Fragmente mit monoisotopischen Massen zwischen 700 und 2500 Da. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen des MALDI-MS-Analysen. Ausgewählte Peptide der InsP₇-Kinase wurden anschließend im Tandem-MS/MS-Modus stoßinduziert fragmentiert.

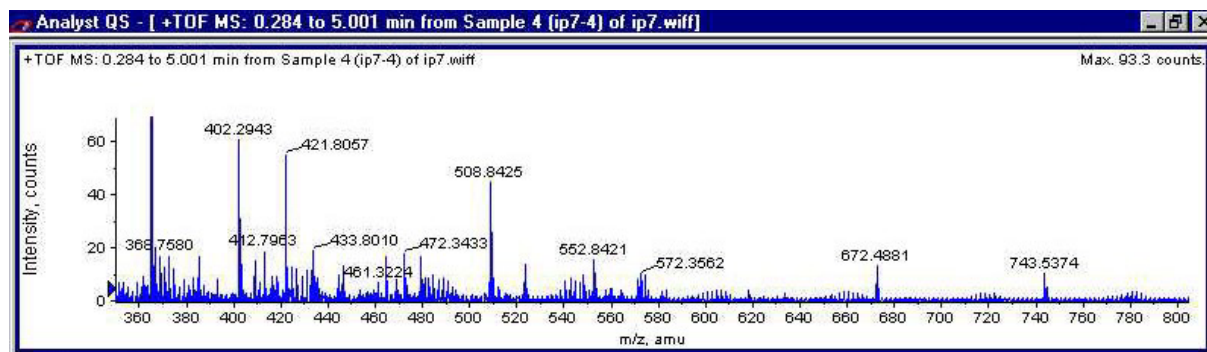


Abb. 3-8: Übersichtsspektrum der mit 60% Methanol eluierten tryptischen Peptide der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase

Peptide wurden mit 60% Methanol/1% Ameisensäure von den ZipTips_{μC18} eluiert. Neben wenigen Peptiden aus dem tryptischen „In-Gel-Verdau“ der Kinasebande wurden hauptsächlich autoproteolytische Peptide von Trypsin detektiert. Mit Mascot (http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?Search=PMF) wurde der Peptidmassenfingerprint mit Sequenzdatenbanken verglichen. Die Peptide mit den monoisotopischen Massen $[M+H]^+$ von 866 Da (2-fach geladen, Signale 433,3 und 433,7 Da nicht trennbar), 937,6 Da (2-fach geladen, Signal 469,3 Da), 1015,6 Da (2-fach geladen, Signal 508,3 Da), 1016,6 Da (2-fach geladen, Signal 508,8 Da), 1104,4 Da (2-fach geladen, Signal 552,7 Da) und 1144,2 Da (2-fach geladen, Signal 572,6 Da) wurden im Tandem-MS/MS-Modus fragmentiert.

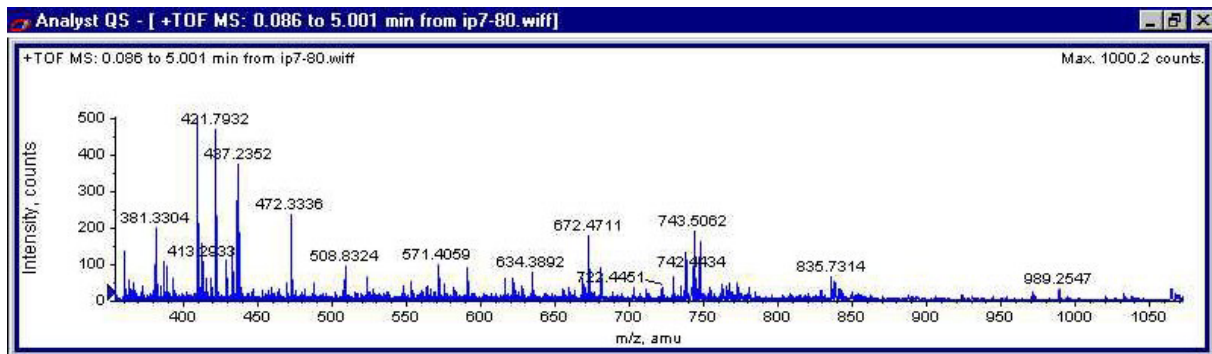


Abb. 3-9: Übersichtspektrum der mit 80% Methanol eluierten tryptischen Peptide der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase

Peptide wurden mit 80% Methanol/1% Ameisensäure von den ZipTips_{μC18} eluiert. Die meisten Peptide entstanden durch den tryptischen „In-Gel-Verdau“ der Kinasebande. Der Peptidmassenfingerprint wurde ebenfalls mit Sequenzdatenbanken verglichen. Die Peptide mit den monoisotopischen Massen $[M+H]^+$ von 974,6 Da (2-fach geladen, Signal 487,8 Da), 1180,6 Da (2-fach geladen, Signal 590,8 Da), 1242,6 Da (2-fach geladen, Signal 621,8 Da), 1253,6 Da (2-fach geladen, Signal 627,3 Da), 1267,6 Da (2-fach geladen, Signal 634,3 Da), 1963 Da (3-fach geladen, Signal 655,0 Da), 1316,6 Da (2-fach geladen, Signal 658,8 Da), 1335,8 Da (2-fach geladen, Signal 668,4 Da), 2040,2 Da (2-fach geladen, Signal 1020,6 Da und 3-fach geladen, Signal 680,5 Da), 1656,8 Da (2-fach geladen, Signal 828,9 Da), 1846 Da (2-fach geladen, Signal 923,5 Da und 3-fach geladen, Signal 616,0 Da), 1854,2 Da (2-fach geladen, Signal 927,6 Da), 2963,8 Da (3-fach geladen, Signal 988,5 Da) und 2293,2 Da (2-fach geladen, Signal 1147,1 Da) wurden im Tandem-MS/MS-Modus fragmentiert.

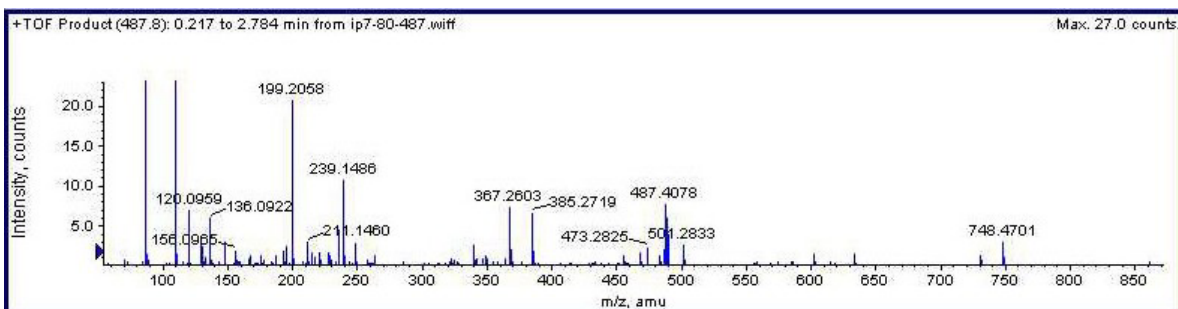
Für die Fingerprint-Suchen (s. auch Kap. 3.3) wurde der Mascot-Algorithmus verwendet. Generell verdauen alle Algorithmen die in einer Datenbank gespeicherten Proteine theoretisch mit der verwendeten Protease und ermitteln daraus die Peptidmuster dieser Proteine. Der Vergleich dieser theoretischen Spektren mit dem aufgenommenen Spektrum kann zur Identifizierung von bekannten Proteinen führen. Mascot basiert auf dem Mowse-Algorithmus. Mowse berücksichtigt neben der Anzahl der übereinstimmenden Peptide auch die relative Häufigkeit von Peptiden einer gegebenen Masse in der Datenbank und die Proteingröße. Mascot kalkuliert zusätzlich die Wahrscheinlichkeit von zufälligen Übereinstimmungen. Mit diesem Algorithmus werden falschpositive Übereinstimmungen weitgehend minimiert¹⁴⁸. Bei den Datenbankrecherchen mit Mascot können zusätzliche Suchoptionen wie mögliche posttranslationale Modifikationen und der Organismus vorgegeben werden.

Sowohl die Informationen aus den Übersichtsspektren wie auch die Daten der CID-Massenspektren wurden gegen die Sequenzdatenbanken abgeglichen. Bei den Suchen wurden keine Übereinstimmungen mit bekannten Proteinen oder ESTs in den Datenbanken gefunden. Bei unbekanntem Proteinen können allenfalls Homologien zu bereits sequenzierten Proteinen gefunden werden. Auch Homologien wurden nicht gefunden. Aufgrund dieser Ergebnisse

kann man davon ausgehen, dass zu diesem Zeitpunkt weder die 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase noch das codierende Gen sequenziert waren.

3.4.2 *De-novo*-Sequenzierung der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase

Die einzige Möglichkeit, die Primärstruktur von unbekanntem Proteinen aufzuklären, ist die *de-novo*-Sequenzierung der Peptide¹⁴⁹. *De-novo*-Sequenzierungen sind sehr zeitaufwändig und teilweise recht schwierig¹⁵⁰, da bei der ESI-Massenspektrometrie im Gegensatz zu der MALDI-Massenspektrometrie in der Regel mehrfach geladene Peptidionen detektiert werden. Die entstehenden Fragmentationsspektren von 3- oder 4-fach geladenen Peptiden sind oft sehr komplex und nicht mehr ohne weiteres manuell auswertbar. Die Abbildungen 3-10 und 3-11 zeigen exemplarisch die CID-Massenspektren (A) mit der zugehörigen Auswertung der Fragmentationen (B) für ein zweifach- und ein dreifach-geladenes Mutterion.



A: CID-Spektrum des zweifach-geladenen Mutterions $[M+2H]^{2+}$ (487,4 Da)

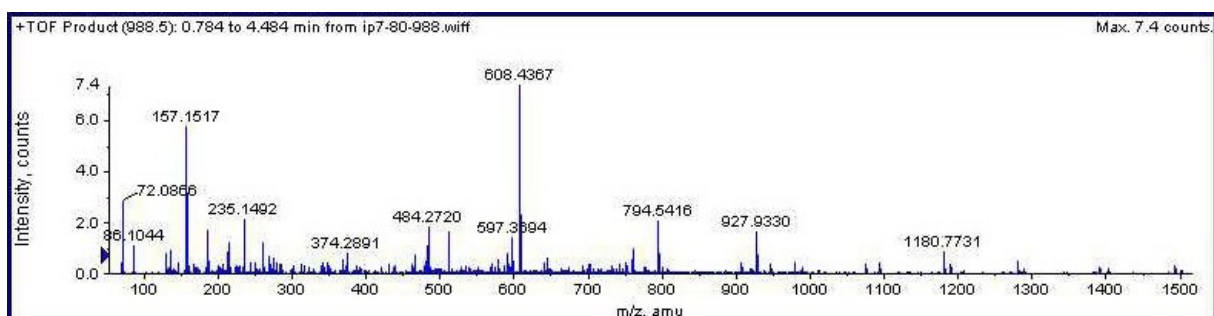
Der Peptidfragmentierungsmassenfingerpint wurde mit Mascot gegen Sequenzdatenbanken abgeglichen (http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?Search=MIS).

	Residue	Mass	Immonium	a	a-NH3	b	b-NH3	y	y-NH3
1	L, Leu	113.0841	86.0964	86.0964	69.0699	114.0913	97.0648	974.5306	957.5040
2	I, Ile	113.0841	86.0964	199.1805	182.1539	227.1754	210.1489	861.4465	844.4199
3	D, Asp	115.0269	88.0393	314.2074	297.1809	342.2023	325.1758	748.3624	731.3359
4	F, Phe	147.0684	120.0808	461.2758	444.2493	489.2708	472.2442	633.3355	616.3089
5	T, Thr	101.0477	74.0600	562.3235	545.2970	590.3184	573.2919	486.2671	469.2405
6	H, His	137.0589	110.0713	699.3824	682.3559	727.3774	710.3508	385.2194	368.1928
7	T, Thr	101.0477	74.0600	800.4301	783.4036	828.4250	811.3985	248.1605	231.1339
8	K, Lys	128.0950	101.1073	928.5251	911.4985	956.5200	939.4934	147.1128	130.0863

B: Die Aminosäuresequenz LIDFHTK wurde mit Hilfe der Analyst QS Software und dem darin implementierten BioAnalyst-Programm ermittelt. Alle Signale des Spektrums konnten Fragmentationen zugeordnet werden. 75% der theoretischen Fragmentationen sind im Spektrum zu finden. Diese Peptidsequenz wurde auch aus vorangegangenen MALDI-MS-Analysen und Edmanabbau erhalten.

Abb. 3-10: CID-Spektrum und Sequenzierung des Peptids mit der Masse 974,6 Da

Aus den CID-Massenspektren wurde die Primärstruktur der einzelnen Peptide ermittelt. Das verwendete Computerprogramm berechnet aus der ermittelten Aminosäuresequenz die Fragmentionen, die im Spektrum erscheinen sollten. Bei der *de-novo*-Sequenzierung müssen diese Daten mit den Spektren verglichen werden, da die Signale automatisch zugeordnet werden. Diese Zuordnungen sind aber gerade bei komplexeren Spektren nicht immer korrekt.



A: CID-Spektrum des dreifach-geladenen Mutterions $[M+3H]^{3+}$ (988,5 Da)

Der Peptidfragmentierungsmassenfingerprint wurde mit Mascot gegen Sequenzdatenbanken abgeglichen.

Residue	Mass	Immonium	a	a-NH3	b	b-NH3	y	y-NH3
A, Ala	71.0371	44.0495	44.0495	27.0229	72.0444	55.0178	2963.6715	2946.6450
I, Ile	113.0841	86.0964	157.7335	140.1070	185.1285	168.1019	2892.6344	2875.6079
P, Pro	97.0528	70.0651	254.1863	237.1598	282.1812	265.1547	2779.5503	2762.5238
N, Asn	114.0429	87.0553	368.2292	351.2027	396.2241	379.1976	2682.4976	2665.4710
G, Gly	57.0215	30.0338	425.2507	408.2241	453.2456	436.2191	2568.4547	2551.4281
V, Val	99.0684	72.0808	524.3191	507.2926	552.3140	535.2875	2511.4332	2494.4066
D, Asp	115.0269	88.0393	639.3461	622.3195	667.3410	650.3144	2412.3648	2395.3382
I, Ile	113.0841	86.0964	752.4301	735.4036	780.4250	763.3985	2297.3378	2280.3113
Y, Tyr	163.0633	136.0757	915.4934	898.4669	943.4884	926.4618	2184.2538	2167.2272
W, Trp	186.0793	159.0917	1101.5728	1084.5462	1129.5677	1112.5411	2021.1904	2004.1639
E, Glu	129.0426	102.0550	1230.6154	1213.5888	1258.6103	1241.5837	1835.1111	1818.0846
N, Asn	114.0429	87.0553	1344.6583	1327.6317	1372.6532	1355.6266	1706.0685	1689.0420
V, Val	99.0684	72.0808	1443.7267	1426.7001	1471.7216	1454.6951	1592.0256	1574.9991
G, Gly	57.0215	30.0338	1500.7482	1483.7216	1528.7431	1511.7165	1492.9572	1475.9306
G, Gly	57.0215	30.0338	1557.7896	1540.7431	1585.7645	1568.7380	1435.9357	1418.9092
V, Val	99.0684	72.0808	1656.8380	1639.8115	1684.8329	1667.8064	1378.9143	1361.8877
V, Val	99.0684	72.0808	1756.2321	1739.2055	1784.2270	1767.2004	1279.6793	1262.6528
S, Ser	87.0320	60.0444	1843.2641	1826.2376	1871.2590	1854.2325	1180.6109	1163.5844
D, Asp	115.0269	88.0393	1958.2910	1941.2645	1986.2860	1969.2594	1093.5789	1076.5524
A, Ala	71.0371	44.0495	2029.3282	2012.3016	2057.3231	2040.2965	978.5520	961.5254
L, Leu	113.0841	86.0964	2142.4122	2125.3857	2170.4071	2153.3806	907.5148	890.4883
W, Trp	186.0793	159.0917	2328.4915	2311.4650	2356.4865	2339.4599	794.4308	777.4042
P, Pro	97.0528	70.0651	2425.5443	2408.5178	2453.5392	2436.5127	608.3515	591.3249
H, His	137.0589	110.0713	2562.6032	2545.5767	2590.5981	2573.5716	511.2987	494.2722
L, Leu	113.0841	86.0964	2675.6873	2658.6607	2703.6822	2686.6556	374.2398	357.2132
N, Asn	114.0429	87.0553	2789.7302	2772.7037	2817.7251	2800.6986	261.1557	244.1292
K, Lys	128.0950	101.1073	2917.8252	2900.7986	2945.8201	2928.7935	147.1128	130.0863

B: Die Aminosäuresequenz AIPNGVDIYWENVGGVSDAIWPHLNK wurde durch die computerunterstützte Auswertung des Spektrums ermittelt. Alle Signale des Spektrums konnten Fragmentionen zugeordnet werden. Die unterlegten theoretischen Fragmentionen (55%) sind im Spektrum zu finden.

Abb. 3-11: CID-Spektrum und Sequenzierung des Peptids mit der Masse 2963,8 Da

25 Fragmentationsspektren wurden aufgenommen. Aus diesen Spektren konnten 13 Aminosäuresequenzen (Tab. 3-4) ermittelt werden. Zwei dieser kurzen Sequenzen wurden schon durch MALDI-MS und Edmanabbau gefunden. In einer weiteren massenspektrometrischen Analyse wurde die Bande der Kinase mit der Endoproteinase GluC im Gel verdaut und die entstandenen Peptide mit LC-MS/MS sequenziert (M. Mreyen, persönliche Mitteilung). GluC katalysiert die Spaltung von Peptidbindungen C-terminal von Glutamat. Diese Protease wird jedoch nicht routinemäßig in der Analytik eingesetzt, da sie eine geringere Proteolysespezifität besitzt und eine aufwändigere Konfiguration der Massenspektrometer voraussetzt. Drei weitere Aminosäuresequenzen (Tab. 3-4) wurden ermittelt, von denen eine mit Peptiden aus den ESI-MS-Analysen überlappt.

Nr.	In-Gel-Verdau	Peptidmasse [Da] [M+H] ⁺	Ladung der Peptide	Aminosäuresequenz
1	tryptisch	1846	2 und 3fach	NHIESGTPLEDFE EK
2	tryptisch	2040,2	2 und 3fach	TFEFSIEELKNEEVVVK ^(a)
3	tryptisch	1335,8	2fach	LEIVSPDYM _{ox} R
4	tryptisch	1015,6	2fach	VVGIVSE EK
5	tryptisch	2293,2	2fach	YIVDELGFDVGVNYSPTYK
6	tryptisch	2963,8	3fach	AIPNGVDIYWENVGGVVSDAIWPHLNK
7	tryptisch	937,6	2fach	ELAQWYK
8	tryptisch	1656,8	2fach	QFYESLSPDNELSK
9	GluC	2053,4		LSKLIPKYYGTVIQDGKE ^(b)
10	tryptisch	1144,2	2fach	YYGTVIQDGK
11	tryptisch	1267,6	2fach	ELYESWLLSK
12	tryptisch	1253,6	2fach	LYDFFHNGIK
13	tryptisch	1316,6	2fach	DFFENNPDYR ^(c)
14	tryptisch	974,6	2fach	LIDFTHTK ^(c)
15	GluC	1533,7		DLTYGYSKPNIM _{ox} D
16	GluC	1781,9		TIYSPPSSNDPNVNFE

Tab. 3-4: Ermittelte Peptidsequenzen aus den massenspektrometrischen Analysen

a Zusätzlich wurde die Teilsequenz TFEFSIEELK aus einem weiteren CID-Spektrum ermittelt.

b Diese Sequenz überlappt mit den Sequenzen 8 und 10.

c Die Sequenzen wurden durch MALDI-MS/MS und Edmanabbau bestätigt.

Mit diesen Peptidsequenzen wurden Datenbankrecherchen¹⁵¹ durchgeführt. Standard-suchen über BLAST^{152,153} oder FastA¹⁵⁴ zeigten zunächst keine Übereinstimmungen mit vorhandenen Sequenzen. Erst die empirische Anpassung der Suchparameter für BLAST-Suchen sowie die seit kurzem mögliche Suche mit kurzen Aminosäuresequenzen führten zu Übereinstimmungen mit Protein- und DNA-Sequenzen in den Datenbanken.

Von den 16 ermittelten Sequenzen konnten 7 Peptide (1-7, Tab. 3-4) einem cDNA-Klon VFM 264 zugeordnet werden. Eine Zuordnung der übrigen Peptide war durch Datenbankrecherchen nicht möglich. Dies lässt vermuten, dass möglicherweise zwei unterschiedliche Proteine sequenziert wurden, die in der 40 kDa-Bande nach der elektrophoretischen Trennung der Kinasepräparation vorliegen.

Der von der Universität Tsukuba (Japan) zur Verfügung gestellte cDNA-Klon (Abb. 3-12) enthält ein komplettes Gen, das näher untersucht wurde.

3. Ergebnisse und Diskussion

```

ATG GTT CTT AGT AAA CAA ATT GTA TTA AAA AAT CAC ATC GAA AGT
M V L S K Q I V L K N H I E S
GGT ACA CCA ACT TTG GAG GAT TTT GAA GAG AAA ACT TTT GAA TTT
G T P T L E D F E E K T F E F
TCA ATT GAA GAA TTA AAA AAT GAA GAA GTA GTA GTA AAA TTA GAG
S I E E L K N E E V V V K L E
ATA GTT TCA CCA GAC CCA TAT ATG AGA GGT CGT ATG ACA ACA CGT
I V S P D P Y M R G R M T T R
AAA TCA TAT ATC CCA CCA TTT GAA ATT GGT AAA CCA ATT GTT GGA
K S Y I P P F E I G K P I V G
TAT GCT ATT GGT AAA GTT ACA AAA GCA GGC TCA GCA TCA AAG TAT
Y A I G K V T K A G S A A K Y
TCA GTA GGT GAT TAC ATT ATG GGT CAT TTA CCA TGG CAA TCT GAA
S V G D Y I M G H L P W Q S E
TTC ATC TAC AAT TCA AAC AGT CCA TAT GCA AAT AAA ATC GAT ACA
F I Y N S N S P Y A N K I D T
ACA TTA GCG CCA TTG GAA TCA TTC CTC TCA GTT TTG GGT ATG GTC
T L A P L E S F L S V L G M V
GGA TTA ACA GCT TAT CAC GGT CTC AAA GAG ATC GCA GAA CCA AAA
G L T A Y H G L K E I A E P K
CAA GGT GAA ACC ATG GTA ATC AGC GCT GCA GCC GGT GCA GTA GGT
Q G E T M V I S A A A G A V G
CAA TTG GTC GGT CAA ATT GGT AAA ATC AAA GGT TGC AGA GTT GTA
Q L V G I G K I K G C R V V
GGT ATC GTA GGT TCC GAA GAG AAG ATA AAA TAC ATC GTC GAT GAA
G I V G S E E K I K Y I V D E
TTA GGT TTT GAT GTC GGT GTA AAT TAC AAT TCA CCA ACT TAT AAA
L G F D V G V N Y N S P T Y K
GAC GAT ATA GCA AAA GCA ATT CCA AAT GGT GTT GAT ATA TAT TGG
D D I A K A I P N G V D I Y W
GAG AAT GTT GGT GGT GTT GTA TCT GAT GCA ATT TGG CCA CAC TTG
E N V G G V V S D A I W P H L
AAT AAG TTT GCC CGT ATT CCA CTA TGC GGT GTA ATC TCA CAA TAC
N K F A R I P L C G V I S Q Y
AAC TCT ACT GAA AAG GAT GTT GGC CCA CGT ATT GAA GGT TAT CTC
N S T E K D V G P R I E G Y L
TTG AAA ACT TCC TCA AAA TTA CAA GGT TTC ATC GTT GCA AAC TAT
L K T S S K L Q G F I V A N Y
GCA AGC AAA CAT GCT GAA GCA TTA AAA GAA TTG GCT CAA TGG TAT
A S K H A E A L K E L A Q W Y
AAA TCT GGT CAA CTC AAA GAT AGA CAC ACC ATT AAT AAT GGT TTC
K S G Q L K D R H T I N N G F
GAT CAA TTG GTG CCA TCT TTT CTT GCA TTA TTC AAA GGT ACA AAT
D Q L V P S F L A L F K G T N
ACT GGT AAA ATG ATG GTA AAA TTG TAA
T G K M M V K L *

```

Abb. 3-12: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des cDNA-Klons VFM 264

Der erhaltene cDNA-Klon (NIG-ID ddv25016, cDNA Projekt der Universität Tsukuba, Japan) wurde komplett nachsequenziert, da die Nukleotidsequenz in der cDNA-Bank nicht vollständig war. Unterstrichen sind die Peptide, deren Aminosäuresequenz mittels ESI-MS/MS ermittelt wurden. 32% der Gesamtsequenz wurden sequenziert.

3.4.3 Versuch der Genidentifizierung durch Überexpression der cDNA VFM264 in *Pichia pastoris*

Diese cDNA war zunächst der einzige Hinweis auf ein Gen, das für die Synthese der InsP₇-Kinase verantwortlich sein könnte. Der erste Ansatz war, die cDNA mit einem etablierten Expressionssystem zu exprimieren und das Genprodukt zu analysieren. Das *Pichia* Expressionssystem wurde ausgewählt, da die Codonverwendung und die Häufigkeit der tRNAs dieses Organismus ähnlich zu *Dictyostelium* ist. *Escherichia coli* ist im Gegensatz dazu nur bedingt für die Expression AT-reicher Gene einsetzbar, da u.a. entsprechende tRNAs nur in geringen Mengen vorkommen.

Zudem bietet das *Pichia* Expressionssystem weitere Vorteile¹⁵⁵. Viele rekombinante Proteine können mit hohen Ausbeuten produziert werden. Die Kultivierung der Zellen ist relativ einfach und preiswert und es können große Zellmengen angezogen werden. Als eukaryontisches Expressionssystem besitzt *Pichia* einen Golgi-Apparat und ein endoplasmatisches Reticulum, die unter anderem für die richtige Faltung, Bildung von Disulfidbrücken, Glykosylierungen und Phosphorylierungen von eukaryontischen Proteinen essentiell sind. Für die Expression heterologer Gene wird in diesem Expressionssystem der Alkoholoxidase1-Promotor (AOX1) benutzt. Dieser Promotor wird sehr effizient reguliert, so wird er z. B. durch Glucose vollständig reprimiert und in Gegenwart von Methanol als Kohlenstoffquelle aktiviert. Dadurch kann die Produktion von Fremdproteinen sehr gut kontrolliert werden. Mit Hilfe des *Pichia pastoris* Expressionssystems kann ein Gen in einen Expressionsvektor so eingesetzt werden, dass das Genprodukt N-terminal ein sekretorisches Signal und C-terminal einen Polyhistidintag besitzt. Nach der Integration des Vektors in das Genom wird das Gen methanolinduziert exprimiert und das rekombinante Protein ins Medium sekretiert. Über die Bindung des C-terminalen Histidintags an Nickel-Chelatsäulen kann das sekretierte Protein direkt aus dem Medium gereinigt werden.

Die Überexpression erfolgte mit dem pPIC6 α Starter Kit entsprechend den beschriebenen Standardvorschriften. Zur Kontrolle wurde das pPIC6 α /HSA-Plasmid, in dem das Humanserumalbuminogen insertiert ist, analog zu den konstruierten Vektoren in den Expressionsstamm *Pichia pastoris* X33 transformiert und analysiert. Bei der methanolinduzierten Expression wurden der Wildtyp X33 und HSA-Transformanten als Kontrolle eingesetzt.

3.4.3.1 Konstruktion und Transformation des Expressionsvektors in *Pichia pastoris* X33

Spezifische Primer wurden vom 5'- und 3'-Ende der kompletten cDNA-Sequenz abgeleitet. Unter Erhaltung des Startcodons wurde das Stopcodon ausgeschlossen, um das Anhängen des Polyhistidintags an das rekombinante Protein zu ermöglichen. Gleichzeitig wurden mit Hilfe der Primer am 5'-Ende zwei neue Schnittstellen generiert, die das Einsetzen der *Dictyostelium*-cDNA im richtigen Leserahmen und in der richtigen Orientierung in den pPIC6 α A-Vektor erlaubten.

Mit den Primern 5'-AAATAAAAATAGGTACCATGGTTCTTAGTAAACAAATTGTA-3' (CT15s) und 5'-TTGATTTTATTTTTATTCTAGATACAATTTTACCATCATTTTA-3' (CT16as) wurde das komplette Gen von der cDNA-Matrize amplifiziert. Abbildung 3-13 dokumentiert die Klonierung der cDNA in den Expressionsvektor. Durch Restriktionsanalyse und PCR wurde die cDNA in dem Expressionsvektor nachgewiesen. Der konstruierte Vektor wurde durch Elektroporation in kompetente *Pichia pastoris* X33 Zellen transformiert. Die Integration in das *Pichia*-Genom erfolgt durch homologe Rekombination in den AOX1-Locus. Dabei behält der Wirtstamm X33 eine funktionelle Alkoholoxidase I, so dass die Transformanten den gleichen Mut⁺-Phänotyp wie der Wirtstamm zeigen. Die Transformanten wurden über ihre Blasticidin-Resistenz auf YPDS-Platten selektiert. Auf den bei 30°C inkubierten Platten waren nach drei Tagen Kolonien zu erkennen. Mittels Einzell-PCR von resistenten Transformanten wurden Klone identifiziert, deren Genom den integrierten Expressionsvektor mit der cDNA enthielt. Entsprechende DNA-Fragmente wurden mit spezifischen Primern amplifiziert. Zwei Mutanten (PpCT3 und PpCT5), die das cDNA-Gen tragen, wurden für die methanolinduzierte Expression verwendet.

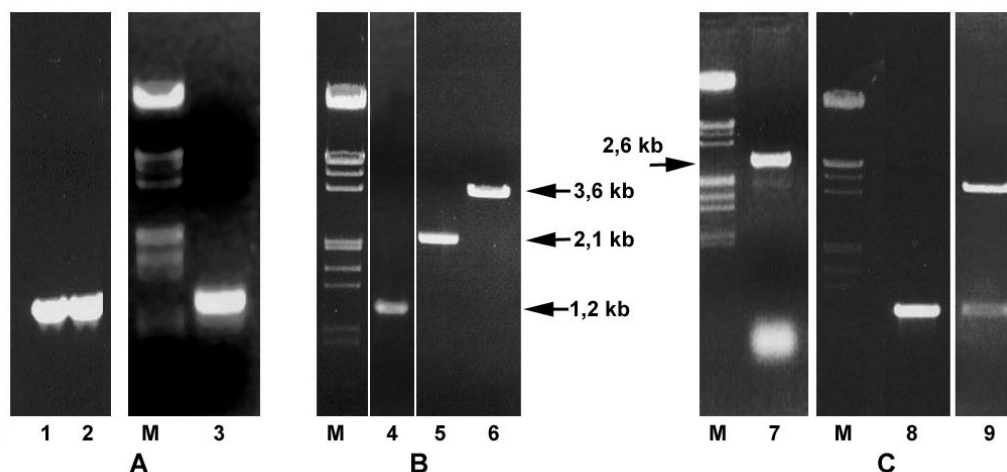


Abb. 3-13. Klonierung der cDNA in den Expressionsvektor pPIC6 α A

M: DNA Längenstandard III (Roche)

A Amplifikation der cDNA: Die cDNA-Sequenz wurde mit den Primern CT15s/CT16as von der Plasmid-DNA VFM264 mit dem HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen) amplifiziert. Die PCR erfolgte mit 3 Zyklen bei 50°C, 27 anschließenden Zyklen bei 54°C und bei einer Extensionstemperatur von 68°C. 5 μ l der Reaktionsansätze wurden auf einem 1% Agarosegel analysiert. **1:** PCR mit 20 ng Template-DNA; **2:** PCR mit 40 ng Template-DNA; **3:** gereinigtes PCR-Produkt

B Restriktion: Der Vektor pPIC6 α A wurde in *E. coli* DH5 α transformiert und Blasticidin-resistente Klone selektiert. Die Restriktion erfolgte bei 37°C über Nacht. Es wurden jeweils 5 U Restriktionsenzym eingesetzt. **4:** 1 μ g PCR-Produkt geschnitten mit KpnI/XbaI; **5:** Vektor-DNA (supercoiled); **6:** 1 μ g Vektor geschnitten mit KpnI/XbaI

C Nachweis der cDNA in dem Expressionsvektor: 470 ng PCR-Produkt wurde mit 10 ng Vektor-DNA ligiert. *E. coli* DH5 α wurden mit 10 μ l des Ligationsansatzes transformiert und Blasticidin-resistente Klone auf LB-Agarplatten (low salt, 100 μ g Blasticidin/ml) selektiert. Nach der Isolierung von Plasmid-DNA konnte die Integration der cDNA in den Vektor durch PCR und Restriktionsanalyse nachgewiesen werden. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel von 12 untersuchten Blasticidin-resistenten Transformanten. **7:** isolierte Plasmid-DNA (0,7% Agarosegel); **8:** Restriktion der Plasmid-DNA mit KpnI/XbaI; **9:** PCR mit 20 ng Plasmid-DNA, Primer CT15s/CT16as, HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen), 30 Zyklen bei 55°C, Extensionstemperatur von 72°C. 10 μ l der Reaktionsansätze wurden auf einem 1% Agarosegel analysiert

3.4.3.2 Versuch der Expression des rekombinanten Proteins

Die Mutanten PpCT3 und PpCT5 wurden so generiert, dass sie das rekombinante Protein methanolinduziert exprimieren und ins Medium sekretieren. Der C-terminal angehängte Polyhistidintag ermöglicht dann die Proteindetektion mittels eines Penta-His-Antikörpers und die Proteinreinigung über Ni²⁺-beladene Chelatsäulen. Durch den Erhalt des Phänotyps Mut⁺ können die Mutanten ebenso wie der Wirtstamm mit Methanol als Kohlenstoffquelle wachsen.

Zur Kontrolle des Experiments wurden der Wirtstamm *Pichia pastoris* X33 und eine Mutante PpHSA, die rekombinantes Humanserumalbumin produziert, analog zu den Mutanten PpCT3 und PpCT5 behandelt. Durch die Anzucht der Mutanten in BMGY-Medium wurde zunächst Zellmasse generiert. In diesem Medium betrug die Verdopplungszeit bei allen Kulturen 2 Stunden, was zeigt, dass die Integration der heterologen Gene in das Genom das Wachstum des Wirtstamms nicht beeinflusst. Die Expression wurde dann durch das Umsetzen der Zellen in BMMY-Medium mit 0,5% Methanol induziert. Gerade für die Expression sekretierter Proteine sind diese Medien besonders geeignet. Da sie phosphatgepuffert sind, kann der pH-Wert in einem weiten Bereich dem rekombinanten Protein angepasst werden und bleibt während der Expression weitgehend stabil. Durch den Zusatz von Hefeextrakt und Pepton werden sekretierte Proteine stabilisiert und ihre Proteolyse verringert. Das rekombinante Protein konnte im Medium auch nach der Konzentrierung nicht durch SDS-PAGE oder Western Analyse mit dem Penta-His-Antikörper nachgewiesen werden. Die Expression und Sekretion von rekombinatem Humanserumalbumin als Positivkontrolle wurde dagegen mit allen Methoden detektiert. Möglicherweise wird das Protein zwar exprimiert, aber nicht sekretiert. Deshalb wurden Zellen analog zum Medium analysiert. Auch die intrazelluläre Expression des rekombinanten Proteins war nicht eindeutig nachweisbar.

Da die Expressionsversuche nur in kleinem Maßstab (250 ml Kulturen) durchgeführt wurden, bleibt unklar, ob das rekombinante Protein überhaupt nicht oder nur in geringen Mengen exprimiert wird. Durch PCR wurde nachgewiesen, dass die cDNA im Genom der Mutanten integriert ist. Bei AT-reichen Genen wurde die vorzeitige Termination der Transkription beobachtet, die zu verkürzten mRNAs führt¹⁵⁶. Die Genprodukte werden in diesem Fall nicht vollständig exprimiert. Die cDNA, die in das *Pichia* Genom integriert wurde, ist in einigen Bereichen sehr AT-reich. Konsensussequenzen, welche die vorzeitige Termination und damit verkürzte mRNA-Transkripte verursachen könnten, sind in der cDNA-Sequenz zu finden. Das mRNA-Transkript für das rekombinante Protein wurde in Gesamt-RNA-Präparationen mit der Digoxigenin-VFM264-cDNA nachgewiesen (Abb. 3-14). Offensichtlich wird die mRNA für das rekombinante Protein gebildet. Im Vergleich zu der Positivkontrolle PpHSA wird jedoch nur wenig mRNA gebildet, was vermutlich auf den hohen AT-Gehalt zurückzuführen ist.

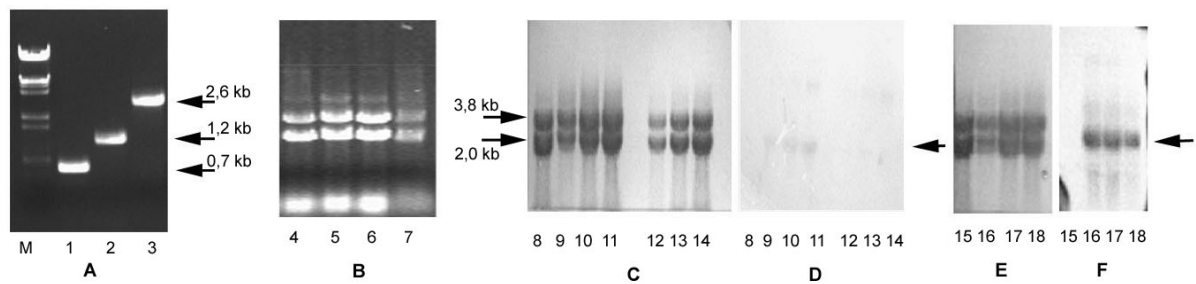


Abb. 3-14: Northern Analyse der Mutanten PpCT3 und PpCT5

Kontrollen wurden zum einen mit dem Wirtsstamm *Pichia pastoris* X33 und zum anderen mit der Mutante PpHSA durchgeführt.

A Synthese der markierten Digoxigenin-Hybridisierungssonden

Die Sonden wurden durch PCR mit dem PCR-DIG Probe Synthesis Kit (Roche) von der jeweiligen Plasmid-DNA amplifiziert. Die PCR erfolgte mit 30 Zyklen bei 50°C. 5 µl der Reaktionsansätze wurden auf einem 1,5% Agarosegel analysiert. **M**: DNA Längenstandard III (Roche); **1**: 20 ng Plasmid-DNA VFM 264 wurden als Template eingesetzt, Primer CT11.2s und CT12.2as; **2**: 20 ng Plasmid-DNA VFM 264 wurden als Template eingesetzt, Primer CT15s und CT16as; **3**: 6 ng Plasmid-DNA pPIC6α/HSA wurden als Template eingesetzt, Primer 3'AOX und 5'AOX

B Isolierung der Gesamt-RNA

RNA wurde nach Schmitt et al.¹⁵⁷ isoliert. 2 µl der isolierten RNA wurden auf einem 1,2% Formaldehyd-Agarosegel analysiert. **4**: PpCT5; **5**: PpCT3; **6**: PpHSA; **7**: *Pichia pastoris* X33

C, E Methylenblaufärbung der auf Nitrocellulose immobilisierten RNA

8: *P.p.* X33 50 µg RNA; **9-11**: PpCT3, 25 µg RNA (**9**), 50 µg RNA (**10**), 75 µg RNA (**11**); **12-14**: PpCT5, 15 µg RNA (**12**), 30 µg RNA (**13**), 45 µg RNA (**14**); **15**: *P.p.* X33 50 µg RNA; **16-18**: PpHSA, 15 µg RNA (**16**), 30 µg RNA (**17**), 45 µg RNA (**18**)

D, F Hybridisierung der immobilisierten RNA mit markierten Digoxigenin-Sonden

D: Hybridisierung mit der Digoxigenin-VFM264-Sonde; **F**: Hybridisierung mit der Digoxigenin-AOX-Sonde

Die RNA wurde mit 200 ng Digoxigenin-Sonden bei 43°C 36 h hybridisiert. Nach der Markierung wurden die Blots auf Hyperfilm βmax 17 h (PpHSA) bzw. 48 h (PpCT3 und PpCT5) exponiert. **8**: *P.p.* X33 50 µg RNA; **9-11**: PpCT3, 25 µg RNA (**9**), 50 µg RNA (**10**), 75 µg RNA (**11**); **12-14**: PpCT5, 15 µg RNA (**12**), 30 µg RNA (**13**), 45 µg RNA (**14**); **15**: *P.p.* X33 50 µg RNA; **16-18**: PpHSA, 15 µg RNA (**16**), 30 µg RNA (**17**), 45 µg RNA (**18**)

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht geklärt werden, warum das rekombinante Protein dennoch nicht exprimiert wird.

3.4.4 Datenbankrecherchen zur Identifizierung der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase und des zugehörigen Gens

Mit dem Fortschritt des *Dictyostelium*-Genomprojektes wurden die Sequenzinformationen in den Datenbanken laufend aktualisiert. Ein Teil der *de-novo* sequenzierten Peptide (Sequenzen 1-7, Tab. 3-4) konnte bereits dem Genprodukt einer cDNA zugeordnet werden. Nach der vollständigen Sequenzierung des Chromosom 2 wurde die Übereinstimmung aller 6 tryptischen Peptide und der 3 Peptide nach dem GluC-Verdau (Sequenzen 8-16, Tab. 3-4), die bis dahin nicht eindeutig zugeordnet werden konnten, mit dem Genprodukt einer chromosomalen DNA-Sequenz gefunden. 33% der zugehörigen Proteinsequenz wurden durch ESI-MS/MS sequenziert. In Tabelle 3-5 sind die Ergebnisse dieser Datenbankrecherchen zusammengestellt.

	Peptidsequenzen 8 – 16 ^(a)
Gen	DDB0203614
Chromosom	2
Locus	JC2V1_OC0002_12921
Position	329965 – 328839
Intronposition	35 – 61 und 628 – 803
Protein-ID^(b)	AAO50847
TrEMBL-Nummer^(c)	Q86KY3
Aminosäuren	307
MG [kDa]	35,8
pI (theoretisch)	7,2
Annotation	automatisch als hypothetisches Protein
Zuordnung^(d)	Inositoltrisphosphat (3)-Kinaseaktivität
Homologie^(d)	Inositolhexakisphosphatkinasen, Inositolphosphatmultikinasen, Inositoltrisphosphatkinasen, PiUS

Tab. 3-5: Ergebnisse der aktualisierten Datenbankrecherchen für die InsP₇-Kinase

Datenbankrecherchen wurden über *Dictyostelium*-Webseiten, über die Homepage der NCBI und der cDNA-Datenbank durchgeführt (Stand Mai 2004).

a Peptidsequenzen aus der *de-novo*-Sequenzierung der InsP₇-Kinase (Tab. 3-4)

b Identifizierungsnummer des Proteins in der NCBI-Datenbank

c Identifizierungsnummer des Proteins in der Swiss-Prot-Datenbank

d Die Zuordnung und Homologiesuchen erfolgten über BLAST-Suchen und über die *Dictyostelium*-Homepage

Zu diesem Gen existiert kein vollständiger cDNA-Klon. Das Gen trägt zwei Introns und codiert ein hypothetisches Protein (Abb. 3-15, S. 104), dem aufgrund von automatisierten Sequenzhomologiesuchen eine Inositoltrisphosphat (3)-Kinaseaktivität zugeordnet wird. Das Protein wurde zwischenzeitlich als Inositolpolyphosphat Multikinase (IPMK) annotiert. Diese Annotation wurde aber mit den laufenden Korrekturen der Genomsequenz wieder aus der *Dictyostelium*-Datenbank entfernt.

Sequenzanalysen dieses Proteins zeigten 40 – 50% Homologien und 25 – 30% Identität zu bekannten Inositolhexakisphosphatkinasen, Inositolphosphatmultikinasen und Inositoltrisphosphatkinasen in anderen Organismen. Insbesondere die Inositolphosphat- (Aminosäuren 69–84) und ATP-Bindestellen (Aminosäuren 228–234) wie auch die C-terminale Domäne (Aminosäuren 278–300), die für die katalytische Aktivität wichtig sein soll^{75,168}, weisen große Ähnlichkeiten zu Enzymen der Inositolphosphat-Kinasefamilie auf. Die Sequenzhomologien lassen jedoch nicht zwangsläufig den Rückschluss auf gleiche oder ähnliche katalytische Aktivitäten der Enzyme zu. Gerade in Bezug auf ihre katalytischen Aktivitäten und Substratspezifitäten sind die bekannten Inositolpolyphosphatkinasen sehr unterschiedlich. Eine Gemeinsamkeit aller Enzyme ist die Verwendung von ATP als Cosubstrat. Da in anderen Organismen weder die Strukturen der Substrate noch die der Produkte eindeutig bekannt sind, ist die Bezeichnung der Enzyme häufig irreführend oder ungenau.

Zum Vergleich sind die Informationen aus den aktualisierten Datenbankrecherchen für den cDNA-Klon in Tabelle 3-6 (S. 105) dargestellt. Dieses Gen ist seit der vollständigen Sequenzierung des *Dictyostelium*-Genoms ebenfalls als chromosomale Sequenz in der *Dictyostelium*-Datenbank zu finden. BLAST-Analysen ergaben die Zugehörigkeit des Proteins zu der Superfamilie der zinkabhängigen Alkoholdehydrogenasen. Es wurden Homologien zu NADP/NAD-abhängigen Oxidoreduktasen aus verschiedenen Organismen gefunden. Dagegen zeigten die Datenbankrecherchen keine Homologie zu bekannten Enzymen des Inositolphosphatstoffwechsels anderer Organismen.

ATG	AAT	GAA	CAA	AAT	AAA	TTT	CAA	GTT	GTA	GCA	GAA	CAA	GAA	GGT
M	N	E	Q	N	K	F	Q	V	V	A	E	Q	E	G
AAA	GTT	TTT	AAA	GAG	TGT	ACA	ATC	AAA	GAG	AAG	CAA	TTT	TAT	GAG
K	V	F	K	E	C	T	I	K	E	K	<u>Q</u>	<u>F</u>	<u>Y</u>	<u>E</u>
TCA	TTA	TCA	CCA	GAC	AAT	GAA	TTA	TCG	AAA	TTG	ATA	CCC	AAA	TAT
<u>S</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>P</u>	<u>K</u>	<u>Y</u>
TAT	GGT	ACA	GTG	ATA	CAA	GAT	GGT	AAG	GAA	TGG	ATA	GTG	TTG	GAA
<u>Y</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>I</u>	<u>Q</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	<u>E</u>	W	I	V	L	E
GAT	TTA	ACC	TAT	GGA	TAT	AGT	AAA	CCA	AAT	ATA	ATG	GAT	ATT	AAA
<u>D</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>Y</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>P</u>	<u>N</u>	<u>I</u>	<u>M</u>	<u>D</u>	I	K
TTA	GGT	CTA	TCA	CAT	CAT	GAT	GTA	GAT	TTA	GAG	ACT	ATC	TAT	AGT
L	G	L	S	H	H	D	V	D	L	E	<u>T</u>	<u>I</u>	<u>Y</u>	<u>S</u>
CCA	CCA	TCA	TCC	AAT	GAT	CCA	AAT	GTA	AAC	TTT	GAA	ACT	TTA	AAA
<u>P</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>P</u>	<u>N</u>	<u>V</u>	<u>N</u>	<u>F</u>	<u>E</u>	T	L	K
CGA	CAA	GCA	AAC	ATG	TCA	CTC	CAT	AAG	GAA	CTC	TAT	GAA	AGT	TGG
R	Q	A	N	M	S	L	H	K	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>Y</u>	<u>E</u>	<u>S</u>	<u>W</u>
TTA	CTT	TCA	AAA	TAT	ATA	ACC	ACT	CCA	AAA	CTT	GGT	TTT	TGT	GTT
<u>L</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	Y	I	T	T	P	K	L	G	F	C	V
TGC	GGA	TCA	CAA	AAA	TAT	AAT	TGT	TGT	ACC	AAT	CAA	TTG	GAA	AAG
C	G	S	Q	K	Y	N	C	C	T	N	Q	L	E	K
ATT	CAA	AAA	GAA	CAA	GGT	CGT	ACA	TTC	ACT	GCA	GTC	ACT	GTA	AAA
I	Q	K	E	Q	G	R	T	F	T	A	V	T	V	K
GAT	AAA	CTT	TAT	GAT	TTC	TTT	CAT	AAT	GGT	ATA	AAA	TTT	AGA	CCT
D	K	<u>L</u>	<u>Y</u>	<u>D</u>	<u>F</u>	<u>F</u>	<u>H</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>I</u>	<u>K</u>	F	R	P
GAA	ATC	ATT	GAA	TCA	ATG	ATA	AAT	AGA	TTA	TCA	TTA	TTT	AAA	GAC
E	I	I	E	S	M	I	N	R	L	S	L	F	K	<u>R</u>
TTT	TTT	GAA	AAT	AAT	CCT	GAT	TAT	AGA	TTT	AGA	TCA	ACA	TCA	ATT
<u>F</u>	<u>F</u>	<u>E</u>	<u>N</u>	<u>N</u>	<u>P</u>	<u>D</u>	<u>Y</u>	<u>R</u>	F	R	S	T	S	I
TTA	TTC	CTT	TAT	GAA	GGT	GAT	TGC	GAA	TTT	AGT	AAT	AGA	TGT	GAT
L	F	L	Y	E	G	D	C	E	F	S	N	R	C	D
ATT	AGA	TTA	ATT	GAT	TTC	ACT	CAT	ACC	AAA	CTT	TAT	CCA	TCT	CAT
I	R	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>D</u>	<u>F</u>	<u>T</u>	<u>H</u>	<u>T</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>Y</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	H
ATG	AAA	CCA	CAT	TCT	TCA	AAA	CTG	TCA	CAT	TAC	AAA	TCT	ATT	GAT
M	K	P	H	S	S	K	L	S	H	Y	K	S	I	D
GTA	AAT	AAT	ATT	GAT	TCA	AAA	ACT	ACT	TCC	ATC	ACC	TCT	GGT	TTC
V	N	N	I	D	S	K	T	T	S	I	T	S	G	F
GAT	CAT	GAA	ACT	TAT	TTC	CCA	ATC	GAT	GGT	GGT	TAT	TTA	TTT	GGT
D	H	E	T	Y	F	P	I	D	G	G	Y	L	F	G
ATC	ACA	AAT	CTT	TTA	AAA	ATT	TTA	AAT	TCT	TTA	AAA	AAT	AAA	CAA
I	T	N	L	L	K	I	L	N	S	L	K	N	K	Q
CAA	CCT	CAA	CAA	CCA	CAA	AAA	TAA							
Q	P	Q	Q	P	Q	K	*							

Abb. 3-15: Nukleotid- und Aminosäuresequenz der InsP₇-Kinase

Fett und unterstrichen dargestellt sind die Aminosäuren, die durch ESI-MS/MS nach tryptischem „In-Gel-Verdau“ der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinasebande ermittelt wurden. Kursiv und unterstrichen sind die Aminosäuresequenzen, die nach dem GluC-Verdau ermittelt wurden. Gepunktet unterstrichen dargestellt sind die Aminosäuren, die zusätzlich durch MALDI-MS/MS und Edmanabbau abgesichert sind. (Sequenzdaten aus dictyBase <http://www.dictybase.org/> April 2004)

Peptidsequenzen 1 – 7^(a)	
Gen	DDB0186919
Chromosom	4
Locus	BC4V1_OC0087_13468
Position	4183280 – 4182262
cDNA	VFM 264 NIG-ID ddv25016
Aminosäuren	338
MG [kDa]	37,2
pI (theoretisch)	7,6
Annotation	automatisch als hypothetisches Protein
Zuordnung^(b)	Superfamilie der zinkabhängigen Alkoholdehydrogenasen
Homologie^(b)	NADP/NAD abhängigen Oxidoreduktasen

Tab. 3-6: Ergebnisse der aktualisierten Datenbankrecherchen für die cDNA

Datenbankrecherchen wurden über *Dictyostelium*-Webseiten, über die Homepage der NCBI und der cDNA-Datenbank durchgeführt. (Stand Mai 2004)

a Peptidsequenzen aus der *de-novo*-Sequenzierung der InsP₇-Kinase (Tab. 3-4)

b Die Zuordnung und Homologiesuchen erfolgten über BLAST-Suchen und über die *Dictyostelium*-Homepage

Aufgrund der Ergebnisse der Datenbankrecherchen und Sequenzvergleiche in Kombination mit der massenspektrometrischen Sequenzierung ist das auf dem Chromosom 2 lokalisierte Gen das 6-PP-InsP₅-(5)-Kinasegen. Damit ist gleichzeitig davon auszugehen, dass offensichtlich zwei Proteine, zum einen die InsP₇-Kinase und zum anderen das Genprodukt des cDNA-Klons VFM 264, elektrophoretisch nicht getrennt werden konnten und deshalb beide sequenziert wurden. Auf der Basis der DNA-Sequenzen allein können keine posttranslationalen Modifikationen bestimmt werden, die sowohl das Molekulargewicht wie auch den isoelektrischen Punkt von Proteinen verändern können. Deshalb ist es durchaus möglich, dass beide Proteine ein sehr ähnliches Verhalten während der ein- und zweidimensionalen Gelelektrophorese zeigen, da sie sich in ihrer Größe und dem pI-Wert nicht wesentlich unterscheiden.

Vor kurzem wurde in *Dictyostelium* eine InsP₆-Kinase ausschließlich durch Datenbankrecherchen und die Analyse des Inositolphosphatmusters von Mutanten nach der Gendeletion identifiziert⁷². Die InsP₆-Kinase wurde bisher nicht biochemisch charakterisiert. Auch die InsP₆-Kinase (DDB0206196) aus *Dictyostelium* zeigt Homologien zu den bekannten Enzymen der InsP₆-Kinasefamilie. Sie ist jedoch mit 716 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 81 kDa wesentlich größer als die InsP₇-Kinase. Die Aminosäuresequenzen dieser beiden Enzyme wurden direkt miteinander verglichen (Abb. 3-16). Beide Enzyme besitzen die konservative Inositolphosphat- und ATP-Bindestelle. Außerdem ist die C-terminale Domäne in beiden Enzymen homolog.

Offensichtlich sind am Stoffwechsel der hochphosphorylierten Inositolphosphate in *Dictyostelium* mindestens zwei Enzyme beteiligt. Inwiefern sie unterschiedliche Aktivitäten besitzen und unterschiedliche Funktionen im Organismus erfüllen, kann nur durch die Charakterisierung der InsP₆-Kinase einerseits und andererseits durch die Deletion des InsP₇-Kinasegens mit der nachfolgenden phänotypischen Untersuchung der Mutanten geklärt werden.

3.4.6 Kritische Betrachtung der Versuche zur Genidentifizierung der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase

Auf dem Chromosom 2 wurde durch Datenbankrecherchen ein Gen gefunden, dessen Genprodukt mit sehr großer Wahrscheinlichkeit die InsP₇-Kinase ist. Von der Proteinsequenz wurden 33% durch Tandemmassenspektrometrie und Edmanabbau sequenziert. Inzwischen kann die InsP₇-Kinase sowohl über ihren charakteristischen Massenfingerprint wie auch über die Peptidmassenfingerprints identifiziert werden. Die Kinase zeigt Homologien zu bekannten Enzymen der Inositolphosphat-Kinasefamilie, wie die konservative Inositolphosphatbindestelle, die ATP-Bindestelle und die katalytisch relevante C-terminale Domäne. Auch nach der vollständigen Sequenzierung des *Dictyostelium*-Genoms können keine weiteren Sequenzen mit allen bisherigen Ergebnissen in Einklang gebracht werden. Berücksichtigt man die Ergebnisse der Datenbankrecherchen (s. Kap. 3.4.4) lassen sich auch die bisherigen Resultate der Versuche zur Genidentifizierung erklären.

Ausgehend von den Peptidsequenzen LIDFTHTK und DFFENNPDYR konnte das Gen der InsP₇-Kinase nicht über PCR von genomischer DNA amplifiziert werden. Beide Peptidsequenzen wurden sowohl massenspektrometrisch über ESI-MS/MS und MALDI-

MS/MS wie auch durch Edmansequenzierung ermittelt und können deshalb eindeutig der InsP₇-Kinase zugeordnet werden. Auf chromosomaler Ebene wird jedoch das codierende Gen genau an der Stelle, deren Translation die Peptidsequenz DFFENNP DYR ergibt, durch ein Intron unterbrochen. Der von dieser Peptidsequenz abgeleitete Primer konnte somit unabhängig von seiner Degenerierung nicht an dieser Stelle der DNA-Sequenz binden.

Die Inositolphosphatbindestelle, die innerhalb der InsP₇-Kinasesequenz den Aminosäuren 69–86 zugeordnet werden kann, zeigt zwar Homologien zu den entsprechenden Sequenzen der InsP₆-Kinasen anderer Organismen, ist aber nicht identisch mit der Bindestelle, die von den InsP₆-Kinasen bekannt ist (Abb. 3-17). Deshalb konnte durch PCR mit einem degenerierten Primer, der von dieser Sequenz abgeleitet wurde, kein DNA-Fragment amplifiziert werden.

InsP ₆ -Kinasen	PCVLDLKMGRQHGDDAS
InsP ₇ -Kinase	69 PNIMDIKLGSLSHHDVDLE 86
	* * * * *
Konsensus	PxxxDxKxGxxxHxxD

Abb. 3-17: Blockalignment der konservierten Sequenzen der Inositolphosphatbindestelle

* identische Aminosäuresequenzen; x variable Aminosäuren

Offensichtlich wird mit der InsP₇-Kinase ein weiteres Protein angereichert, das ähnliche physikalische Eigenschaften besitzt und aufgrund seines elektrophoretischen Verhaltens nicht von der InsP₇-Kinase getrennt werden kann. Durch Datenbankrecherchen konnte diesem Protein ein cDNA-Klon zugeordnet werden, der das komplette codierende Gen trägt. Mit spezifischen Primern konnte das Gen von genomischer DNA amplifiziert werden. Nach der Integration dieses Gens in das *Pichia pastoris* Genom wurde durch Hybridisierung die entsprechende mRNA nachgewiesen. Die Expression des rekombinanten Proteins konnte nicht belegt werden. Dabei bleibt unklar, ob die Proteinmenge oder die Expression und Sekretion des Proteins die Ursache ist. InsP₇-Kinaseaktivität wurde nicht nachgewiesen. Das Protein zeigt keine Homologien zu Enzymen des Inositolphosphatstoffwechsels, somit kann sicher ausgeschlossen werden, dass die cDNA für ein Enzym des Stoffwechsel der hochphosphorylierten Inositolphosphate codiert. Vielmehr gehört das Genprodukt der cDNA zur Superfamilie der zinkabhängigen Alkoholdehydrogenasen und zeigt Homologien zu NADP/ NAD-abhängigen Oxidoreduktasen.

3.5 Experimente zu physiologischen Funktionen der Diphosphoinositolphosphate

Die physiologische Bedeutung der Diphosphoinositolphosphate ist bislang nicht eindeutig geklärt worden (s. auch Kap. 1.5.3). Eine mögliche Funktion als Energiespeichermoleküle ist u. a. aufgrund der intrazellulären Konzentrationen der PP-InsPs sowohl in *Dictyostelium* wie auch in höheren Organismen auszuschließen. Diphosphoinositolphosphate binden mit hoher Affinität an Proteine, die an endocytotischen Prozessen, wie z.B. dem Clathrinassembly, beteiligt sind. In höheren Organismen wurde gezeigt, dass durch die Bindung und Dephosphorylierung gebundener PP-InsPs der Membranfluss moduliert wird. Diese Vorstellung wäre gerade für *Dictyostelium*, einem professionellen Phagozyten, besonders interessant. Die Untersuchung der Endo- und Exocytose von *Dictyostelium*-Mutanten, die nach der Deletion des InsP₆-Kinasegens InsP₇ und InsP₈ nicht mehr synthetisieren, zeigte aber keine Unterschiede zum Wildtyp. Diese Metabolite können demnach keine essentielle Rolle bei endocytotischen Prozessen in *Dictyostelium* spielen. Ebenso unwahrscheinlich ist in *Dictyostelium* eine Beteiligung der Diphosphoinositolphosphate an DNA-Reparaturmechanismen und dem mRNA-Transport, die für Hefen und andere Organismen gezeigt oder postuliert wurde. Auch hier wurden keine phänotypischen Unterschiede zwischen den gendefekten Mutanten und dem Wildtyp festgestellt⁷².

Eine denkbare Funktion der Diphosphoinositolphosphate könnte aufgrund ihrer intrazellulären Konzentrationen und ihrer hohen Phosphatgruppenübertragungspotentiale die spezifische Phosphorylierung von Proteinen oder Enzymen sein. Viele Regulationsmechanismen von Enzymaktivitäten oder die Modulation von Rezeptoren durch Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen, bei denen ATP als spezifischer Phosphatgruppendonator dient, sind bekannt. Die Rolle der Diphosphoinositolphosphate als spezifische Phosphatgruppenüberträger wurde in der Vergangenheit mehrfach diskutiert, konnte aber bislang nicht nachgewiesen werden. Diphosphoinositolphosphate könnten molekulare Schalterfunktionen übernehmen oder möglicherweise eine neue Klasse von Signaltransduktoren darstellen. Ein Ansatz war im Rahmen dieser Arbeit die Untersuchung der Phosphorylierung von Proteinen durch PP-InsPs.

Die 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase wurde aufgrund ihrer enzymatischen Aktivität zur Synthese von isotopenmarkiertem 5-PP-InsP₅ und 5,6-bis-PP-InsP₄ eingesetzt. Die Substratspezifität der InsP₇-Kinase führt mit [γ -³²P]-ATP als Cosubstrat zur Markierung der β -Phosphatgruppe in 5-Position. Nach der säulenchromatographischen Reinigung wurden [β -³²P-5]-PP-InsP₅ und [β -³²P-5],6-bis-PP-InsP₄ mit einer Ausbeute von 95% und einer hohen spezifischen Aktivität > 2000 Ci/mmol erhalten.

In einem Vorversuch¹²⁷ konnte bereits gezeigt werden, dass Proteinbanden in Zellextrakten von *Dictyostelium* radioaktiv markiert werden, nachdem die Proteine mit [β -³²P-5],6-bis-PP-InsP₄ inkubiert wurden. Eine Markierung der Proteine durch [γ -³²P]-ATP wurde unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht detektiert. Möglicherweise ist die lange Inkubationszeit der Zellextrakte die Ursache dafür, dass die Phosphorylierung von Proteinen durch [γ -³²P]-ATP hier nicht nachweisbar ist. Die Regulation spezifischer Zellaktivitäten in *D. discoideum* (z.B. Rezeptoren, Proteine des Cytoskeletts, Enzyme) durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung über ATP erfolgt in der Regel sehr schnell. Radioaktive Markierungen von Myosin¹⁵⁸, MLCK (Myosin light chain Kinase) und MLCP (Myosin light chain Phosphatase)¹⁵⁹ mit [γ -³²P]-ATP sind zum Teil schon nach einer Inkubationszeit von wenigen Sekunden bis maximal 20 Minuten detektierbar. Weitere Beispiele für sehr schnelle Phosphorylierungen sind die des cAMP-Rezeptors in der Plasmamembran (5-10 s) und der P36-Phosphatase, deren Dephosphorylierung dazu führt, dass sie bereits nach 7 Minuten Inkubationszeit nicht mehr radioaktiv markiert ist¹⁶⁰.

Die weitere Untersuchung von cytosolischen und Membranproteinen deutete auf eine stärkere Markierung von Membranproteinen hin (Abb. 3-18). PP-InsPs dienen möglicherweise der Regulation oder Adaption von Rezeptorsensibilitäten. Rezeptoren sind entweder membranassoziiert oder integrale Membranproteine. Deshalb wurden insbesondere Membranpräparationen näher untersucht.

Die erste Vermutung einer spezifischen enzymkatalysierten Phosphorylierung von Proteinen, die sich zum einen aus der scheinbaren Zeitabhängigkeit der Proteinmarkierungen und zum anderen aus dem Auftreten einer markierten 44 kDa-Proteinbande in Anwesenheit von Phosphataseinhibitoren ergab, konnte durch die Analyse der Membranproteinmarkierungen nicht bestätigt werden. Wenn Phosphatgruppen enzymkatalysiert übertragen werden, sollte nach der Inkubation von denaturierten Proteinextrakten keine Markierung mehr erscheinen. Es wurden aber markierte Proteinbanden nach der Inkubation denaturierter

Zellextrakte detektiert. Offensichtlich treten unter den Inkubationsbedingungen unspezifische Wechselwirkungen auf, die mögliche spezifische Proteinphosphorylierungen überlagern. Denkbar wäre eine chemische Reaktion der Anhydridbindung der Diphosphatgruppen mit reaktiven Aminosäureseitenketten oder mit Zuckerresten der häufig glykosylierten Membranproteine. Dies würde gleichzeitig die stärkere Markierung von Membranproteinen erklären.

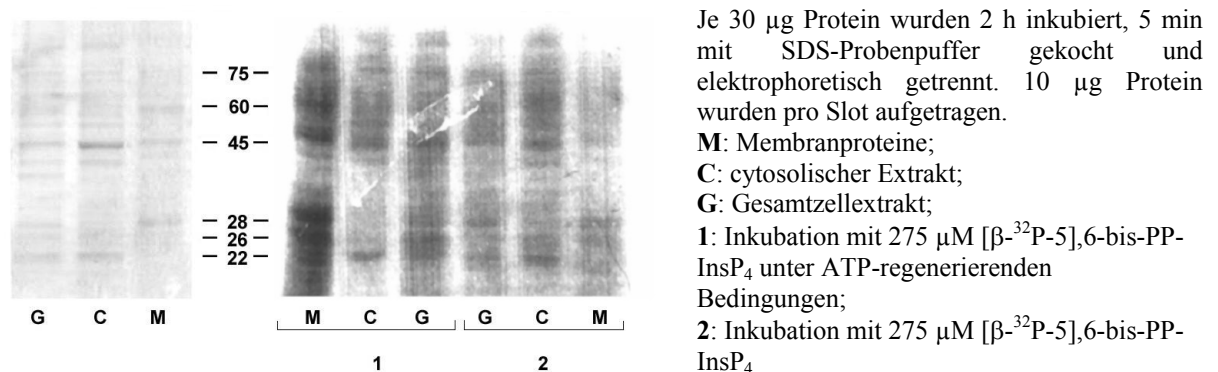


Abb. 3-18: Elektropherogramm und Autoradiogramm der inkubierten Zellextrakte

Auch die Variation der Versuchsbedingungen, wie der Zusatz von Ca^{2+} -Ionen, die Solubilisierung von Membranproteinen durch EDTA oder NaCl, unterschiedliche Protein- und Diphosphoinositolphosphatkonzentrationen, und der Vergleich der Markierungen durch [β - ^{32}P -5]-PP-InsP₅ und [β - ^{32}P -5],6-bis-PP-InsP₄ gaben keine weiteren Hinweise auf eine spezifische Proteinphosphorylierung durch PP-InsPs. Vielmehr zeigen die Elektropherogramme und Autoradiogramme sehr ähnliche Bandenmuster bei allen inkubierten Proteinextrakten. Die Stärke der Markierung korreliert auffällig mit den Proteinmengen, was wiederum für eine unspezifische Wechselwirkung unter den Bedingungen spricht. Dennoch kann aufgrund dieser Ergebnisse eine physiologische Funktion der Diphosphoinositolphosphate als spezifische Phosphatgruppendonoren nicht ausgeschlossen werden. Des Weiteren wäre auch denkbar, dass die Diphosphoinositolphosphate über ionische Wechselwirkungen an Proteine binden. Die Regulation von Enzymaktivitäten oder Rezeptorsensibilitäten könnte dann durch die spezifische Phosphorylierung oder Dephosphorylierung der gebundenen PP-InsPs erfolgen.

Die molaren Konzentrationen der PP-InsPs in Dictyosteliden lassen sich aus den nachgewiesenen Stoffmengen und dem durchschnittlichen Zellvolumen berechnen. Inwiefern diese Konzentrationen die intrazellulären Konzentrationen freier PP-InsPs *in vivo* wiedergeben, ist nicht bekannt. Vor allem die Konzentration von InsP₇ wurde nur als Summe

der Isomerenkonzentrationen von 5- und 6-PP-InsP₅ bestimmt. Zellen der spätexponentiellen Wachstumsphase enthalten neben 90% 6-PP-InsP₅ ca. 10% 5-PP-InsP₅⁶. Ob sich das Verhältnis der Isomere im Verlauf des Lebenszyklus verändert, wurde bisher nicht untersucht. Vegetative Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase enthalten ca. 12 µM InsP₇ und InsP₈. Die intrazelluläre Konzentration der PP-InsPs steigt in der spätexponentiellen Wachstumsphase der Zellen und erreicht ca. 80 µM InsP₇ bzw. 200 µM InsP₈ in der stationären Phase. Eine weitere Anreicherung dieser Metabolite wird in der Differenzierungsphase beobachtet. Konzentrationen von 200 µM InsP₇ bzw. 400 µM InsP₈ konnten hier nachgewiesen werden. Während der Sporengermination sinken die Diphosphoinositolphosphatkonzentrationen sehr schnell wieder auf 12 µM⁶³. Der Konzentrationsverlauf der PP-InsPs in vegetativen Zellen korreliert auffällig mit dem Prestarvation Response, der zur Expression differenzierungsabhängiger Proteine führt¹⁶¹. Möglicherweise besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der lebenszyklusabhängigen Konzentrationsänderung der PP-InsPs und der differenzierungsabhängigen Proteinexpression, der regulatorische Funktionen der hochphosphorylierten Inositolphosphate belegen würde. Extensive Proteinphosphorylierung treten in verschiedenen Phasen des Lebenszyklus von *Dictyostelium* auf, so z.B. während der Sporengermination¹⁶².

Eine neuere Studie belegt die regulatorische Beteiligung von InsP₇ an der Chemotaxis von *Dictyostelium* Zellen⁷². Die Zellaggregation, die unter Hungerbedingungen induziert wird, erfordert die Expression von Proteinen, die an der Chemotaxis und der Zelldifferenzierung beteiligt sind. Es konnte gezeigt werden, dass InsP₇ mit PtdIns(3,4,5)P₃ um die Bindung an Proteine konkurriert, die Pleckstrin-homologe Domänen aufweisen. Diese Proteine treten bevorzugt membranassoziiert auf¹⁶³. Auch die Phosphorylierung chemotaktischer Rezeptoren^{160,164} wurde bereits in der Literatur beschrieben. In diesem Zusammenhang steht außerdem die Phosphorylierung von Myosin I¹⁶⁵ und der regulatorischen leichten und schweren Myosin II-Ketten^{166,167}. Bei allen beschriebenen Proteinphosphorylierungen spielt offensichtlich cAMP eine entscheidende Rolle. Die Konzentrationen der PP-InsPs sind ebenfalls cAMP-abhängig. Insofern ist durchaus denkbar, dass in *Dictyostelium* entweder die Phosphorylierungen solcher Proteine durch hochphosphorylierte Inositolphosphate oder die Bindung der Metabolite an diese Proteine zu ihrer Modulation führen könnten.

3.6 Stoffwechsel von Diphosphoinositolphosphaten

Der Stoffwechsel der Diphosphoinositolphosphate in *Dictyostelium discoideum* konnte bisher nicht vollständig aufgeklärt werden. Zwei Enzyme, die an diesem Stoffwechsel beteiligt sind, wurden in *D. discoideum* identifiziert. Die bereits charakterisierte InsP₇-Kinase katalysiert neben der Phosphorylierung von 6-PP-InsP₅ zu 5,6-bis-PP-InsP₄ die Phosphorylierung von InsP₆ zu 5-PP-InsP₅. InsP₆ ist ein wesentlich schlechteres Substrat der Kinase und das Endprodukt der Reaktion wird nicht weiter phosphoryliert. Diese Nebenaktivität scheint in *D. discoideum* eine dead-end-Reaktion zu sein. Vergleicht man die Dephosphorylierungsreaktion von 5-PP-InsP₅ mit der Phosphorylierungsreaktion von 6-PP-InsP₅ so stehen die Substrataffinitäten der Kinase und die Wechselzahlen der Substrate im Einklang mit dem intrazellulären Konzentrationsverhältnis der InsP₇-Isomere von 9:1.

Inzwischen wurde eine InsP₆-Kinase, die möglicherweise das fehlende Bindeglied zwischen InsP₆ und InsP₈ darstellt, in *D. discoideum* identifiziert⁷². Die Deletion des Kinasegens führte zu einem veränderten Diphosphoinositolphosphatspektrum. Während die InsP₆-Konzentration weitgehend konstant bleibt, wurden nur noch sehr geringe Konzentrationen von InsP₇ detektiert. Diese InsP₇-Synthese kann möglicherweise aus der Nebenaktivität der InsP₇-Kinase resultieren. Logischerweise entsteht kein InsP₈, da das Substrat der InsP₇-Kinase vollständig fehlt. Die InsP₆-Kinaseaktivität wurde durch Inkubation von lysierten Zellen mit [³H]InsP₆ und anschließende HPLC-Analytik nachgewiesen. Das Enzym wurde allerdings nicht weiter charakterisiert.

In anderen Organismen wurden ähnliche Enzyme identifiziert, die am Stoffwechsel der Diphosphoinositolphosphate beteiligt sind. Eine Familie von Inositolhexakisphosphatkinasen, die unter anderem die Phosphorylierung von InsP₆ zu InsP₇ katalysiert, ist bekannt. In Rattengewebe wurde diese enzymatische Aktivität von der InsP₇-Kinaseaktivität, durch die InsP₇ zu InsP₈ phosphoryliert wird, separiert⁴⁹. Weitere Enzyme wie die Multiplen Inositol Polyphosphat Phosphatasen und die Diphosphoinositol Polyphosphat Phosphohydrolasen, die vor allem für den Abbau der Diphosphoinositolphosphate verantwortlich sind, wurden ebenfalls gefunden. Hier sind jedoch, wie bereits erwähnt, die entsprechenden Substrate strukturell nicht eindeutig identifiziert.

3.6.1 Inkubationen von cytosolischen Zellextrakten

Da der Nachweis der Verbindung zwischen dem Stoffwechsel der niedrig phosphorylierten Inositolphosphate und dem Stoffwechsel der hochphosphorylierten Inositolphosphate in *D. discoideum* auf der enzymatischen Ebene noch fehlt, wurde nach entsprechenden Enzymaktivitäten in Zellextrakten gesucht.

Aus Studien mit Säugetierzellen sind weitere diphosphorylierte Metabolite wie PP-InsP₄ und bis-PP-InsP₃ bekannt. Die Familie der Inositolhexakisphosphatkinasen^{76,77,144} katalysiert die Phosphorylierung von InsP₆ zu PP-InsP₅. Das Reaktionsprodukt ist vermutlich 5-PP-InsP₅. Gleichzeitig wird auch Ins(1,3,4,5,6)P₅ zu PP-InsP₄ und dieses weiter zu bis-PP-InsP₃ phosphoryliert. Die Strukturen dieser Diphosphoinositolphosphatisomere sind jedoch nicht bekannt. Der Phosphataufnahme-Stimulator PiUS⁷⁸ ist ebenfalls eine InsP₆-Kinase, welche die Phosphorylierung von InsP₆ zu PP-InsP₅ katalysiert. Die Inositolphosphatmultikinase, auch IPMK genannt, phosphorylieren eine Reihe von Inositolphosphaten. Eine IPMK aus der Ratte⁷⁴ katalysiert u.a. die Phosphorylierung von Ins(1,3,4,5,6)P₅ zu PP-InsP₄. Dieses Enzym kann Substrate in 1-, 3- oder 6-Position angreifen. Eine rekombinante menschliche IPMK^{74,168} katalysiert dagegen nur die Phosphorylierung in 3- und 6-Position. Auch hier wurden PP-InsP₄-Isomere als Reaktionsprodukte beobachtet. Im Gegensatz zu den beiden Enzymen zeigt die IPMK aus *Saccharomyces cerevisiae* diese Aktivität nicht⁷⁵. PP-InsP₄ und bis-PP-InsP₃ könnten möglicherweise Vorstufen von PP-InsP₅ bzw. bis-PP-InsP₄ sein.

Die Existenz dieser Metabolite konnten in Zellextrakten von *Dictyostelium* nicht mit der HPLC-MDD-Analytik nachgewiesen werden. Um die Hydrolyse der Diphosphatgruppen dieser Verbindung unter den stark sauren Aufschlussbedingungen (s. auch Kap. 2.3.1) auszuschließen, wurden InsP₇ und InsP₈ im pH-Bereich von 1 - 12 inkubiert. Es konnte kein Abbau der Diphosphatgruppen festgestellt werden. Die Diphosphatgruppen werden jedoch in Anwesenheit von HCl-Spuren während der Gefriertrocknung vollständig zersetzt.

Partiell gereinigte cytosolische Extrakte wurden mit InsP₆, 5-PP-InsP₅ und 6-PP-InsP₅ unter ATP-regenerierenden Bedingungen inkubiert. Identische Proben wurden mit InsP₆, 5-PP-InsP₅, 6-PP-InsP₅, 3,5-bis-PP-InsP₄ und 5,6-bis-PP-InsP₄ unter ADP-regenerierenden Bedingungen inkubiert.

Bei der Untersuchung der cytosolischen Extrakte nach der Kationen- bzw. Anionenaustauschchromatographie und der InsP₆-Affinitätschromatographie, den Reinigungsschritten für die InsP₇-Kinase, konnte die Phosphorylierung von InsP₆ zu 5-PP-InsP₅ sowie die

Phosphorylierung von 6-PP-InsP₅ zu 5,6-bis-PP-InsP₄, die auf die bereits bekannte Enzymaktivitäten der InsP₇-Kinase zurückzuführen sind, nachgewiesen werden. Es wurden keine weiteren anabolen Enzymaktivitäten unter ATP-regenerierenden Bedingungen gefunden. Unter ADP-regenerierenden Bedingungen wurde die Dephosphorylierung von 5-PP-InsP₅ zu InsP₆, von 3,5-bis-PP-InsP₄ und 5,6-bis-PP-InsP₄ zu 3-PP-InsP₅ bzw. zu 6-PP-InsP₅ nachgewiesen. Weitere katabole Enzymaktivitäten wurden nicht festgestellt.

Möglicherweise werden entsprechende Enzyme durch die partielle Anreicherung der Rohextrakte abgetrennt. In weiteren Versuchen wurden Zellextrakte von axenisch gewachsenen Zellen sowohl in der logarithmischen als auch in der spätexponentiellen Wachstumsphase untersucht. Aliquots der Zellextrakte wurden durch Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose vorgereinigt, um störende Inositolphosphate zu entfernen. Unter den gewählten Bedingungen werden von der Q-Sepharose kaum Proteine retardiert. Die so erhaltenen Rohextrakte wurden direkt inkubiert. Des Weiteren wurden die Proteine vollständig gefällt und resuspendiert. Auch bei der Inkubation dieser Proben wurden keine weiteren Enzymaktivitäten gefunden.

3.6.2 Inkubationen von Kernpräparationen

Neben dem im Cytosol lokalisierten Stoffwechsel der Inositolphosphate ist ein aktiver kernassoziierter Stoffwechselweg zum InsP₆ in *Dictyostelium* bekannt³⁶. In Hefezellen konnte außerdem die Beteiligung von InsP₆ an essentiellen Prozessen wie dem DNA-Repair und dem mRNA-Transport nachgewiesen werden. Ein stärkerer Effekt durch InsP₇ bzw. InsP₈ wird vermutet, konnte aber aufgrund der schlechten Verfügbarkeit dieser Metabolite nicht genauer untersucht werden⁵⁵. Da diese Prozesse bei *Dictyostelium* ebenfalls kernassoziiert stattfinden, kann angenommen werden, dass die beteiligten Metabolite im Kern vorhanden sein müssen. Ein Transportshuttle für die Inositolphosphate über die Kernmembran ist nicht bekannt, deshalb sollten die in der Synthese und dem Abbau von hochphosphorylierten Inositolphosphaten involvierten Enzyme auch im Kern zu finden sein.

Diphosphoinositolphosphate konnten in Kernextrakten nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise sind die Konzentrationen dieser Metabolite so gering, dass sie mittels HPLC-MDD-Analytik nicht detektiert werden können. Des Weiteren wäre auch denkbar, dass während der Präparation der Kerne die Diphosphoinositolphosphate über die Kernporen passiv ausgeschleust werden und deshalb nicht detektiert wurden. Bei der Inkubation von

Kernextrakten mit den entsprechenden Substraten wurde kein enzymatischer Umsatz von InsP₆, InsP₇- oder InsP₈-Isomeren festgestellt.

In *D. discoideum* konnte unter den gewählten Bedingungen kein weiterer anaboler oder kataboler Stoffwechsel der Diphosphoinositolphosphate *in vitro* nachgewiesen werden. Eine Ursache kann die mögliche Instabilität der beteiligten Enzyme sein. Die InsP₇-Kinase gehört zu den Enzymen in *Dictyostelium*, die nur in geringer Kopienzahl vorliegen. Ein Nachweis der Enzymaktivität ist aufgrund der geringen Konzentration des Enzyms in Rohextrakten recht schwierig. Es ist nicht auszuschließen, dass andere am Stoffwechsel der Diphosphoinositolphosphate beteiligte Enzyme in ebenso geringen Konzentrationen auftreten. Damit würde der Nachweis der entsprechenden Enzymaktivität in Rohextrakten erschwert. Ebenso denkbar ist, dass die beteiligten Enzyme weitere Kofaktoren benötigen, die nicht bekannt sind und dementsprechend nicht zugesetzt wurden. Auch die Inhibierung der Enzyme durch noch vorhandene Inositolphosphate oder die zugesetzten Substrate kann dazu führen, dass entsprechende Enzymaktivitäten nicht mehr nachgewiesen werden können.

3.6.3 Versuch des immunochemischen Nachweises einer Inositolhexakisphosphatkinase in *D. discoideum*

Selbst eine geringe Enzymkonzentration kann möglicherweise durch empfindlichere immunochemische Methoden nachgewiesen werden. Ein Inositolhexakisphosphatkinase-Antikörper ist kommerziell erhältlich. Dieser Antikörper ist polyklonal und spezifisch gegen eine 18 Aminosäuren lange Peptidsequenz (PCVLDLKMGRQHGDDAS) aus InsP₆-Kinasen in Rattengewebe gerichtet. Mit diesem Antikörper wurden sowohl InsP₆-Kinasen in verschiedenen Rattengeweben als auch menschliche InsP₆-Kinasen nachgewiesen^{76,77}. *Dictyostelium*-spezifische Datenbankrecherchen zeigten, dass diese Peptidsequenz homolog, aber nicht identisch zu Proteinsequenzen in *Dictyostelium* ist. Da das Genom jedoch nicht vollständig sequenziert war, wurde mit Hilfe dieses Antikörpers versucht, eine mögliche InsP₆-Kinase in *Dictyostelium* zu identifizieren. Dazu wurden cytosolische Zellextrakte nativ und denaturiert auf Nitrocellulosemembranen immobilisiert. Weitergehend wurden die Proteingemische elektrophoretisch getrennt und geblottet. Mit dem Antikörper konnte jedoch keine Proteinbande spezifisch markiert werden. Der Antikörper zeigt auch keine Kreuzreaktivität gegenüber der rekombinanten InsP₆-Kinase aus *Dictyostelium* (A. Saiardi, pers.

Mitteilung). Eine spezifische Antikörperbindung ist aufgrund der Differenzen in den Proteinsequenzen offenbar nicht möglich.

3.6.4 Identifizierung weiterer Proteine, die an das InsP_6 -Affinitätsmaterial binden

Im Verlauf der Anreicherung der InsP_7 -Kinase binden neben dieser weitere Proteine an das InsP_6 -Affinitätsgel. Diese Proteine sind im Vergleich zu der InsP_7 -Kinase prominenter. Möglicherweise sind sie am Stoffwechsel der hochphosphorylierten Inositolphosphate beteiligt oder Bindeproteine für diese Metabolite. Deshalb wurden die Proteine mit relativen Molekülmassen von 42, 58 und 60 kDa mittels ESI-Tandemmassenspektrometrie sequenziert und durch Datenbanksuchen identifiziert. Das methodische Vorgehen erfolgte analog zur Sequenzierung der InsP_7 -Kinase mit dem Unterschied, dass hier die meisten tryptischen Peptide während der Probenvorbereitung mit 60% Methanol/1% Ameisensäure von den ZipTips μC_{18} eluiert werden konnten. Die Identifizierung dieser drei Proteine gelang direkt durch den Abgleich der Peptidfragmentierungsfingerprints mit der Proteindatenbank NCBI.

Die prominenteste Proteinbande bei 60 kDa wurde als Malatsynthase identifiziert. Die Malatsynthase besteht aus 543 Aminosäuren (Abb. 3-22, A, S. 120), von denen 34% durch die ermittelten Peptidsequenzen abgedeckt werden. Das Enzym besitzt eine Größe von 62 kDa und gehört ebenso wie die InsP_7 -Kinase zu den basischen Proteinen. Die Malatsynthase wurde bislang nicht experimentell in *Dictyostelium* nachgewiesen, sondern gehört zu der großen Gruppe von Proteinen, die auf der Basis der Basensequenz des Chromosoms 2 annotiert wurden. Die Malatsynthase ist ein Enzym des Glyoxylatzyklus, durch den in Pflanzen und Bakterien Oxalacetat und andere Zwischenprodukte des Citratzyklus aus Acetyl-CoA entstehen. Dieser Stoffwechselweg wurde bislang in *Dictyostelium* nicht beschrieben. Das Enzym katalysiert die Kondensation von Glyoxylat und Acetyl-CoA zu Malat (Abb. 3-19).

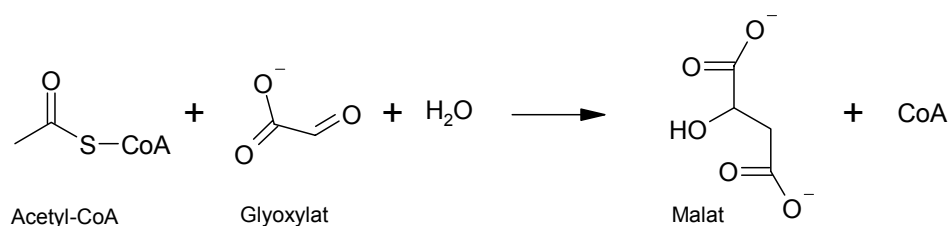


Abb. 3-19: Reaktion, die durch die Malatsynthase katalysiert wird

Das Protein mit einer relativen Größe von 58 kDa ist die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase. Alle aufgenommenen CID-Massenspektren konnten Peptiden zugeordnet werden, die nach einem theoretischen tryptischen Proteinverdau entstehen. Damit werden 32% der 493 Aminosäuren langen Sequenz abgedeckt (Abb. 3-22, B, S. 120). Das Enzym hat eine Größe von 52 kDa. Die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase ist ein Enzym des Pentosephosphatwegs und katalysiert die Decarboxylierung von 6-Phosphogluconat zu Ribulose-5-phosphat (Abb. 3-20). Die Enzymaktivität der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase konnte qualitativ in den Enzymfraktionen nachgewiesen werden. Dazu wurde der enzymatisch gekoppelte Farbttest (Kap. 2.6.1) abgewandelt, indem 6-Phosphogluconat als Substrat verwendet wurde.

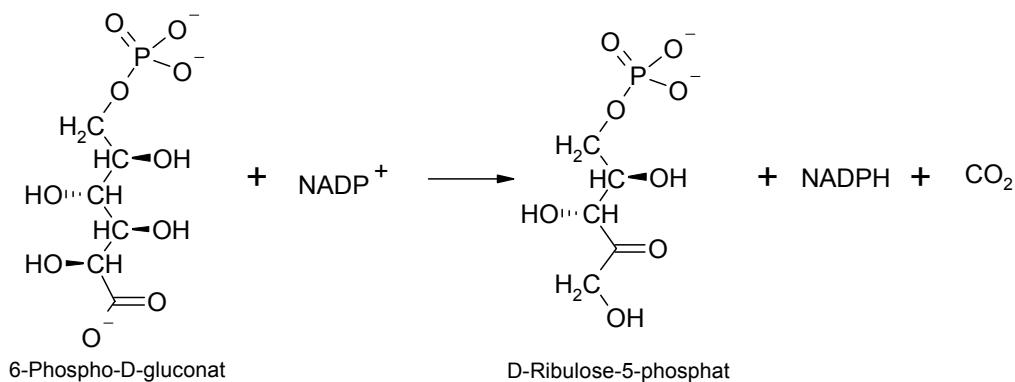


Abb. 3-20: Reaktion, die durch die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase katalysiert wird

Die tryptischen Peptide der 42 kDa-Bande, die direkt über der InsP₇-Kinasebande im SDS-Polyacrylamidgel auftritt, konnten ebenfalls einem automatisch annotierten Protein in *Dictyostelium* zugeordnet werden. Die Peptide stimmen mit Peptiden der IMP Cyclohydrolase/AICAR Transformylase (Inosinmonophosphat-Cyclohydrolase/Phosphoribosyl-aminoimidazolcarboxamid-Formyltransferase) überein. Dieses normalerweise bifunktionale Enzym ist an der Purinnukleotidbiosynthese beteiligt (Abb. 3-21), zeigt aber in *Dictyostelium* nur die N-terminal lokalisierte IMP-Cyclohydrolasedomäne. Das Protein besteht aus 542 Aminosäuren und hat damit eine Größe von 59 kDa. Eine starke Abweichung der experimentell ermittelten Größe von der theoretischen Größe wird relativ häufig bei Proteinen beobachtet (T. Laussmann, pers. Mitteilung). Die sequenzierten tryptischen Peptide decken 22% der Aminosäuresequenz ab (Abb. 3-22, C, S. 120).

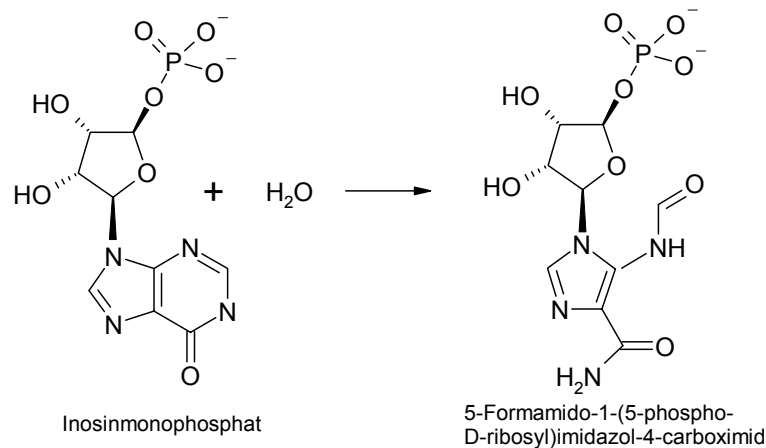


Abb. 3-21: Reaktion, die durch die IMP-Cyclohydrolase katalysiert wird

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen dieser drei Proteine mit bekannten Enzymen des Inositolphosphatstoffwechsels, insbesondere mit InsP₆-Kinasen und der InsP₇-Kinase, lieferte keinen Hinweis auf eine mögliche Beteiligung am Inositolphosphatstoffwechsel. Die Inositolphosphatbindestelle, die in den Sequenzen der InsP₆-Kinasen konserviert ist⁷⁴, tritt bei diesen Proteinen nicht auf.

Die Substrate und Produkte der enzymkatalysierten Reaktionen zeigen keine Struktur-analogien zu InsP₆. Auch eine Inhibierung der Enzyme durch InsP₆ ist zur Zeit nicht bekannt. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Enzyme in *Dictyostelium* nicht biochemisch charakterisiert sind. Außer für die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, für deren Gen ein Expressionsprofil in der DictyBase-Datenbank vorliegt, erfolgte ihre Zuordnung ausschließlich automatisiert durch Vergleiche der genomischen Sequenz mit bekannten Enzymen aus anderen Organismen (s. auch Kap. 1.6.1).

Alle drei Enzyme besitzen jedoch viele positiv geladene Aminosäurereste. Denkbar ist demzufolge, dass die Bindung an das InsP₆-Affinitätsgel über elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Liganden erfolgt. Möglicherweise werden diese Enzyme auch durch Inositolphosphate reguliert. In diesem Fall könnte die Bindung an das InsP₆-Affinitätsgel auch aufgrund der Strukturanalogie zu den hochphosphorylierten Inositolphosphaten erfolgen.

tr|Q8T2K9

Similar to *Myxococcus xanthus*. malate synthase (EC 4.1.3.2)

Dictyostelium discoideum (Slime mold).

MLRGIEIRGK VDKNVKSILT EECLTFLGEL ERRFGGIRKN LLQKRLDR**QI**
DINNGILPSF LKDSDCRAT DKNWKCSSVP LEIQDRR**VEI** **TGPTDRKMVI**
NALNSGAKVF MADFEDANCP NWENSIHGQQ NMIDANNR**TI** **SFTSAEGRKY**
 ELNKQVAVLF VRPRGWHLNE DHLAIDGLSM SGSLFDFGCY IFHNNHQILKN
RNSNPYFYLP KMESHLEARL WNDVVFVFSQ YLGMPIGTIK ATVLIETILA
 SFEMDEILYE LRDHSAGLNC GR**WDYIFSFI** **KKFQSYPKM** LPDRAK**VTMT**
SPFMDSYVKL LIYTCHKRGV HAMGGMAAQI PIKNNEQANN AAMEKVRLDK
 QREVRAGHDG TWAHPALIP IAMEQFNTHM **KSQNQISYIP** **SSTAPNFEEI**
AKSLLSVDPV **KPGDITEDGF** **RSNIVVGILY** LEAWLNGNGC VPIHNLMEDA
 ATAIEISR**SQI** **WQWIKHKAPL** PDGK**SFVTLQ** **YYNRIFKES** DK**LEKAHPNS**
KTLTDAIQIF NNLIVSPNFI DFLTPSCYK**F** **VVDSERKTFS** PKL

A

tr|Q8TA03

6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating (EC 1.1.1.44)

Dictyostelium discoideum (Slime mold).

MTEAKGDIGL IGLAVMGENL VLNMESRGFT CSVNRTTSK **VDEFVQGRGK**
 GKKFIGCHSL ETLVQSLKTP RRVMLMV**KAG** **EVVDHFIQLL** **LPLEKGDII**
IDGGSNLYTD **SDRRTKDLDA** **KGILFIGTGV** **SGGEEGALLG** **PSIMPGGNPK**
 AWEHVKPIFQ AISAKVQPGD QPCCDWVG DG GAGHYVKMVH NGIEYGDMQL
 ISEAYFILKH YLGLSNDELQ KTFAKWNTGD LDSYLIEITA DIFAKKCEK**D**
PNTYVVDTIL **DSAGQKGTGK** **WTAINALDVG** **IPLTLVAESV** **FARCVSSFKE**
 ERVKASTILA GPNPNEANKK FTGDKEQVIE AVRQALFASK LVSYAQGF**TM**
 MKAAAKEYKW NLNYGNIALL WRGGCIIR**ST** **FLGEIKGAFD** KNPQLDNL**LT**
 DCWFRDK**LAA** **AQDGWRQVAS** ISVLHGIP**TP** AFTSALS**YYD** SYRCAK**LSAN**
LVQAQRDYFG **AHTFQLLDDP** **KGAPVHVNW** GRGGSTHST**T** YSI

B

tr|Q86L14

Similar to *Thermoanaerobacter tengcongensis*.

AICAR transformylase/IMP cyclohydrolase PurH

(Only IMP cyclohydrolase domain in Aful)

Dictyostelium discoideum (Slime mold).

MQALLSVYNK SGIVEFSKIL SSKGFNLIST GGTAKSLVDN GLKVQQVSDV
 TEYPEMLDGR VKTLHPKIHG GLLARPELAH HQADLNKYN**I** KPISIVV**NL**
 YPFVETVSKE STTLEEAIEN IDIGGHTLIR ASSKNFQ**NVL** IIVDPSD**YKW**
 IGERIQSSTD STNVLSSITL EERKKLALKA FQHGC**SYDAA** VSQYLSK**VEL**
 TNATTIQGVK **GTDSASVNVE** **FPQTFLLPLYE** **KKNDLRYGEN** PHQKAAL**YQC**
 PGTGGIANAQ LLHGPA**LSYN** NILDGDAALK AVREFDR**CAC** VVIKHTN**PCG**
 LSVGVDNSEQ AEVYKRAFNG DPK**SAYGGIL** **GFNRTLLET** **ATALKSVFYE**
 VIIAPDYTED ALALLSKKEK LRILR**IPEAA** **NQIQFTQ**PDI**** **RTITGGALLQ**
SPNPIIRGDL AEATKNW**KVV** TENKPTE**QQM** **KDLLFAWRVS** KHVKSNA**IVL**
 SK**DETIVAIG** **AGQPNRSQSV** DICMKVGGDK VKGSV**LASDA** FPPFAD**SIDL**
 AHQGN**ACIV** QPGGSIR**DQE** **VIDAANKYGI** PMVFTGN**RNF** LH

C

Abb. 3-22: Primärstrukturen der Proteine, die an das InsP_6 -Affinitätsmaterial binden

Die Aminosäuresequenzen der Malatsynthase (A), 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (B) und IMP-Cyclohydrolase (C) wurden durch den Abgleich der aufgenommenen CID-Massenspektren von tryptisch verdauten Proteine mit Proteindatenbanken gefunden. Sie sind über die Zuordnungsnummer (tr: TrEMBL-Nummer) in der Swiss-Prot-Datenbank zugänglich. Fett unterlegt sind die Peptide, von denen Tandemmassenspektren aufgenommen wurden (Stand Mai 2004).

3.7 Molekular Modelling - Simulationen zur Ermittlung der Molekülgeometrien von hochphosphorylierten Inositolphosphaten

Ein interessanter Aspekt der hochphosphorylierten Inositolphosphate sind die Energieinhalte und Konformationen dieser natürlich vorkommenden Metabolite. Die Strukturen der Diphosphoinositolphosphate in *D. discoideum* sind hinsichtlich der Anordnung ihrer Diphosphatgruppen bekannt. Im Gegensatz zu InsP_6 wurden jedoch die Konformationen dieser Verbindungen noch nie untersucht. Abgesehen von den Diphosphatgruppen sind die hochphosphorylierten InsPs zunächst strukturell sehr ähnlich. Aufgrund der Phosphatgruppen besitzen sie eine hohe negative Ladungsdichte, die den Inositolring vollständig abschirmen sollte. InsP_6 , 6-PP- InsP_5 und 5,6-bis-PP- InsP_4 sind Substrate der 6-PP- InsP_5 -(5)-Kinase, die vermutlich über ionische Wechselwirkungen mit einem Histidinrest im aktiven Zentrum gebunden werden. Die InsP_7 -Kinase katalysiert hochspezifisch die Phosphorylierung von InsP_6 und 6-PP- InsP_5 in 5-Position. Durch diese reversible Reaktion werden ebenso 5-PP- InsP_5 und 5,6-bis-PP- InsP_4 dephosphoryliert. Dabei zeigt die Kinase ähnliche Affinitäten⁶ zu 6-PP- InsP_5 ($K_M = 0,34 \pm 0,08 \mu\text{M}$) und 5,6-bis-PP- InsP_4 ($K_M = 0,42 \pm 0,06 \mu\text{M}$), aber eine bedeutend geringere Affinität gegenüber InsP_6 ($K_M = 3,7 \pm 0,5 \mu\text{M}$). Die Kinase setzt InsP_6 im Vergleich zu 6-PP- InsP_5 bedeutend langsamer um. Möglicherweise können die absoluten Konformationen der Substrate einen Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Substrataffinitäten des Enzyms liefern. Des Weiteren kann man aufgrund der dreidimensionalen Substratstrukturen möglicherweise Rückschlüsse auf das aktive Zentrum der InsP_7 -Kinase ziehen, indem die Veränderungen der Strukturen und gemeinsame Strukturmerkmale berücksichtigt werden.

3.7.1 Eine Einführung in molekülmechanische, semiempirische und *ab-initio*-Molekülsimulationen

Mit theoretischen Molekülsimulationen lassen sich komplexe chemische Vorgänge auf molekularer Ebene betrachten und vorhersagen. Zu dem Molecular Modelling gehören die Berechnung, Darstellung und Bearbeitung von dreidimensionalen Molekülstrukturen und ihren physikochemischen Eigenschaften. In der Molekularbiologie, Biochemie, Medizin und der Pharmakologie zur Entwicklung neuer Wirkstoffe gewinnen Molecular Modelling

Simulationen zunehmend an Bedeutung. Dabei können diese Simulationen in Bereichen unterstützen, die experimentell nur schwer oder gar nicht zugänglich sind, aber auch helfen, experimentelle Befunde zu belegen¹⁶⁹.

Molekülsimulationen können in zwei Gruppen unterteilt werden: die Simulationen mit Kraftfeldmethoden und die Simulationen, die auf dem Formalismus der Lösung der Schrödinger-Gleichung für die Elektronenbewegung in Molekülen basieren. Zu der zweiten Gruppe gehören die semiempirischen und *ab-initio*- oder quantenmechanischen Verfahren, die alle auf der Born-Oppenheimer-Näherung beruhen. Diese Näherung betrachtet die Position der Atomkerne in Relation zur Elektronenbewegung als statisch und erlaubt damit eine Vereinfachung der Schrödinger-Gleichung, die für Vielelektronensysteme nicht mehr ohne weiteres lösbar ist.

3.7.1.1 Molekülmechanik

Molekülmechanische Simulationen nutzen die Gesetze der klassischen Physik, um die dreidimensionale Struktur und Eigenschaften von Molekülen vorherzusagen. Dabei wird die Geometrie eines molekularen Systems mit Hilfe von Kraftfeldern optimiert. Diese Kraftfelder bestehen aus einfachen Potentialfunktionen zur Beschreibung der Abhängigkeit der Gesamtenergie eines Moleküls von den geometrischen Größen Bindungslänge, Bindungswinkel und Diederwinkel. Die Potentialfunktionen enthalten für jeden Atomtyp in Abhängigkeit von seiner chemischen Umgebung spezifische Parameter, die empirisch an experimentelle Daten aus Röntgenstrukturanalysen, Raman- und IR-Schwingungsspektroskopie, aus physikochemischen Daten und Berechnungen mit quantenchemischen Methoden angepasst werden.

Mit Kraftfeldmethoden lassen sich Molekülgeometrien und –energien berechnen, indem die Energiebeiträge aus Bindungslängen und –winkeln, Torsionswinkeln, van der Waals-Wechselwirkungen und 1-4 elektrostatischen Wechselwirkungen von Verbindungen ermittelt werden. Die Energien von hochphosphorylierten Inositolphosphaten lassen sich mit dem AMBER-Kraftfeld¹⁷⁰ berechnen. Die Gesamtenergie E setzt sich aus einzelnen Energiebeiträgen zusammen (Gleichung 3-1), die definieren, wie sich die Potentialenergie eines Moleküls mit der Lage der einzelnen Atome verändert.

$$E_{\text{gesamt}} = E_{\text{Bindungslänge}} + E_{\text{Bindungswinkel}} + E_{\text{Torsion}} + E_{\text{nichtkovalent}} \quad \text{Gleichung 3-1}$$

Der erste Beitrag $E_{\text{Bindungslänge}}$ resultiert aus der Energieänderung bei Dehnung oder Stauchung einer chemischen Bindung und wird im AMBER-Kraftfeld durch ein harmonisches Potential beschrieben. Auch die Abhängigkeit der Energie von den Bindungswinkeln ($E_{\text{Bindungswinkel}}$) wird durch ein harmonisches Potential dargestellt. In die Berechnungen gehen außerdem Energieänderungen in Abhängigkeit von Torsionswinkeln (E_{Torsion}) ein, die besonders bei den Molekülen mit Diphosphatgruppen eine Rolle spielen. Hier sind die -O-P- und -P-O-Bindungen frei drehbar und können so die Energiebeiträge stark beeinflussen. Die nichtkovalenten van der Waals- und elektrostatischen Wechselwirkungen (1-3 und/ oder 1-4 Wechselwirkungen) werden im Energiebeitrag $E_{\text{nichtkovalent}}$ berücksichtigt. Hierbei beschreibt das Lennard-Jones-Potential die van der Waals-Wechselwirkungen, die elektrostatischen Wechselwirkungen werden durch das Coulomb-Potential dargestellt.

Die so ermittelten Molekülgeometrien stimmen dann mit den realistischen Molekülstrukturen gut überein, wenn das zu berechnende Molekül nicht zu stark von den „Normstrukturen“ abweicht, die für die Entwicklung der Kraftfelder benutzt werden. Die Energiewerte, die berechnet werden, sind artifizielle Werte, so dass nur die Energiedifferenzen von Strukturen, die im gleichen Modell untersucht werden, aussagekräftig sind¹⁶⁹.

3.7.1.2 Semiempirische Verfahren

Den semiempirischen Molekülsimulationen liegt ein stark vereinfachter quantenchemischer Formalismus zugrunde. Sie können die Realität nur unvollständig wiedergeben, liefern dennoch qualitative Beschreibungen molekularer Systeme. Bei diesen Verfahren werden für jedes chemische Element die eingeführten Parameter an Geometrie- und Energiedaten bekannter Moleküle angepasst und damit die Berechnungen vereinfacht. Auch hier gibt es unterschiedliche Berechnungsmethoden. AM1 und PM3 wurden bei den Konformationsanalysen der Inositolphosphate verwendet. Beide Verfahren sind SCF-Kalkulationen (Self Consistent Field) und unterscheiden sich durch die verwendeten Parameter. AM1 (Austin Methode 1)¹⁷¹ ist wie auch PM3 (Parametrische Methode 3)^{172,173} ein verbessertes MNDO-Verfahren¹⁷⁴ (Modified Neglect of Diatomic Overlap) zur Simulation von Molekülgeometrien. AM1 kann für Moleküle eingesetzt werden, die Elemente der 2. und 3. Reihe des Periodensystems enthalten. PM3 verwendet im Vergleich zu AM1 optimierte Parameter und berücksichtigt die elektronische Struktur eines Moleküls. Mit PM3 lassen sich ungewöhnliche Moleküle energetisch und hinsichtlich ihrer Geometrie besser simulieren.

Semiempirische Simulationen sind im Vergleich zu den nachfolgend beschriebenen *ab-initio*-Simulationen weniger aufwändig. Sie können nur dann genaue quantitative Vorhersagen von Energien und Strukturen von Systemen leisten, wenn gute Parameter existieren¹⁶⁹.

3.7.1.3 *Ab-initio*-Methoden

Mit *ab-initio*-Simulationen wird ein molekulares System ausgehend von den Grundprinzipien der Quantenmechanik berechnet. Im Gegensatz zu den molekülmechanischen und semiempirischen Simulationen werden hier keine experimentellen Parameter verwendet. Die Berechnungen basieren auf der näherungsweise Lösung der Schrödinger-Gleichung (Gleichung 3-2). Als Lösung erhält man die elektronische Wellenfunktion des Moleküls und eine Potentialenergiefläche in Abhängigkeit von der Kernkonfiguration. Die Wellenfunktion wird dabei durch einen vorgegebenen Basisfunktionensatz dargestellt.

$$\mathbf{H} \Psi = \mathbf{E} \Psi$$

Gleichung 3-2

mit H = Hamiltonoperator, E = Eigenwerte, Ψ = Wellenfunktion

Der Hamiltonoperator H setzt sich aus der kinetischen Energie und der potentiellen Energie eines Elektrons (elektrostatische Wechselwirkung des Elektrons mit dem Kern und Elektron-Elektron-Wechselwirkung) zusammen. Zur Beschreibung von Vielteilchensystemen kann die Schrödinger-Gleichung nicht mehr exakt gelöst werden. Für die Computersimulationen werden deshalb einige Näherungen eingeführt. Mit der Born-Oppenheimer-Näherung wird die Kernbewegung von der Elektronenbewegung abgekoppelt. Damit können die Atomkerne als fixierte Punktladungen betrachtet werden, während der Aufenthaltsort der Elektronen durch die Orbitale beschrieben wird. Die elektronische Wellenfunktion wird dann nach der Hartree-Fock-Methode als Produkt von Einelektronenwellenfunktionen ausgedrückt. Die Gleichungen lassen sich für Atome durch die Einführung der Slater-Determinante lösen, welche die Effekte durch das Vertauschen einzelner Elektronen in einem Vielelektronensystem berücksichtigt. Die Hartree-Fock-Methode erfasst die Wechselwirkung eines Elektrons mit allen anderen Elektronen des Systems nur als Wechselwirkung mit einer gemittelten Ladungsverteilung. Demzufolge wird bei diesem Verfahren die Elektronenkorrelation, also das Bestreben der Elektronen sich gegenseitig auszuweichen, vernachlässigt. Ein weiteres Näherungsverfahren beschreibt nun die Molekülorbitale als Linearkombination

von Atomorbitalen mit Hilfe von Basisfunktionen. Durch diese Näherung werden die sogenannten Basissätze in die *ab-initio*-Rechnungen eingeführt.

Auch hier existieren verschiedene Verfahren, um die auftretenden Gleichungen numerisch zu lösen. Zur Berechnung der Strukturen der Inositolphosphate wurde die Dichtefunktionaltheorie (DFT) verwendet. Diese Theorie ermöglicht die Berechnung von Vielelektronensystemen anhand von Dichtematrizen ohne vorherige Berechnung der Wellenfunktionen. Die Dichtematrix ist ein mathematisches Hilfsmittel, das von der Schrödinger-Gleichung abgeleitet ist und nicht mehr die einzelnen Atomorbitale berechnet, sondern nur noch die zugehörigen Orbitalkoeffizienten variiert. Zur Lösung dieses Integral-Differential-Gleichungssystems wird ein Iterationsverfahren eingesetzt, bei dem jeweils die Integrale für die Matrix berechnet werden. Hier werden die Berechnungen der Integrale vereinfacht, indem Gaussfunktionen als Basisfunktionen benutzt werden. Das Iterationsverfahren ist eine „Self Consistent Field“-Methode (SCF) und stellt heute den Standard zur Berechnung von Elektronenstrukturen von Molekülen dar. Ausgangspunkt sind Molekülorbitale für alle Elektronen, die sich aus den räumlich fixierten Punktladungen der Atomkerne ergeben. Für ein ausgewähltes Elektron wird das Potential berechnet, in dem es sich bewegt. Für dieses Potential wird die vereinfachte Schrödinger-Gleichung gelöst und es ergibt sich ein neues Orbital für dieses Elektron. Für jedes einzelne Elektron wird das Potential berechnet, das durch alle anderen Elektronen hervorgerufen wird. Daraus ergibt sich ein neuer Satz von Orbitalen für das Vielteilchensystem. Ausgehend von diesem neuen Orbitalsatz werden wieder die Potentiale berechnet. Nach mehreren Iterationszyklen verändern sich die Orbitale innerhalb einer vorgegebenen Genauigkeit nicht mehr und sind damit selbstkonsistent. *Ab-initio*-Simulationen sind die aufwändigsten Molekülsimulationen, die einen hohen Rechenaufwand erfordern und dementsprechend lange dauern. Sie liefern genaue quantitative Vorhersagen zu Strukturen und Energien für viele Systeme.

Zur Konformationsanalyse der Inositolphosphate wurden die Simulationen mit der Hybrid-Dichtefunktionalmethode B3LYP durchgeführt. Diese Methode berücksichtigt neben dem Elektronenaustausch (Becke-style 3-Parameter Density Functional Theory; B3) auch die Elektronenkorrelation (Lee-Yang-Parr Correlation Functional, LYP). Es wurde der Split-Valenz-Basissatz 6-311G zur Berechnung verwendet, wobei die numerische Bezeichnung die Anzahl der Gaussfunktionen angibt, die zur Beschreibung der Atomorbitale notwendig sind.

3.7.2 Optimierte Molekülgeometrien von hochphosphorylierten Inositolphosphaten

Simulationen wurden für InsP₆, 6-PP-InsP₅ und 5,6-bis-PP-InsP₄ in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. H. Guth (Lebensmittelchemie, Bergische Universität Wuppertal) und Dr. A. Ligon durchgeführt.

3.7.2.1 Geometrieoptimierungen und Energien von InsP₆-Konformeren

Dazu wurde zunächst, ausgehend von den energetisch günstigen Sesselkonformationen des Cyclohexans, die Startgeometrien für InsP₆ festgelegt. Bei molekülmechanischen Optimierungen im AMBER-Kraftfeld zeigte sich, dass neben den Sesselkonformationen mit einer axialen und 5 äquatorialen Phosphatgruppen (1ax/5äq) sowie mit 5 axialen und einer äquatorialen Phosphatgruppe (5ax/1äq) eine twisted-Konformation (tw) energetisch begünstigt ist. Weitergehend wurden diese Molekülgeometrien semiempirisch mit PM3 optimiert. Auch unter Berücksichtigung der elektronischen Strukturen des Moleküls ließ sich die Tendenz aus den molekülmechanischen Simulationen bestätigen. GAMESS-Simulationen im Vakuum mit der B3LYP-Methode und dem 6-311G-Basissatz bestätigten die Ergebnisse aus den vorangegangenen Berechnungen. In Tabelle 3-7 sind die ermittelten Energien und Energiedifferenzen für die Vakuum- sowie die Wassersimulationen zusammengestellt.

Im Vakuum besitzt das twisted-Konformer InsP_{6(tw)} die niedrigste Energie, gefolgt von dem Sesselkonformer InsP_{6(1ax/5äq)} ($\Delta G = 3,4 \text{ kJ mol}^{-1}$). Das Sesselkonformer InsP_{6(5ax/1äq)} ($\Delta G = 48,6 \text{ kJ mol}^{-1}$) spielt im Gleichgewicht aufgrund der Energiedifferenz keine Rolle. Im Gleichgewicht treten die beiden stabilen Konformere InsP_{6(tw)} und InsP_{6(1ax/5äq)} im Verhältnis von 80 zu 20 (%) auf.

Die Molekülgeometrien der InsP₆-Konformere wurden durch weitere quantenmechanische Simulationen in wässriger Umgebung optimiert. Hier zeigte sich, dass die elektrostatischen Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel einen bedeutenden Beitrag zur Stabilisierung des InsP_{6(1ax/5äq)} Konformers in wässriger Umgebung leisten. Die elektrostatischen Wechselwirkungen waren für die beiden anderen Konformere (InsP_{6(5ax/15äq)} $\Delta G_{\text{elec}} = 3,9 \text{ kJ mol}^{-1}$ und InsP_{6(tw)} $\Delta G_{\text{elec}} = 51,4 \text{ kJ mol}^{-1}$) deutlich geringer. In wässriger Umgebung ist InsP_{6(1ax/5äq)} das energetisch stabilste Konformer. Aus den Energiedifferenzen der freien Gesamtenergie ($\Delta G = 24,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ für InsP_{6(tw)}, $\Delta G = 48,1 \text{ kJ mol}^{-1}$ für

InsP_{6(5ax/1äq)}) ergibt sich ein Gleichgewichtsverhältnis von 99,99% InsP_{6(1ax/5äq)} zu 0,01% InsP_{6(tw)}, wohingegen das andere Sesselkonformer keine Bedeutung im Gleichgewicht hat.

InsP ₆	InsP _{6(5ax/1äq)}	InsP _{6(1ax/5äq)}	InsP _{6(tw)}
G _{Vakuum} [a.u.]	-4091,65590	-4091,67296	-4091,67426
ΔG _{Vakuum} [kJ mol ⁻¹]	48,3	3,4	0,0
Verteilung im Gleichgewicht [%] ^(a)	0	20	80
U _{Wasser} [a.u.] (Innere Energie ≡ Energie im Vakuum)	-4091,63644	-4091,65176	-4091,65901
ΔU _{Wasser} [kJ mol ⁻¹]	40,2	0,0	-19,1
G _{elec} [a.u.] (elektrostatische Wechselwirkungen)	-0,11927	-0,12074	-0,10118
ΔG _{elec} [kJ mol ⁻¹]	3,9	0,0	51,4
G _{cav} [a.u.] (Pierotti Kavitationsenergie) ^(b)	0,10543	0,10629	0,10198
ΔG _{cav} [kJ mol ⁻¹]	-2,3	0,0	-11,3
G _{vdW} [a.u.] (van der Waals- bzw. Dispersionswechselwirkungen)	-0,08210	-0,08469	-0,08319
ΔG _{vdW} [kJ mol ⁻¹]	6,8	0,0	4,0
G _{rep} [a.u.] (Abstoßungsenergie)	0,01063	0,01081	0,01067
ΔG _{rep} [kJ mol ⁻¹]	-0,5	0,0	-0,4
G _{solv} [a.u.] (Gesamtwechselwirkungen) ^(c)	-0,08532	-0,08832	-0,07171
ΔG _{solv} [kJ mol ⁻¹]	7,9	0,0	43,7
G _{Wasser} [a.u.]	-4091,72176	-4091,74009	-4091,73072
ΔG _{Wasser} [kJ mol ⁻¹]	48,1	0,0	24,6
Verteilung im Gleichgewicht [%] ^(a)	0	99,99	0,01

Tab. 3-7: Energien für InsP₆-Konformere aus GAMESS-Simulationen

InsP_{6(5ax/1äq)}: Sesselkonformation mit 5 axialen und 1 äquatorialen Substituenten

InsP_{6(1ax/5äq)}: Sesselkonformation mit 1 axialen und 5 äquatorialen Substituenten

InsP_{6(tw)}: Twist-Konformation des Inositolrings

Fett unterlegt sind jeweils die Werte für die stabilsten Konformationen.

a ermittelt mit dem Programm Energy von H. Hönl, <http://www.cis.TUGraz.at/orgc/>

b Die Kavitationsenergie ist die Energie, die zur Bildung von Hohlräumen aufgebracht werden muss.

c Die Gesamtwechselwirkungen entsprechen der Solvatationsenergie des Moleküls.

Die Konformationen von Inositolphosphaten wurden bereits früher mit ³¹P-^{175,176}, ¹H-NMR-Spektroskopie, Röntgenstrukturanalyse und Ramanspektroskopie¹⁷⁷ untersucht. In kristalliner Form nimmt InsP₆ bevorzugt die Sesselkonformation mit 5 axialen und einer äquatorialen Phosphatgruppe ein. In dieser sterisch ungünstigeren Konformation wird vermutlich die elektrostatische Abstoßung der negativ geladenen Phosphatgruppen in äquatorialer Position minimiert und die axialen Phosphatgruppen werden durch Koordination

mit den Gegenionen sowie durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Dies steht im Einklang mit den durchgeführten Kalkulationen. Die Wechselwirkungen im Kristall entsprechen den Bedingungen im Vakuum. Das energetisch günstigere twisted-Konformer kann als Übergangszustand zu der Konformation mit 5 axialen und einer äquatorialen Phosphatgruppe angesehen werden. Die Konformation in einem Solvent ist dagegen von diesem abhängig. Der pH-Wert, die Ionenstärke und die Gegenionen des Solvents beeinflussen den Protonierungsgrad der Inositolphosphate.

Konformationsänderungen von InsP_6 beeinflussen die Kopplungskonstanten zwischen vicinalen Protonen durch die Änderung des Diederwinkels und damit gleichzeitig das Aufspaltungsmuster im NMR-Spektrum. Bei höheren pH-Werten treten Peakverbreiterungen und Verschiebungen der Protonenresonanzen durch Konformationsänderungen auf¹⁷⁷. In den NMR-Studien wurden ausschließlich die beiden Sesselkonformationen berücksichtigt. Da bei den *ab-initio*-Simulationen der Protonierungsgrad der Phosphatgruppen nicht variiert wurde, lassen sich aufgrund der Berechnungen nur Vermutungen anstellen. Dennoch zeigt sich auch hier die Übereinstimmung mit den Kalkulationen in wässriger Umgebung. Das InsP_6 -Konformer mit einer axialen und 5 äquatorialen Phosphatgruppen ist nach den *ab-initio*-Simulationen das stabilste Isomer und dies steht im Einklang mit den NMR-Messungen.

In der vollständig protonierten Form liegt bei neutralem pH-Wert das Konformer $\text{InsP}_{6(\text{tw})}$ nur in verschwindend geringer Konzentration im Gleichgewicht mit $\text{InsP}_{6(\text{lax/5äq})}$ vor. Die Veränderungen des Protonierungsgrades in Abhängigkeit von pH-Werten, Ionenstärke des Lösungsmittels und Gegenionen wurden für verschiedene Inositolphosphate untersucht^{178,179,180,181}. Danach ist es unwahrscheinlich, dass alle Phosphatgruppen unter diesen Bedingungen vollständig protoniert sind. Neue Wasserstoffbrücken können auftreten, wenn sich der Protonierungsgrad des Moleküls verändert. Die Bildung neuer Wasserstoffbrücken durch das Solvent oder intramolekular kann jedes Konformer für sich stabilisieren, so dass die Differenzen der freien Energie geringer werden. Damit würden gleichzeitig die Anteile der einzelnen Konformere im Gleichgewicht variieren. Die Verschiebungen der Protonenresonanzen und die Peakverbreiterungen könnten sich mit einem verstärkten Auftreten der twisted-Konformation im Gleichgewicht vor allem im pH-Bereich zwischen 5 und 10 erklären lassen. Des Weiteren könnten die lösungsmittelabhängigen Konformationsunterschiede bei der Bindung an ein Enzym von Bedeutung sein.

3.7.2.2 Geometrieoptimierungen und Energien von InsP₇-Konformeren

Ausgehend von den optimierten InsP₆-Strukturen wurden für 6-PP-InsP₅ ebenfalls Molekülgeometrien optimiert und die Energien berechnet. Durch die Diphosphatgruppe in 6-Position des Inositolrings ergeben sich jedoch bedeutend mehr zu berücksichtigende Konformationen. Torsionen um die O-P-Bindungen der Diphosphatgruppe (Abb. 3-23) haben entscheidenden Einfluss auf die freien Energien der einzelnen Konformere.

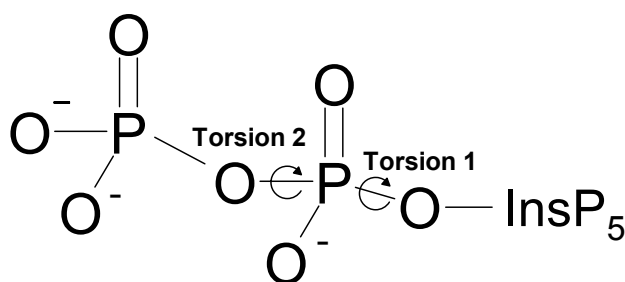


Abb. 3-23: Schematische Darstellung der berücksichtigten Torsionen

Torsion 1 ist der Diederwinkel, der sich aus der geometrischen Anordnung der Atome C₅-O-P-O ergibt. Torsion 2 ist der Diederwinkel, der sich aus der geometrischen Anordnung der Atome O-P-O-P ergibt.

Nach der molekülmechanischen Simulation der beiden Sesselkonformere und des twisted-Konformers wurde die Abhängigkeit der Energien von den Torsionen 1 und 2 durch Einzelpunktkalkulationen mit AM1 unter HyperSpin untersucht. Dazu wurden die Torsionen 1 und 2 in 10°-Inkrementen (1369 Konformere) verändert und die resultierenden Energien berechnet. In Abbildung 3-24 ist die Energieabhängigkeit von den Torsionen für alle drei InsP₇-Ringkonformere graphisch dargestellt. Für die weiteren *ab-initio*-Simulationen wurden die stabilsten Konformationen ausgewählt und anschließend mittels GAMESS weiter optimiert. Zur Kontrolle der AM1 Kalkulationen mittels HyperSpin wurden für die „twisted“ Geometrien zwei weitere Strukturen ausgewählt, die energetisch ungünstiger waren (InsP_{7(tw)}: Torsion 1 = 90°, Torsion 2 = -170° und InsP_{7(tw)}: Torsion 1 = 30°, Torsion 2 = -120°). Diese Strukturen wurden anschließend mittels GAMESS optimiert. Für diese Konformationen ergaben sich aus den Kalkulationen größere Energiedifferenzen zur energetisch günstigsten Konformation (InsP_{7(tw)}: Torsion 1 = 90°, Torsion 2 = -170°, $\Delta G_{\text{Vakuum}} = 128,9 \text{ kJ mol}^{-1}$ und InsP_{7(tw)}: Torsion 1 = 30°, Torsion 2 = -120°, $\Delta G_{\text{Vakuum}} = 69,4 \text{ kJ mol}^{-1}$), so dass diese Strukturgeometrien nicht weiter betrachtet wurden.

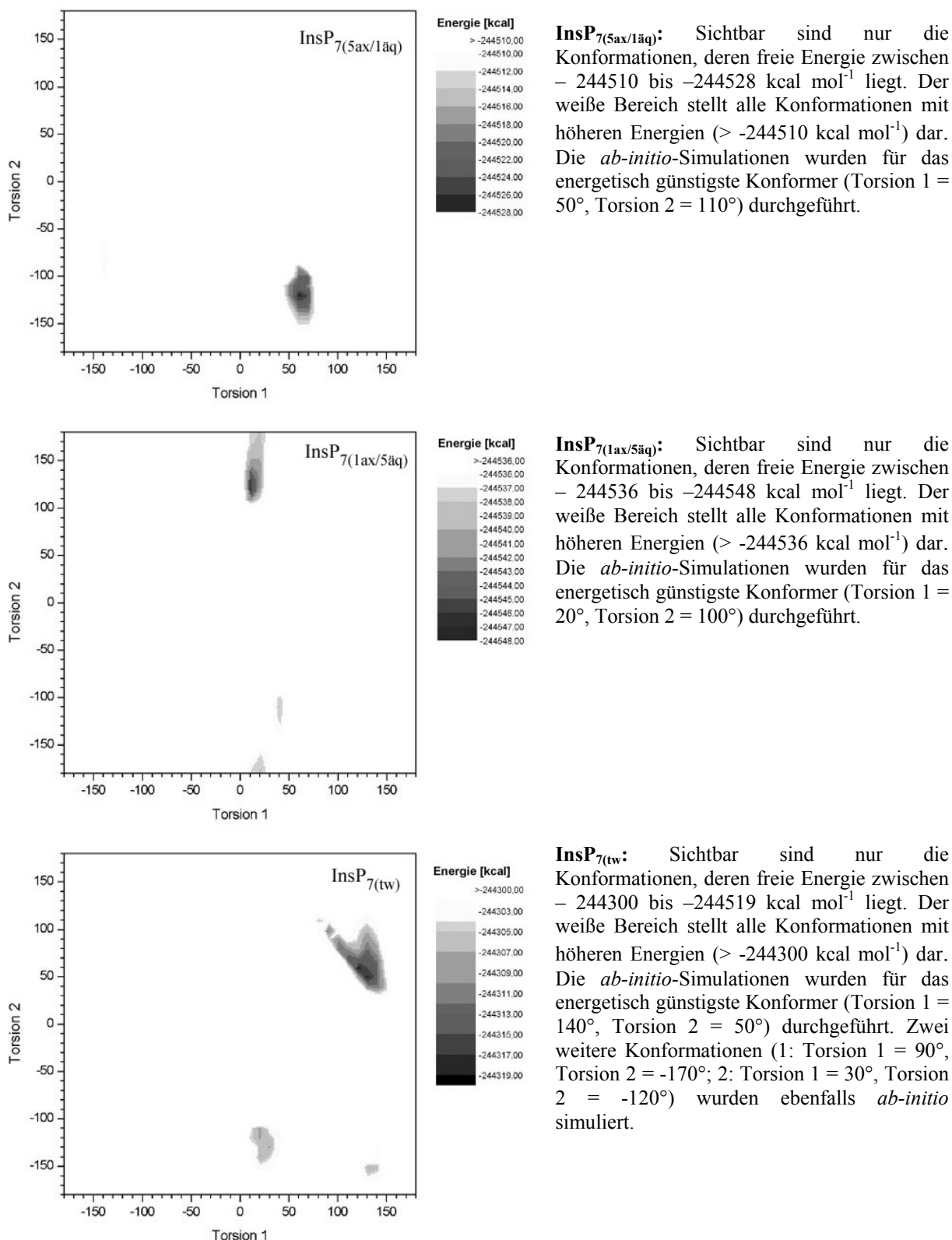


Abb. 3-24: 3D-Plots der Energieprofile von InsP₇-Konformeren in Abhängigkeit von den Diederwinkeln

Die graphische Darstellung von jeweils 1369 Konformationen, die mit HyperSpin ermittelt wurden, erfolgte mit Origin (OriginLab).

Die kalkulierten Energiewerte und Energiedifferenzen der Konformationen sind in Tabelle 3-8 zusammenfassend dargestellt. Aus den Molekülsimulationen ergeben sich optimierte Torsionswinkel, die von den zu Beginn vorgegebenen abweichen.

6-PP-InsP₅	InsP_{7(5ax/1äq)}	InsP_{7(1ax/5äq)}	InsP_{7(tw)}
G _{Vakuum} [a.u.]	-4659,14712	-4659,15551	-4659,14510
ΔG _{Vakuum} [kJ mol ⁻¹]	22,0	0,0	27,3
Torsion 1/ Torsion 2 [°] ^(a)	52,53/ -105,23	18,80/ 101,38	158,65/ 39,03
Verteilung im Gleichgewicht [%] ^(b)	0,01	99,99	0
U _{Wasser} [a.u.] (Innere Energie ≡ Energie im Vakuum)	-4659,12997	-4659,10435	-4659,11575
ΔU _{Wasser} [kJ mol ⁻¹]	0,0	67,3	37,4
G _{elec} [a.u.] (elektrostatische Wechselwirkungen)	-0,11139	-0,13216	-0,12349
ΔG _{elec} [kJ mol ⁻¹]	0,0	-54,6	-31,8
G _{cav} [a.u.] (Pierotti Kavitationsenergie) ^(c)	0,11259	0,11778	0,11611
ΔG _{cav} [kJ mol ⁻¹]	0,0	13,7	9,3
G _{vdw} [a.u.] (van der Waals- bzw. Dispersionswechselwirkungen)	-0,08858	-0,08743	-0,09145
ΔG _{vdw} [kJ mol ⁻¹]	0,0	3,0	-7,6
G _{rep} [a.u.] (Abstoßungsenergie)	0,01127	0,01119	0,01189
ΔG _{rep} [kJ mol ⁻¹]	0,0	-0,2	1,6
G _{solv} [a.u.] (Gesamtwechselwirkungen) ^(d)	-0,07611	-0,09061	-0,08694
ΔG _{solv} [kJ mol ⁻¹]	0,0	-38,1	-28,5
G _{Wasser} [a.u.]	-4659,20609	-4659,19496	-4659,20269
ΔG _{Wasser} [kJ mol ⁻¹]	0,0	29,2	8,9
Torsion 1/ Torsion 2 [°] ^(a)	49,29/ -105,42	19,44/ 99,23	147,37/ 46,80
Verteilung im Gleichgewicht [%] ^(b)	97,27	0	2,73

Tab. 3-8: Energien für InsP₇-Konformere aus GAMESS-Simulationen

InsP_{7(5ax/1äq)}: Sesselkonformation mit 5 axialen und 1 äquatorialen Substituenten; InsP_{7(1ax/5äq)}: Sesselkonformation mit 1 axialen und 5 äquatorialen Substituenten; InsP_{7(tw)}: Twist-Konformation des Inositolrings mit optimierter Konformation der Diphosphatgruppe in 6-Position
Fett unterlegt sind jeweils die Werte für die stabilsten Konformationen
a: ermittelt mit Molden; **b**: ermittelt mit dem Programm Energy von H. Hönl, <http://www.cis.TUGraz.at/orgc/>; **c**: Die Kavitationsenergie ist die Energie, die zur Bildung von Hohlräumen aufgebracht werden muss. **d**: Die Gesamtwechselwirkungen entsprechen der Solvatationsenergie des Moleküls.

Im Vakuum ist nach den *ab-initio*-Kalkulationen die Konformation InsP_{7(1ax/5äq)} die stabilste. InsP_{7(5ax/1äq)} liegt energetisch 22,0 kJ mol⁻¹ höher, während die twisted-Konformation im Gleichgewicht keine Rolle spielt (ΔG = 27,3 kJ mol⁻¹). Das Gleichgewicht

zwischen den beiden Sesselkonformationen liegt mit 99,99% fast vollständig auf der Seite von $\text{InsP}_{7(1\text{ax}/5\text{äq})}$.

In wässriger Umgebung ergibt sich, wie auch bei InsP_6 , eine völlig andere Situation. Hier ist offensichtlich die Konformation $\text{InsP}_{7(5\text{ax}/1\text{äq})}$ energetisch bevorzugt. Dieses Konformer zeigt im Vergleich zu den anderen untersuchten Konformationen die geringste innere Energie und wird durch die Dispersion, die Wechselwirkung zwischen induzierten Dipolen, stark stabilisiert. Die Kavitationsenergie ist geringer, während die elektrostatischen Wechselwirkungen diese Konformation stärker destabilisieren als die anderen Konformere. $\text{InsP}_{7(5\text{ax}/1\text{äq})}$ (97,27%) steht mit $\text{InsP}_{7(1\text{ax}/5\text{äq})}$ (2,73%, $\Delta G = 8,9 \text{ kJ mol}^{-1}$) im Gleichgewicht, bei dem $\text{InsP}_{7(\text{tw})}$ ($\Delta G = 29,2 \text{ kJ mol}^{-1}$) zu vernachlässigen ist. Auch hier ist zu berücksichtigen, dass sich in Abhängigkeit vom Protonierungsgrad der Phosphatgruppen die Verhältnisse verändern können.

3.7.2.3 Geometrieoptimierungen und Energien von InsP_8 -Konformeren

Auch InsP_8 -Strukturgeometrien wurden *ab-initio* kalkuliert. In Zusammenarbeit mit Dr. A. Ligon wurden vorläufige Vakuumberechnungen mit Gaussian98 mit der B3LYP-Methode und dem 6-31G(d,p)-Basissatz für die Konformere $\text{InsP}_{8(5\text{ax}/1\text{äq})}$ und $\text{InsP}_{8(1\text{ax}/5\text{äq})}$ durchgeführt¹⁸². Die vorläufigen Berechnungen zeigten, dass im Vakuum analog zu 6-PP- InsP_5 das Konformer mit einem axialen und 5 äquatorialen Substituenten energetisch bevorzugt ist. Der Energieunterschied zwischen den Konformeren war jedoch geringer. Hier müssen analog zu den Simulationen von InsP_7 die Torsionen der O-P-Bindungen der Diphosphatgruppen bei der Startgeometrieauswahl berücksichtigt werden. Bei vier relevanten Torsionen ergibt sich jedoch eine Anzahl von potentiellen Konformationen, die sich nicht mehr analog zu den InsP_7 -Konformeren in einem adäquaten Zeitrahmen berechnen lassen. Die optimalen Diederwinkel wurden bei den vorläufigen GAUSSIAN98-Simulationen nicht berücksichtigt. Die Konformationsanalysen in Abhängigkeit von den Diederwinkeln (Tab. 3-9) zeigen aber sehr deutlich, dass der Energiebeitrag der Torsionen einen entscheidenden Einfluss auf die Gesamtenergie der Moleküle hat.

Konformation	ΔG [kJ mol ⁻¹]	Torsion 1 [°]	Torsion 2 [°]	Torsion 3 [°]	Torsion 4 [°]
5,6-bis-PP-InsP₄ (5ax/1äq)					
1	0,00	-136,26	-91,23	90,25	-62,26
2	0,42	-137,40	-131,78	149,14	-78,78
3	10,05	-136,53	-108,41	92,35	-119,62
4	12,56	-91,21	171,99	76,89	-131,78
5	25,54	46,21	-58,79	6,69	-96,18
5,6-bis-PP-InsP₄ (1ax/5äq)					
6	0,00	146,52	56,22	26,09	-114,30
7	2,51	143,66	-108,26	22,44	124,79
8	2,51	157,61	167,42	31,34	-121,59
9	6,28	158,89	-167,02	26,35	-81,29
10	7,12	149,64	-88,12	18,46	-122,65

Tab. 3-9: Torsionsenergien der 5 günstigsten Konformationen von 5,6-bis-PP-InsP₄(5ax/1äq) und 5,6-bis-PP-InsP₄(1ax/5äq) in Abhängigkeit von den 4 Diederwinkeln

Die Konformationen wurden durch eine Randomsuche mit dem Konformationsmodul von HyperSpin analysiert. Die Molekülgeometrien wurden in Abhängigkeit von den Diederwinkeln mit AM1 optimiert (Gradient 0,003 a.u.). Torsion 1 und 2: Diederwinkel der Diphosphatgruppe in 5-Position; Torsion 3 und 4: Diederwinkel der Diphosphatgruppe in 6-Position

Auch unter Berücksichtigung der optimierten Torsionen ist basierend auf semiempirischen Simulationen mit AM1 das InsP₈-Konformer mit einer axialen und 5 äquatorialen Substituenten energetisch begünstigt ($\Delta G = 18,4 \text{ kJ mol}^{-1}$). Das Gleichgewicht liegt im Vakuum wie bei den InsP₇-Konformeren weit auf der Seite dieses Konformers (99,94%). Im Rahmen dieser Arbeit war es bislang nicht möglich, für alle Konformationen *ab-initio*-Simulationen mit GAMESS im Vakuum und in wässriger Umgebung mit der B3LYP-Methode und dem 6-311G-Basissatz abzuschließen. Insbesondere das twisted-Konformer wurde noch nicht untersucht. Diese Konformation spielt vermutlich im Gleichgewicht ähnlich wie bei den InsP₇-Konformeren keine Rolle. Die Konformationen 1, 2 und 7 (Tab. 3-9) müssen ebenfalls noch simuliert werden. Die bisher kalkulierten Energien für zwei InsP₈-Konformationen sind in Tabelle 3-10 gegenübergestellt.

5,6-bis-PP-InsP₄	InsP₈(5ax/1äq)	InsP₈(1ax/5äq)
U _{Wasser} [a.u.] (Innere Energie ≡ Energie im Vakuum)	-5226,55651	-5226,54598
ΔU _{Wasser} [kJ mol ⁻¹]	-27,67	0,00
G _{elec} [a.u.] (elektrostatische Wechselwirkungen)	-0,14314	-0,16196
ΔG _{elec} [kJ mol ⁻¹]	49,45	0,00
G _{cav} [a.u.] (Pierotti Kavitationsenergie) ^(a)	0,13193	0,13193
ΔG _{cav} [kJ mol ⁻¹]	2,60	0,00
G _{vdW} [a.u.] (van der Waals- bzw. Dispersionswechselwirkungen)	-0,09582	-0,09441
ΔG _{vdW} [kJ mol ⁻¹]	1,63	0,00
G _{rep} [a.u.] (Abstoßungsenergie)	0,01249	0,01249
ΔG _{rep} [kJ mol ⁻¹]	0,00	0,00
G _{solv} [a.u.] (Gesamtwechselwirkungen) ^(b)	-0,09455	-0,11499
ΔG _{solv} [kJ mol ⁻¹]	53,69	0,00
G _{Wasser} [a.u.]	-5226,65106	-5226,66097
ΔG _{Wasser} [kJ mol ⁻¹]	26,05	0,00
5-Position Torsion 1/ Torsion 2 [°] ^(c)	114,87/-112,71	146,52/ 56,22
6-Position Torsion 1/ Torsion 2 [°] ^(c)	50,25/ -107,28	26,09/-114,30
Verteilung im Gleichgewicht [%] ^(d)	0	100

Tab. 3-10: Energien für InsP₈-Konformere in wässriger Umgebung aus GAMESS-Simulationen

InsP₈(5ax/1äq): Sesselkonformation mit 5 axialen und 1 äquatorialen Substituenten

InsP₈(1ax/5äq): Sesselkonformation mit 1 axialen und 5 äquatorialen Substituenten

Fett unterlegt sind jeweils die Werte für die stabilsten Konformationen

a: Die Kavitationsenergie ist die Energie, die zur Bildung von Hohlräumen aufgebracht werden muss. **b:** Die Gesamtwechselwirkungen entsprechen der Solvatationsenergie des Moleküls. **c:** ermittelt mit dem Programm Molden, <http://www.cmbi.kun.nl/~schaft/molden/molden.html>; **d:** ermittelt mit dem Programm Energy von H. Hönl, <http://www.cis.TUGraz.at/orgc/>

3.7.3 Diskussion der Ergebnisse der Molekülsimulationen

Die *ab-initio-Simulationen* der hochphosphorylierten Inositolphosphate haben gezeigt, dass InsP₆ im Vakuum überwiegend in der twisted-Konformation, 6-PP-InsP₅ und wahrscheinlich 5,6-bis-PP-InsP₄ dagegen in der Sesselkonformation mit einem axialen und 5 äquatorialen Substituenten vorliegen. In wässriger Umgebung sind durch den Einfluss des Solvents die Konformationen InsP₆(1ax/5äq), InsP₇(5ax/1äq) und InsP₈(1ax/5äq) energetisch bevorzugt (Abb. 3-25). Diese Ergebnisse liefern möglicherweise eine Erklärung für die unterschiedlichen Substrataffinitäten der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase.

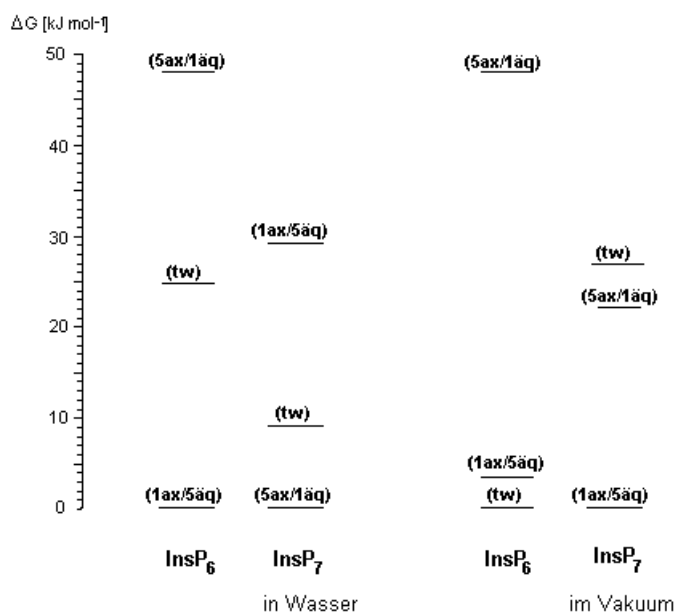


Abb. 3-25: Energiedifferenzen der einzelnen Konformationen für InsP₆ und 6-PP-InsP₅ in wässriger Umgebung und im Vakuum

Wie bereits erwähnt, katalysiert die InsP₇-Kinase hochspezifisch die reversible Phosphorylierung in 5-Position. Von der Kinase werden Substrate umgesetzt, die ortho-Phosphatgruppen in 1, 4 sowie 5-Position tragen und in 6-Position entweder eine ortho-Phosphat- oder Diphosphatgruppe besitzen. Diesen Bedingungen genügen die simulierten Inositolphosphate. Des Weiteren konnte durch chemische Derivatisierung gezeigt werden, dass die basische Aminosäure Histidin essentiell im aktiven Zentrum der Kinase ist. Die Derivatisierung von möglicherweise essentiellen Lysin- bzw. Argininresten im aktiven Zentrum zeigte keine Veränderung der Kinaseaktivität. Laussmann hat aufgrund seiner Ergebnisse ein vereinfachtes Modell des aktiven Zentrums der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase entworfen (Abb. 3-3, S. 78). Die Sequenzanalyse der InsP₇-Kinase durch Homologiesuchen ergab, dass sie eine konservative Inositolphosphatbindestelle besitzt, in der zwei Histidinreste und ein Lysinrest vorkommen. Dieser Lysinrest ist offensichtlich nicht essentiell für die Bindung der Substrate.

Die Inositolphosphatbindestelle muss für die Bindung der Substrate frei zugänglich sein. Für die Reaktion selbst ist eine hydrophobe Umgebung wichtig, um die Hydrolyse von ATP zu verhindern. Deshalb ist es vorstellbar, dass zunächst die Substrate binden und durch die Bindung die Konformation des Enzym-Substrat-Komplexes nach dem induced-fit Modell

verändert wird. Die Bindung erfolgt wahrscheinlich durch ionische Wechselwirkungen mit basischen Aminosäureresten. Bezogen auf die Substrate werden diese vermutlich in der dreidimensionalen Struktur gebunden, die *ab-initio* in wässriger Umgebung simuliert wurde. Durch die Konformationsänderung zum aktiven Enzym-Substrat-Komplex mit hydrophober Umgebung im aktiven Zentrum können die im Vakuum simulierten Strukturen als wahrscheinlich angenommen werden. Demnach wird InsP₇ in der Sesselkonformation 5ax/1äq gebunden. Die Phosphorylierung erfolgt in der Sesselkonformation 1ax/5äq (Abb. 3-26, oben). InsP₆ bindet in der Sesselkonformation 1ax/5äq und wird in der twisted-Konformation phosphoryliert (Abb. 3-26, unten). Die diesem Modell zugrunde liegenden Strukturen zeigen Ähnlichkeiten, aber auch wesentliche Unterschiede. Die Diphosphatgruppe des 6-PP-InsP₅ ragt neben der 5-Position heraus und dient möglicherweise als Fixierungsanker. Die Fixierung erfolgt aufgrund der negativen Ladungen über ionische Wechselwirkungen, die durch eine hydrophobe Umgebung verstärkt werden. InsP₆ in der Sesselkonformation 1ax/5äq kann ebenfalls in 6-Position fixiert werden. Allerdings ist mit dieser Strukturannahme die Bindung des Substrates durch ionische Wechselwirkungen in 1- und 4-Position fast auszuschließen. Die schwächere Bindung von InsP₆ an das Enzym sowie der höhere K_M-Wert für dieses Substrats lassen sich durch diese fehlenden Wechselwirkungen erklären.

Nach der Bindung findet sowohl eine Konformationsänderung des Enzym-Substrat-Komplexes wie auch der Substrate statt. Hier zeigt sich, dass InsP₆ aufgrund der geometrischen Anordnung der Phosphatgruppen im Vergleich zum „optimalen“ Substrat nicht alle Bindungen mit dem Enzym ausbilden kann und dementsprechend die Dissoziation dieses Enzym-Substrat-Komplexes erleichtert wird.

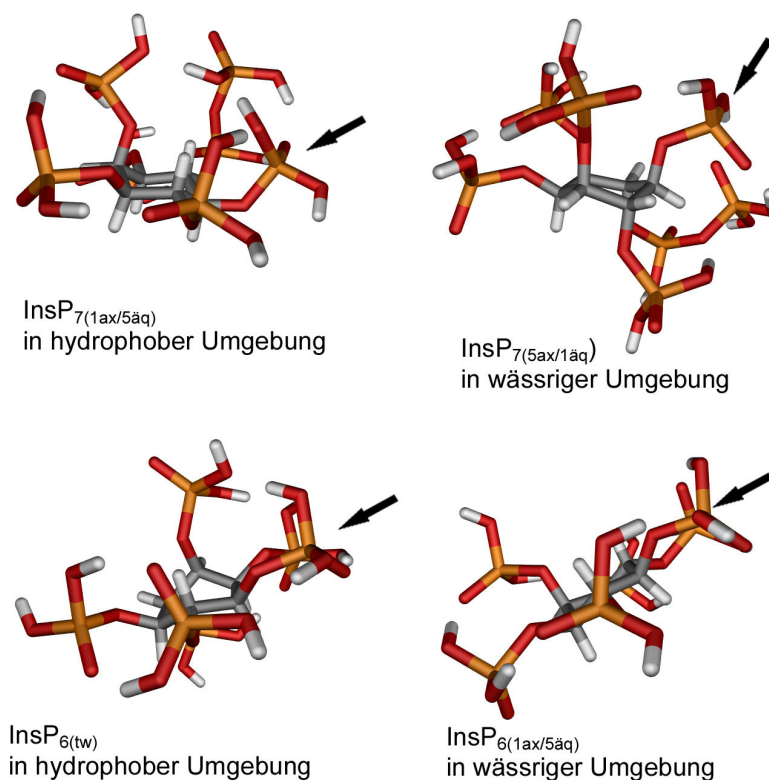


Abb. 3-26: Konformationen der hochphosphorylierten Inositolphosphate in Abhängigkeit von ihrer Umgebung

Dargestellt sind die optimierten Strukturen der stabilsten Konformationen von InsP_6 und 6-PP- InsP_5 . Mit den Pfeilen ist jeweils die 5-Position markiert, die phosphoryliert wird.

Bedingt durch die Primärstruktur der Inositolphosphatbindestelle ist davon auszugehen, dass hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat auftreten und vor allem im aktiven Komplex stärker ausgeprägt sind. InsP_6 und InsP_7 unterscheiden sich auch in der Fähigkeit, hydrophobe Wechselwirkungen einzugehen. Bei der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes liegt bei beiden Substraten eine Ringoberfläche relativ frei (Abb. 3-27), so dass hydrophobe Wechselwirkungen möglich sind. Diese können bei InsP_6 markanter sein als bei InsP_7 . Nach der Konformationsänderung sind ausgeprägte hydrophobe Wechselwirkungen nur noch mit InsP_7 möglich, während die Ringoberfläche des InsP_6 -Konformers durch die Phosphatgruppen teilweise abgeschirmt ist.

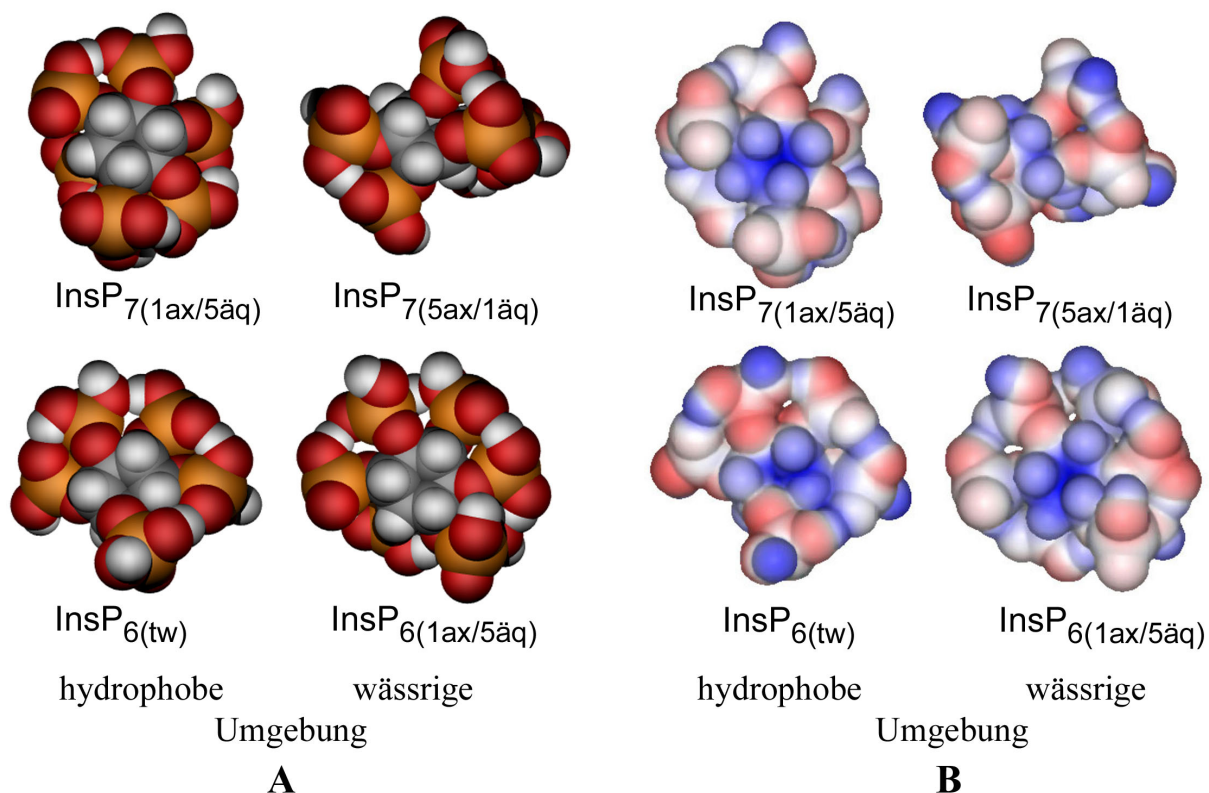


Abb. 3-27: Molekülstrukturen und elektrostatische Oberflächenpotentiale der relevanten InsP_x -Konformere

Dargestellt sind die energetisch günstigsten Konformationen von InsP_7 und InsP_6 in hydrophober und in wässriger Umgebung. Im Vergleich zu den Molekülstrukturen (A) sind die elektrostatischen Oberflächenpotentiale (B) der Ringoberflächen gezeigt, über die hydrophobe Wechselwirkungen mit der InsP_7 -Kinase möglich sind.

A grau: C; orange: P; rot: O; weiß: H

B weiß: neutrale Bereiche; rot: negative elektrostatische Potentiale; blau: positive elektrostatische Potentiale

Die Phosphorylierung in 5-Position ist aufgrund der Strukturen beider Substrate prinzipiell möglich, da die Phosphatgruppe zugänglich ist. Dennoch ist auch hier ein Unterschied erkennbar. Die benachbarte Phosphatgruppe in 6-Position liegt bei InsP_6 räumlich näher an der Phosphorylierungsposition, so dass die Phosphatgruppenübertragung von ATP sowohl sterisch wie auch elektronisch leicht behindert wird. Möglicherweise ist das die Erklärung für die langsamere Umsetzung von InsP_6 (Wechselzahl = 0,15 Moleküle s^{-1}) im Vergleich zu InsP_7 (Wechselzahl = 5,2 Moleküle s^{-1})⁶.

Die InsP_7 -Kinase zeigt ähnliche Affinitäten gegenüber InsP_7 und InsP_8 . Die Dephosphorylierung von InsP_8 (Wechselzahl = 1,3 Moleküle s^{-1}) erfolgt aber langsamer als die Phosphorylierung von InsP_7 . Es wurden nicht alle Strukturen der InsP_8 -Konformere *ab-initio* simuliert. Deshalb kann bislang nur eine Tendenz gezeigt werden. Die vorläufigen Vakuumsimulationen ergaben geringere Energiedifferenzen der Sesselkonformationen für

InsP₈ als für InsP₇. Das InsP₈-Konformer mit 5 äquatorialen Substituenten scheint energetisch bevorzugt zu sein. In wässriger Umgebung ist nach den vorläufigen Simulationen diese Konformation ebenfalls begünstigt. Man kann davon ausgehen, dass InsP₈ an das Enzym bindet und möglicherweise ohne Konformationsänderung dephosphoryliert wird. Der Unterschied der Wechselzahlen ist wahrscheinlich auf die unterschiedliche geometrische Anordnung der Diphosphatgruppen zurückzuführen. Eine genauere Betrachtung ist allerdings erst nach der Simulation aller Konformationen mit den gleichen Parametern möglich.

Die Tertiärstruktur eines Proteins kann ebenfalls mittels Molecular Modelling vorhergesagt werden. *Ab-initio*-Simulationen sind aufgrund der Molekülgrößen zur Zeit noch nicht möglich. Es wurden aber verschiedene Methoden entwickelt, die eine Vorhersage der dreidimensionalen Proteinstruktur erlauben. Zunächst werden bei allen Methoden ausgehend von der Primärstruktur homologe Proteine gesucht und parallel dazu Sekundärstrukturmerkmale ermittelt. Bei dem Homologie-Modelling werden dann vorhandene Strukturdaten von homologen Proteinen mit den Sekundärstrukturmerkmalen verglichen. Basierend auf den Übereinstimmungen erfolgt dann ein Strukturvorschlag. Zur Zeit ist es trotz bekannter Primärstruktur der InsP₇-Kinase nicht möglich, eine Tertiärstruktur mit dieser Methode vorherzusagen, da keine vergleichbaren Strukturdaten in den Proteindatenbanken vorliegen. Eine weitere Methode der Tertiärstrukturvorhersage bietet das sogenannte Threading. Dabei wird ausgehend von bereits vorhandenen Supersekundärstrukturen versucht, eine Proteinsequenz in alle möglichen Faltungsmotive einzupassen. Diese Methode bezieht ihre Berechtigung aus der Tatsache, dass im Verlauf der Evolution nur eine begrenzte Zahl prinzipieller Supersekundärstrukturen entstanden sind. Verschiedene Computerprogramme stehen online für die threading-basierte Strukturvorhersage von Proteinen zur Verfügung. Die meisten dieser Programme berechnen ein Modell des Proteins auf der Basis der gesamten Proteinsequenz. Die Tertiärstrukturvorhersagen für die InsP₇-Kinase mit diesen Programmen ergab verschiedene Modellvorschläge, die jedoch alle sehr unwahrscheinlich sind, da der Vergleich der Sequenzdivergenz zwischen der InsP₇-Kinase und den Modellproteinen sehr große Abweichungen ergab. LOOPP^{183,184,185} ist augenblicklich das einzige Programm, das Teile der Primärstruktur eines Proteins analysiert. Passende Teilstrukturen werden dann zu einem Gesamtmodell zusammengefügt. Abbildung 3-28 zeigt eine mögliche Tertiärstruktur der InsP₇-Kinase.

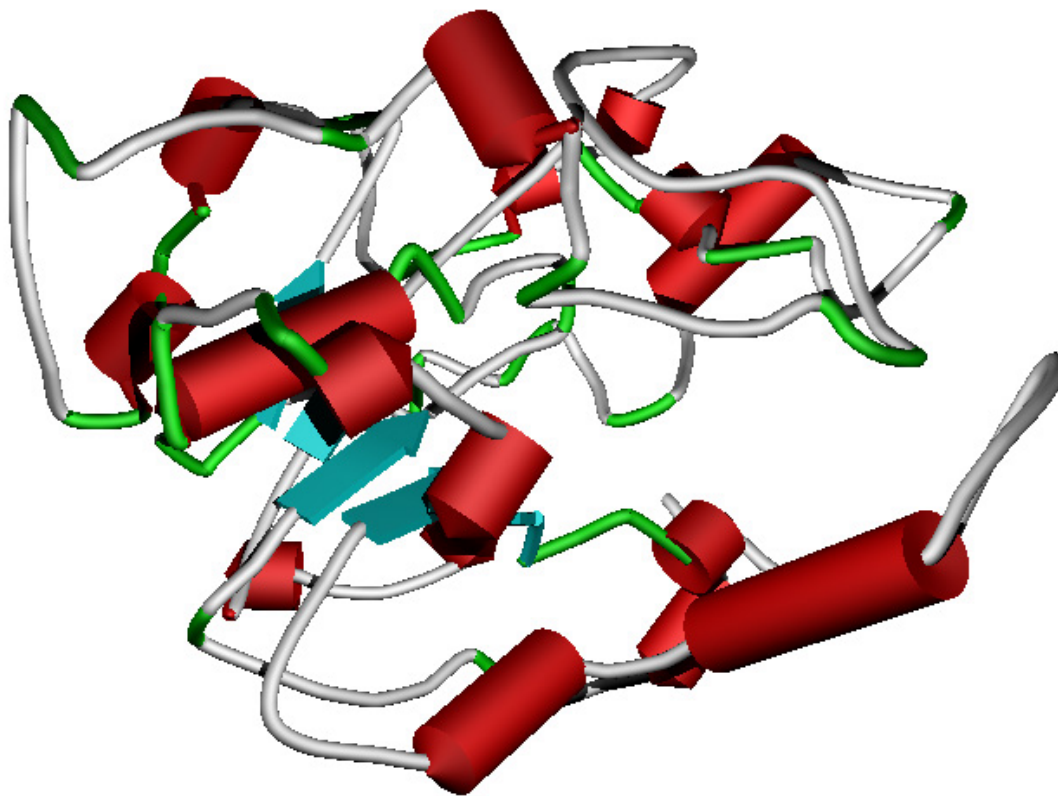


Abb. 3-28: Vorschlag einer Tertiärstruktur für die InsP₇-Kinase

Die Tertiärstruktur wurde mit LOOPP v3.0 (<http://www.tc.cornell.edu/research/cbsu/>, Computational Biology Service Unit am the Cornell Theory Center, Ithaca, NY) vorhergesagt. Die InsP₇-Kinase zeigt 27% Sequenzidentität zu dem Modellprotein, das strukturell den Alpha und Beta-Proteinen und einer Nucleosidtriphosphatase zugeordnet wird^{186,187}.

Rot: Helixstrukturen; **Blau:** Faltblattstrukturen, die Pfeilspitze ist zum C-Terminus gerichtet; **Grün:** Schleifen; **Grau:** unstrukturierte Bereiche

Drei Motive in der Proteinsequenz können, wie bereits erwähnt (Kap. 3.4.4), durch Homologiesuchen definiert werden: die Inositolphosphatbindestelle (Aminosäuren 69–84), die ATP-Bindestelle (Aminosäuren 228-234) und die katalytisch wichtige C-terminale Domäne (Aminosäuren 278–300). Auf der Basis dieser theoretischen Strukturvorhersage für die InsP₇-Kinase lässt sich jedoch die Anordnung der InsP- und ATP-Bindestelle zueinander nicht zeigen, die für ein verbessertes Modell des aktiven Zentrums relevant wäre. Erst mit einem genaueren Modell und den simulierten Substratstrukturen könnte möglicherweise die enzymatische Aktivität der Kinase gegenüber ihren Substraten verdeutlicht werden. Allerdings wird hier zum ersten Mal eine mögliche Struktur für ein Enzym vorgeschlagen, das am Stoffwechsel der hochphosphorylierten Inositolphosphate beteiligt ist.

4 Ausblick

Die physiologischen Funktionen und der Stoffwechsel der Diphosphoinositolphosphate *in vivo* sollten die Schwerpunkte weiterer Forschungsarbeit sein.

Ausgehend von dem identifizierten Gen der 6-PP-InsP₅-(5)-Kinase könnten, durch Gendeletion oder die reduzierte Translation der entsprechenden mRNA, Mutanten generiert werden. Der Phänotyp dieser Mutanten lässt dann möglicherweise Rückschlüsse auf die physiologische Bedeutung der PP-InsPs zu.

Durch weitere Genmanipulationen wie z.B. die Fusion der InsP₇-Kinase mit einem Green Fluorescent Protein (GFP) wäre es denkbar, zum einen die InsP₇-Kinase innerhalb der Zelle zu lokalisieren und zum anderen die Genexpression im Verlauf des Lebenszyklus zu untersuchen. Letzteres könnte die vermutete Regulation der Genexpression durch den „prestarvation response“ der Zellen belegen und gleichzeitig die Konzentrationsabhängigkeit der PP-InsPs vom Lebenszyklus erklären.

Es sollten außerdem die fehlenden Enzyme im Stoffwechsel der Diphosphoinositolphosphate identifiziert werden, deren Nachweis proteinchemisch bislang nicht gelungen ist. Möglicherweise kann bei der Suche nach diesen Enzymen die Synthese eines Antikörpers helfen, der die Sequenz der Inositolphosphatbindestelle in *Dictyostelium* spezifisch erkennt.

Ein interessanter Aspekt ist auch die weitere Analyse der Proteinphosphorylierung durch Diphosphoinositolphosphate bzw. ihre spezifische Bindung an Proteine. Hier hat die Identifizierung der Proteine, an die PP-InsPs binden, eine zentrale Bedeutung für die Klärung der Funktionen dieser Metabolite *in vivo*.

Daneben könnte der bislang rein theoretische Ansatz zur Konformationsanalyse der Diphosphoinositolphosphate weiter verfolgt werden. Insbesondere die Molekülsimulationen von 5-PP-InsP₅, 5,6-bis-PP-InsP₄ und 3,5-bis-PP-InsP₄ und im weiteren Verlauf der Aufbau eines neuronalen Netzes geben eventuell Hinweise auf den Enzymmechanismus der InsP₇-Kinase. Besonders reizvoll wäre in diesem Zusammenhang auch die Überexpression der Kinase, die möglicherweise ausreichendes Material für Röntgenstrukturanalysen und Bindungsstudien liefert. Damit könnten die theoretischen Ergebnisse experimentell bestätigt werden.

- ¹ Berridge, M.J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling, *Nature* 361, 315-25
- ² Europe-Finner, G.N., Gammon, B., Wood, C.A., Newell, P.C. (1989) Inositol tris- and polyphosphate formation during chemotaxis of *Dictyostelium*, *J. Cell Sci.* 93, 585-92
- ³ Europe-Finner, G.N., Gammon, B., Newell, P.C. (1991) Accumulation of [³H]-inositol into inositol polyphosphates during development of *Dictyostelium*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181(1), 191-6
- ⁴ Laussmann, T., Eujen, R., Weisshuhn, C.M., Thiel, U., Vogel, G. (1996) Structures of diphospho-*myo*-inositol pentakisphosphate and bisdiphospho-*myo*-inositol tetrakisphosphate from *Dictyostelium* resolved by NMR analysis, *Biochem. J.* 315, 715-20
- ⁵ Laussmann, T., Reddy, K.M., Reddy, K.K., Falck, J.R., Vogel, G. (1997) Diphospho-*myo*-inositol phosphates from *Dictyostelium* identified as D-6-diphospho-*myo*-inositol pentakisphosphate and D-5,6-bisdiphospho-*myo*-inositol tetrakisphosphate, *Biochem. J.* 322, 31-3
- ⁶ Laussmann, T. (1999) Diphosphoinositolphosphate in Dictyosteliden: Strukturen und Stoffwechsel, *Berichte aus der Biologie*, Shaker (Aachen), ISBN 3-8265-4972-4
- ⁷ Mayr, G.W. (1987) Inositol Phosphates: Structural Components, Regulators and Signal Transducers of the Cell - a Review, *Topics in Biochemistry*, Boehringer Mannheim, 1-18
- ⁸ IUPAC-IUB Commission of Biochemical Nomenclature (CNB) (1992) Numbering of atoms in *myo*-inositol, in *Biochemical Nomenclature and related documents*, 2nd Edn., Portland Press, London, 156-7
- ⁹ Brefeld, O. *Dictyostelium mucoroides*: Ein neuer Organismus aus der Verwandtschaft der Myxomyceten, *Abhandl. der Senckenb. naturf. G.*, Bd. VII
- ¹⁰ Raper, K.B. (1935) *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leaves, *J. Agr. Res.* 50(2), 133-47
- ¹¹ Vogel, G., Thilo, L., Schwarz, H., Steinhart, R. (1980) Mechanism of Phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*: Phagocytosis is Mediated by Different Recognition Sites as Disclosed by Mutants with Altered Phagocytic Properties, *J. Cell. Biol.* 86, 456-65
- ¹² Kessin, R.H. (1997) The Evolution of the Cellular Slime Molds in *Dictyostelium* – A Model System for Cell and Developmental Biology, FSS (Universal Academy Press, Inc. And Yamada Science Foundation) 21, 3-13
- ¹³ Vogel, G. (1981) Recognition Mechanism in Phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*, *Monogr. Allergy* 17, 1-11
- ¹⁴ Mueller-Taubenberger, A., Maniak, M. (2004) *Dictyostelium discoideum*: Cellular Slime Mold in *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, Meyers, R.A. ed., Wiley-VCH
- ¹⁵ Loomis, W.F., Smith, D.W. (1995) Consensus phylogeny of *Dictyostelium*, *Experientia* 51, 1110-15
- ¹⁶ Baldauf, S.L., Roger, A.J., Wenk-Siefert, I., Doolittle, W.F. (2000) A Kingdom-Level Phylogeny of Eukaryotes Based on Combined Protein Data, *Science* 290, 972-77
- ¹⁷ Glöckner, G., Eichinger, L., Szafranski, K., Pachebat, J.A., Bankier, A.T., Dear, P.H., Lehmann, R., Baumgart, C., Parra, G., Abril, J.F., Guigo, R., Kumpf, K., Tunggal, B., Cox,

- E., Quail, M.A., Platzer, M., Rosenthal, A., Noegel, A.A. (2002) Sequence and analysis of chromosome 2 of *Dictyostelium discoideum*, *Nature* 418, 79-85
- ¹⁸ Thiel, U. (1993) Inositolphosphate, Phosphoinositide und Signaltransduktion in *Dictyostelium discoideum* : Vergleich von Wildtyp und Phagozytosemutanten, Dissertation im Fachbereich 9, Chemie der Bergischen Universität Wuppertal
- ¹⁹ Fukuda, M., Mikoshiba, K. (1997) The function of inositol high polyphosphate binding proteins, *BioEssays* 19(7), 593-603
- ²⁰ Van Dijken, P., Bergsma, J.C., Hiemstra, H.S., De Vries, B., Van der Kaay, J., Van Haastert, P.J. (1996) *Dictyostelium discoideum* contains three inositol monophosphatase activities with different substrate specificities and sensitivities to lithium, *Biochem. J.* 314, 491-5
- ²¹ Van Lookeren-Campagne, M.M., Erneux, C., Van Eijk, R., Van Haastert P.J. (1988) Two dephosphorylation pathways of inositol 1,4,5-trisphosphate in homogenates of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*, *Biochem. J.* 254(2), 343-50
- ²² Stephens, L.R., Irvine, R.F. (1990) Stepwise phosphorylation of *myo*-inositol leading to *myo*-inositol hexakisphosphate in *Dictyostelium*, *Nature* 346(6284), 580-3
- ²³ Van Haastert, P.J., Van Dijken, P. (1997) Biochemistry and genetics of inositol phosphate metabolism in *Dictyostelium*, *FEBS Lett.* 410, 39-43
- ²⁴ Sylvia, V., Curtin, G., Norman, J., Stec, C., Busbee, D. (1988) Activation of a low specific activity form of DNA-polymerase α by inositol-1,4-bisphosphate, *Cell* 54, 651-8
- ²⁵ Woodcock, E.A. (1997) Inositol phosphates and inositol phospholipids: how big is the iceberg?, *Mol Cell Endocrinol.* 127, 1-10
- ²⁶ Drayer, A.L., Van der Kaay, J., Mayr, G.W., Van Haastert, P.J. (1994) Role of phospholipase C in *Dictyostelium*: Formation of inositol 1,4,5-trisphosphate and normal development in cells lacking phospholipase C activity, *EMBO J.* 13(7), 1601-9
- ²⁷ Van Dijken, P., de Haas, J.-R., Craxton, A., Erneux, C., Shears, S.B., Van Haastert, P.J.M. (1995) A Novel, Phospholipase C-independent Pathway of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Formation in *Dictyostelium* and Rat Liver, *JBC* 270(50), 29724-31
- ²⁸ Dvorakova, J. (1998) Phytase: Sources, Preparation and Exploitation, *Folia Microbiol.* 43 (4), 323-38
- ²⁹ Adelt, S., Plettenburg, O., Stricker, R., Reiser, G., Altenbach, H.J., Vogel, G. (1999) Enzyme-Assisted Total Synthesis of the Optical Antipodes D-*myo*-Inositol 3,4,5-Trisphosphate and D-*myo*-Inositol 1,5,6-Trisphosphate: Aspects of Their Structure-Activity Relationship to Biologically Active Inositol Phosphates, *J. Med. Chem.* 42(7), 1262-73
- ³⁰ Adelt, S. (1999) Untersuchungen zum Stoffwechsel von *myo*-Inositolpolyphosphaten in *Dictyostelium discoideum*: Anreicherung und Charakterisierung von Phosphohydrolasen- Thesen zur physiologischen Funktion und Anwendungen bei der Enzym-unterstützten Synthese biologisch aktiver Inositolphosphate, *Berichte aus der Biologie*, Shaker (Aachen), ISBN 3-8265-6760-9
- ³¹ Shears, S.B. (2004) How versatile are inositol phosphate kinases?, *Biochem. J.* 377(2), 265-80

- ³² Irvine, R.F. (2001) Inositol phosphates: Does IP₄ run a protection racket?, *Current Biology* *11*(5), R172-R174
- ³³ Irvine, R.F. (1995) Inositide Evolution: What can it tell us about Functions, *Biochem. Soc. Transact.*, Morton Lecture, 23
- ³⁴ Irvine, R.F., Schell, M.J. (2001) Back In The Water: The Return Of The Inositol Phosphates, *Nat. Rev., Mol. Cell. Biol.* *2*(5), 327-38
- ³⁵ Shears, S.B. (1998) The versatility of inositol phosphates as cellular signals, *Biochim. Biophys. Acta* *1436*, 49-67
- ³⁶ Van der Kaay, J., Wesseling, J., Van Haastert, P.J. (1995) Nucleus-associated phosphorylation of Ins(1,4,5)P₃ to InsP₆ in *Dictyostelium*, *Biochem. J.* *312*, 911-7
- ³⁷ Downes, C.P., MacPhee, C.H. (1990) Review: *myo*-Inositol metabolites as cellular signals, *Eur. J. Biochem.* *193*, 1-18
- ³⁸ Fisher, S.K., Novak, J.E., Agranoff, B.W. (2002) Inositol and higher inositol phosphates in neural tissues: homeostasis, metabolism and functional significance, *J. Neurochem.* *82*, 736-54
- ³⁹ Shears S.B. (2001) Review Article: Assessing the omnipotence of inositol hexakisphosphate, *Cellular Signalling* *13*, 151-8
- ⁴⁰ Ives, E.B., Nichols, J., Wentz, S.R., York, J.D. (2000) Biochemical and Functional Characterization of Inositol 1,3,4,5,6-Pentakisphosphate 2-Kinases, *JBC* *275*, 36575-83
- ⁴¹ Graf, E., Eaton, J.W. (1985) Dietary suppression of colonic cancer; fiber or phytate?, *Cancer* *56*, 717-8
- ⁴² Shamsuddin, A.M. (1995) Inositol phosphates have novel anticancer function, *Journal of Nutrition* *125*, 725s-32s
- ⁴³ Flores, S., Smart, C. (2000) Abscisic acid-induced changes in inositol metabolism in *Spirodela polyrrhiza*, *Planta* *211*, 823-32
- ⁴⁴ Lemtiri-Chlieh, F., MacRobbie, E.A.C., Webb, A.A.R., Manison, N.F., Brownlee, C., Skepper, J.N., Chen, J., Prestwich, G.D., Brearley, C.A. (2003) Inositol hexakisphosphate mobilizes an endomembrane store of calcium in guard cells, *PNAS* *100*(17), 10091-5
- ⁴⁵ Jariwalla, R.J. (1999) Inositol hexaphosphate (IP₆) as an anti-neoplastic and lipid-lowering agent, *Anticancer Res.* *19*, 3699-702
- ⁴⁶ Grases, F., Garcia-Gonzales, R., Torres, J.J., Llobera, A. (1998) Effects of phytic acid on renal stone formation in rats, *Scand. J. Urol. Nephrol.* *32*, 262-5
- ⁴⁷ Graf, E., Empson, K.L., Eaton, J.W. (1987) Phytic acid. A Natural Antioxidant, *JBC* *262*, 11647-50
- ⁴⁸ Sasakawa, N., Sharif, M., Hanley, M.R. (1995) Metabolism and Biological Activities of Inositol Pentakisphosphate and Inositol Hexakisphosphate, *Biochemical Pharmacology* *50*(2), 137-46
- ⁴⁹ Voglmaier, 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*, 158-63

- ⁵⁰ 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, *JBC* 270, 1564-8
- ⁵¹ Gaidarov, I., Krupnick, J.G., Falck, J.R., Benovic, J.L., Keen, J.H. (1999) Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding, *EMBO J.* 18(4), 871-81
- ⁵² Fleischer, B., Xie, J., Mayrleitner, M., Shears, S.B., Palmer, D.J., Fleischer, S. (1994) Golgi Coatamer Binds, and Forms K⁺-selective Channels Gated by Inositol Phosphates, *JBC* 269, 17826-32
- ⁵³ 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, 279-84
- ⁵⁴ Hilton, J.M., Plomann, M., Ritter, B., Modregger, J., Freeman, H.N., Falck, J.R., Krishna, U.M., Tobin, A.B. (2001) Phosphorylation of a Synaptic Vesicle-associated Protein by an Inositol Hexakisphosphate-regulated Protein Kinase, *JBC* 276(19), 16341-7
- ⁵⁵ Hanakahi, L.A., Bartlett-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, 721-9
- ⁵⁶ York, J.D., Odom, A.R., Murphy, R., Ives, E.A., Wente, S.R. (1999) A Phospholipase C-Dependent Inositol Polyphosphate Kinase Pathway Required for Efficient Messenger RNA Export, *Science* 285, 96-100
- ⁵⁷ York, J.D., Guo, S., Odom, A.R., Spiegelberg, B.D., Stolz, L.E. (2001) An Expanded View of Inositol Signaling, *Advan. Enzyme Regul.* 41, 57-71
- ⁵⁸ Feng, Y., Wente, S.R., Majerus, P.W. (2001) Overexpression of the inositol phosphatase SopB in human 293 cells stimulates cellular chlorid influx and inhibits nuclear mRNA export, *PNAS* 98(3), 875-9
- ⁵⁹ Shears, S.B. (2000) Transcriptional regulation: a new dominion for inositol phosphate signaling, *BioEssays* 22, 786-9
- ⁶⁰ Mayr, G.W., Radenberg, T., Thiel, U., Vogel, G., Stephens, L. (1992) Phosphoinositol Diphosphates: non-enzymatic formation *in vitro* and occurrence *in vivo* in the cellular slime mold *Dictyostelium*, *Carbohydrate Research* 234, 247-262
- ⁶¹ Martin, J.-B., Bakker-Grunwald, T., Klein, G. (1993) ³¹P-NMR analysis of *Entamoeba histolytica* occurrence of high amounts of two inositol phosphates, *Eur. J. Biochem.* 214, 711-18
- ⁶² Martin, J.-B., Bakker-Grunwald, T., Klein, G. (1995) Metabolites of the Free-Living-Amoeba *Phreatamoeba balamuthi* Analyzed by ¹³C- and ³¹P-NMR Spectroscopy: Occurrence of Phosphoinositol Diphosphates, *J. Eukaryotic Microbiology* 42(2), 183-191
- ⁶³ Laussmann, T., Pikzack, C., Thiel, U., Mayr, G.W., Vogel, G. (2000) Diphospho-myoinositol phosphates during the life cycle of *Dictyostelium* and *Polysphondylium*, *Eur. J. Biochem.* 267, 2447-51
- ⁶⁴ Stephens, L., Radenberg, T., Thiel, U., Vogel, G., Khoo, K.-H., Dell, A., Jackson, T.R., Hawkins, P.T., Mayr, G.W. (1993) The Detection, Purification, Structural Characterisation and Metabolism of Diphosphoinositol Pentakisphosphate(s) and Bisdiphosphoinositol Tetrakisphosphate(s), *JBC* 268(6), 4009-15

- ⁶⁵ Laussmann, T., Hansen, A., Reddy, K.M., Reddy, K.K., Falck, J.R., Vogel, G. (1998) Diphospho-*myo*-inositol phosphates in *Dictyostelium* and *Polysphondylium*: identification of a new bisphospho-*myo*-inositol tetrakisphosphate, FEBS Lett. 426, 145-150
- ⁶⁶ Shears, S.B., Ali, N., Craxton, A., Bembenek, M.E. (1995) Synthesis and Metabolism of Bisdiphosphoinositol Tetrakisphosphate *in Vitro* and *in Vivo*, JBC 270(18), 10489-97
- ⁶⁷ Menniti, F.S., Miller, R.N., Putney, J.W., Shears, S.B. (1993) Turnover of Inositol Polyphosphate Pyrophosphates in Pancreatoma Cells, JBC 268(2), 3850-8
- ⁶⁸ Glennon, M.C., Shears, S.B. (1993) Turnover of inositol pentakisphosphates, inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol polyphosphates in primary cultured hepatocytes, Biochem. J. 293, 583-90
- ⁶⁹ Albert, C., Safrany, S.T., Bembenek, M.E., Reddy, K.M., Reddy, K.K., Falck, J.R., Bröcker, M., Shears, S.B., Mayr, G.W. (1997) Biological variability in the structures of diphosphoinositol polyphosphates in *Dictyostelium discoideum* and mammalian cells, Biochem. J. 327, 553-560
- ⁷⁰ Safrany, S.T., Caffrey, J.J., Yang, X., Shears, S.B. (1999) Diphosphoinositol Polyphosphates: The Final Frontier for Inositide Research?, Biol. Chem. 380, 945-51
- ⁷¹ Ubeidat, M. (1999) Inositol Phosphate Metabolism in *Dictyostelium discoideum*: Purification and Characterization of a *myo*-Inositol Pentakisphosphate 3/5-Kinase, Dissertation im Fachbereich 9, Chemie der Bergischen Universität Wuppertal
- ⁷² Luo, H., Huang, Y.E., Chen, J.C., Saiardi, A., Iijima, M., Ye, K., Huang, Y., Nagata, E., Devreotes, P., Snyder, S.H. (2003) Inositol Pyrophosphates Mediate Chemotaxis in *Dictyostelium* via Pleckstrin Homology Domain-PtdIns(3,4,5)P₃ Interactions, Cell 114, 559-72
- ⁷³ Verkere-Van Wijk, I., Schaap, P. (1997) cAMP, A Signal for Survival in *Dictyostelium*— A Model System for Cell and Developmental Biology, FSS (Universal Academy Press, Inc. And Yamada Science Foundation) 21, 145-62
- ⁷⁴ Saiardi, A., Nagata, E., Luo, H.R., Sawa, A., Luo, X., Snowman, A.M., Snyder, S.H. (2001) Mammalian inositol polyphosphate multikinase synthesizes inositol 1,4,5-trisphosphate and an inositol pyrophosphate, PNAS 98(5), 2306-11
- ⁷⁵ Saiardi, A., Caffrey, J.J., Snyder, S.H., Shears, S.B. (2000) Inositol polyphosphate multikinase (AgRIII) determines nuclear mRNA export in *Saccharomyces cerevisiae*, FEBS Lett. 468, 28-32
- ⁷⁶ Saiardi, A., Caffrey, J.J., Snyder, S.H., Shears, S.B. (2000) The Inositol Hexakisphosphate Kinase Family; Catalytic Flexibility And Function In Yeast Vacuole Biogenesis, JBC 275(32), 24686-92
- ⁷⁷ Saiardi, A., Nagata, E., Luo, H.R., Snowman, A.M., Snyder, S.H. (2001) Identification and Characterization of a Novel Inositol Hexakisphosphate Kinase, JBC 276(42), 39179-85
- ⁷⁸ Schell, M.J., Letcher, A.J., Brearley, C.A., Biber, J., Murer, H., Irvine, F. (1999) PiUS (Pi uptake stimulator) is an inositol hexakisphosphate kinase, FEBS Lett. 461, 169-72
- ⁷⁹ Huang, C.F., Voglmaier, S.M., Bembenek, M.E., Saiardi, A., Snyder, S.H. (1998) Identification and Purification of Diphosphoinositol Pentakisphosphate Kinase, Which Synthesizes the Inositol Pyrophosphate Bis(diphospho)inositol Tetrakisphosphate, Biochemistry 37, 14998-15004

- ⁸⁰ Craxton, A., Caffrey, J.J., Burkhart, W., Safrany, S.T., Shears, S.B. (1997) Molecular cloning and expression of a rat hepatic multiple inositol polyphosphate phosphatase, *Biochem. J.* 328, 75-81
- ⁸¹ Safrany, S.T., Caffrey, J.J., Yang, X., Bembenek, M.E., Moye, M.B., Burkhart, W.A., Shears, S.B. (1998) A novel context for the 'MutT' module, a guardian of cell integrity, in a diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase, *EMBO J.* 17(22), 6599-607
- ⁸² Caffrey, J.J., Safrany, S.T., Yang, X., Shears, S.B. (2000) Discovery of Molecular and Catalytic Diversity among Human Diphosphoinositol-Polyphosphate Phosphohydrolases; An Expanding NUDT Family, *JBC* 275(17), 12730-6
- ⁸³ Hidaka, K., Caffrey, J.J., Hua, L., Zhang, T., Falck, J.R., Nickel, G.C., Carrel, L., Barnes, L.D., Shears, S.B. (2002) An Adjacent Pair of Human NUDT Genes on Chromosome X Are Preferentially Expressed in Testis and Encode Two New Isoforms of Diphosphoinositol Polyphosphate Phosphohydrolases, *JBC* 277(36), 32730-8
- ⁸⁴ Hua, L.V., Hidaka, K., Pesesse, X., Barnes, L.D., Shears, S.B. (2003) Paralogous Murine *Nudt10* and *Nudt11* genes have differential expression patterns but encode identical proteins that are physiologically competent diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolases, *Biochem. J.* 373, 81-9
- ⁸⁵ Safrany, S.T., Shears, S.B. (1998) Turnover of bis-diphosphoinositol tetrakisphosphate in a smooth muscle cell line is regulated by β_2 -adrenergic receptors through a cAMP-mediated, A-kinase-independent mechanism, *EMBO J.* 17(6), 1710-6
- ⁸⁶ Martin, J.B., Forey, M.F., Klein, G., Satre, M. (1987) Identification of inositol hexakisphosphate in ³¹P-NMR spectra of *Dictyostelium discoideum* amoeba. Relevance to intracellular pH determination, *Biochim. Biophys. Acta* 931, 16-25
- ⁸⁷ Voglmaier, S.M., Bembenek, M.E., Kaplin, A.I., Dormán, G., Olszewski, J.D., Prestwich, G.D., Snyder, S.H. (1996) Purified inositol hexakisphosphate kinase is an ATP synthase: Diphosphoinositol pentakisphosphate as a high-energy phosphate donor, *PNAS* 93, 430-10
- ⁸⁸ Saiardi, A., Sciambi, C., McCaffery, J.M., Wendland, B., Snyder, S.H. (2002) Inositol pyrophosphates regulate endocytotic trafficking, *PNAS* 99(22), 14206-11
- ⁸⁹ Dubois, E., Scherens, B., Vierendeels, F., Ho, M.M.W., Messenguy, F., Shears, S.B. (2002) In *Saccharomyces cerevisiae*, the Inositol Polyphosphate Kinase Activity of Kcs1p Is Required for Resistance to Salt Stress, Cell Wall Integrity and Vacuolar Morphogenesis, *JBC* 277(26), 23755-63
- ⁹⁰ 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 Guanin Nucleotide Exchange Factor for Rab3A, which Interacts with Inositol Hexakisphosphate Kinase, *Neuron* 31, 439-51
- ⁹¹ 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- β in Ovarian Carcinoma Cells, *JBC* 276(27), 24965-70
- ⁹² 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, 2509-15
- ⁹³ Ma, Y., Lieber, M.R. (2002) Binding of Inositol Hexakisphosphate (IP₆) to Ku but Not to DNA-PK_{cs}, *JBC* 277(13), 10756-59

- ⁹⁴ Huang, Y.E., Iijima, M., Parent, C.A., Funamoto, S., Firtel, R.A., Devreotes, P. (2003) Receptor-mediated regulation of PI3Ks confines PI(3,4,5)P₃ to the leading edge of chemotaxing cells, *Mol. Biol. Cell.* *14*(5), 1913-22
- ⁹⁵ Welker, D.L., Williams, K.L. (1982) A genetic map of *Dictyostelium discoideum* based on mitotic recombination, *Genetics* *102*(4), 691-710
- ⁹⁶ Winckler, T. (1998) Retrotransposable elements in the *Dictyostelium discoideum* genome, *Cell. Mol. Life Sci.* *54*(5): 383-93
- ⁹⁷ Winckler, T. Dingermann, T., Glöckner, G. (2002) *Dictyostelium* mobile elements: strategies to amplify in a compact genome, *Cell. Mol. Life Sci.* *59*, 2097-111
- ⁹⁸ Glöckner, G., Szafranski, K., Winckler, T., Dingermann, T., Quail, M.A., Cox, E., Eichinger, L., Noegel, A.A., Rosenthal, A. (2001) The Complex Repeats of *Dictyostelium discoideum*, *Genome Res.* *11*, 585-94
- ⁹⁹ Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G. (1996) Life with 6000 genes, *Science* *274*(5287), 546, 563-7
- ¹⁰⁰ Adams, M.D. et.al. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*, *Science* *287*, 2185-95
- ¹⁰¹ Waterston, R., Sulston, J. (1995) The genome of *Caenorhabditis elegans*, *PNAS* *92*(24), 10836-40
- ¹⁰² Rivero, F. (2002) mRNA processing in *Dictyostelium*: Sequence Requirements for Termination and Splicing, *Protist* *153*(2), 169-76
- ¹⁰³ Venter, J.C. et. al. (2001) The sequence of the human genome, *Science* *291*(5507), 1304-51, Erratum in: *Science* 2001 *292*(5523), 1838
- ¹⁰⁴ Kuspa, W.F., Loomis, A. (1997) The Genome of *Dictyostelium discoideum*, FSS (Universal Academy Press, Inc. And Yamada Science Foundation) *21*, 15-30
- ¹⁰⁵ Ogawa, S., Yoshino, R., Angata, K., Iwamoto, M., Pi, M., Kuroe, K., Matsuo, K., Morio, T., Urushihara, H., Yanagisawa, K., Tanaka, Y. (2000) The mitochondrial DNA of *Dictyostelium discoideum*: complete sequence, gene content and genome organization, *Mol. Gen. Genet.* *263*, 514-9
- ¹⁰⁶ Sugang, R., Chen, G., Liu, W., Lindsay, R., Lu, J., Muzny, D., Shaulsky, G., Loomis, W., Gibbs, R., Kuspa, A. (2003) Sequence and structure of the extrachromosomal palindrome encoding the ribosomal RNA genes in *Dictyostelium*, *Nucleic Acids Res.* *31*(9), 2361-8
- ¹⁰⁷ Kuspa, A., Sugang, R., Shaulsky, G. (2001) The promise of a protist: the *Dictyostelium* genome project, *Funct. Integr. Genomics* *1*(5), 279-93
- ¹⁰⁸ Eichinger, L., Noegel, A.A. (2003) Crawling into a new era-the *Dictyostelium* genome project, *EMBO J.* *22*(9), 1941-6
- ¹⁰⁹ Kuspa, A., Loomis, W.F. (1996) Ordered yeast artificial chromosome clones representing the *Dictyostelium discoideum* genome, *PNAS* *93*(11), 5562-6
- ¹¹⁰ Cox, E.C., Vocke, C.D., Walter, S., Gregg, K.Y., Bain, E.S. (1990) Electrophoretic karyotype for *Dictyostelium discoideum*, *PNAS* *87*, 8247-51
- ¹¹¹ Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) Basic local alignmentsearch tool, *J. Mol. Biol.* *215*, 403-10

- ¹¹² Konfortov, B.A., Cohen, H.M., Bankier, A.T., Dear, P.H. (2000) A High-Resolution HAPPY Map of *Dictyostelium discoideum* Chromosome 6, *Genome Res.* 10(11), 1737-42
- ¹¹³ Williams, J.G., Firtel, R.A. (2000) HAPPY days for the *Dictyostelium* genome project, *Genome Res.* 10(11), 1658-9
- ¹¹⁴ Kuspa, A., Maghakian, D., Bergesch, P., Loomis, W.F. (1992) Physical mapping of genes to specific chromosomes in *Dictyostelium discoideum*, *Genomics* 13(1), 49-61.
- ¹¹⁵ Urushihara, H. (2002) Functional genomics of the social amoebae, *Dictyostelium discoideum*, *Mol. Cells* 13(1), 1-4
- ¹¹⁶ Morio, T., Urushihara, H., Saito, T., Ugawa, Y., Mizuno, H., Yoshida, M., Yoshino, R., Mitra, B.N., Pi, M., Sato, T., Takemoto, K., Yasukawa, H., Williams, J., Maeda, M., Takeuchi, I., Ochiai, H., Tanaka, Y. (1998) The *Dictyostelium* developmental cDNA project: generation and analysis of expressed sequence tags from the first-finger stage of development, *DNA Res.* 5(6), 335-40
- ¹¹⁷ Eichinger, L. (2003) Revamp a model - status and prospects of the *Dictyostelium* genome project, *Current Genetics* 44(2), 59-72
- ¹¹⁸ Yan, J.X., Gooley, A.A., Williams, K.L. (1997) The *Dictyostelium* Proteome Project: Studying the Readout of the Genome, FSS (Universal Academy Press, Inc. And Yamada Science Foundation) 21, 455-69
- ¹¹⁹ Srinivasan, S., Traini, M., Herbert, B., Sexton, D., Harry, J., Alexander, H., Williams, K.L., Alexander, S. (2001) Proteomic analysis of a developmentally regulated secretory vesicle, *Proteomics* 1, 1119-27
- ¹²⁰ Yan, J.X., Tonella, L., Sanchez, J.C., Wilkins, M.R., Packer, N.H., Gooley, A.A., Hochstrasser, D.F., Williams, K.L. (1997) The *Dictyostelium discoideum* proteome – the SWISS-2DPAGE database of the multicellular aggregate (slug), *Electrophoresis* 18, 491-7
- ¹²¹ Sugang, R., Shaulsky, G., Kuspa, A. (2000) Toward the functional analysis of the *Dictyostelium discoideum* genome, *J. Eukaryot. Microbiol.* 47(4), 334-9
- ¹²² Van Driessche, N., Shaw, C., Katoh, M., Morio, T., Sugang, R., Ibarra, M., Kuwayama, H., Saito, T., Urushihara, H., Maeda, M., Takeuchi, I., Ochiai, H., Eaton, W., Tollett, J., Halter, J., Kuspa, A., Tanaka, Y., Shaulsky, G. (2002) A transcriptional profile of multicellular development in *Dictyostelium discoideum*, *Development* 129(7), 1543-52
- ¹²³ Iranfar, N., Fuller, D., Sasik, R., Hwa, T., Laub, M., Loomis, W.F. (2001) Expression patterns of cell-type-specific genes in *Dictyostelium*, *Mol. Biol. Cell* 12(9), 2590-600
- ¹²⁴ Iranfar, N., Fuller, D., Loomis, W.F. (2003) Genome-wide expression analyses of gene regulation during early development of *Dictyostelium discoideum*, *Eukaryot. Cell* 2(4), 664-70
- ¹²⁵ Kreppel, L., Kimmel, A.R. (2002) Genomic database resources for *Dictyostelium discoideum*, *Nucleic Acids Research* 30(1), 84-6
- ¹²⁶ Smith, Loomis (1997) DictyDB - A Genomic Database, FSS (Universal Academy Press, Inc. And Yamada Science Foundation) 21, 471-7
- ¹²⁷ Trautwein, C. (1999) Untersuchungen zur physiologischen Funktion von „energiereichen“ Diphosphoinositolphosphaten, Diplomarbeit im Fachbereich 9, Chemie der Bergischen Universität Wuppertal

- ¹²⁸ Watts, D.J. and Ashworth, J.M. (1970) Growth of Myxamobae of a cellular slime mold *Dictyostelium discoideum* in axenic culture, *Biochem. J.* *119*, 171-174
- ¹²⁹ Sussman, M. (1987) Cultivation and Synchronous Morphogenesis of *Dictyostelium* under controlled experimental conditions, *Methods in Cell Biology* *28*, 9-29
- ¹³⁰ Mayr, G.W. (1988) A novel metal-dye-detection system permits picomolar-range h.p.l.c. analysis of inositol polyphosphates from non-radioactively labelled cell or tissue specimens, *Biochem. J.* *254*, 585-91
- ¹³¹ Lanzetta, P.A., Alvarez, L.J., Reinach, P.S., Candia, O.A. (1979) An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate, *Anal. Biochem.* *100*, 95-97
- ¹³² Mayr, G.W. (1990) Mass Determination of Inositol Phosphates by High-Performance-Liquid-Chromatography with Postcolumn Complexometry (Metal-Dye-Detection) in : *Methods in Inositol Research* (Irvine, R.F.ed.), Raven Press, N.Y., 83-108
- ¹³³ Michov, B.M. (1995) Elektrophorese: Theorie und Praxis, de Gruyter, Kapitel 2.7
- ¹³⁴ Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* *224*, 680-685
- ¹³⁵ Blake, M.S., Johnston, K.H., Russel-Jones, G.J., Gotschlich, E.C. (1984) A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western-blots, *Anal. Biochem.* *136*, 175-9
- ¹³⁶ Das, O.P., Henderson, E.J. (1983) A novel technique for gentle lysis of eukaryotic cells. Isolation of plasma membrane from *Dictyostelium discoideum*, *Biochim. Biophys. Acta* *736*, 45-56
- ¹³⁷ Marecek, J.F., Prestwich, G. (1991) Synthesis of Tethered Phytic Acid, *Tetrahedron Letters* *32*, 1863-6
- ¹³⁸ Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Lacomis, L., Grewal, A., Annan, R.S., McNulty, D.E., Carr, S.A., Tempst, P. (1998) Examination of micro-tip reversed-phase liquid chromatographic extraction of peptide pools for mass spectrometric analysis, *J. Chromatogr. A* *826*, 167-181
- ¹³⁹ Nellen, W., Datta, S., Reymond, C., Sivertsen, A., Mann, S., Crowley, T., Firtel, R.A. (1987) Molecular biology in *Dictyostelium*: tools and applications, *Methods Cell Biol.* *28*, 67-100
- ¹⁴⁰ Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning – A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- ¹⁴¹ Warrick, H.M., Spudich, J.A. (1988) Codon preference in *Dictyostelium discoideum*, *Nucleic Acids Res.* *16*(14), 6617-35
- ¹⁴² Su, X.-Z., Wu, Y., Sifri, D., Wellems, T.E. (1996) Reduced extension temperatures required for PCR amplification of extremely A+T-rich DNA, *Nucleic Acids Res.* *24*(8), 1574-75
- ¹⁴³ Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *Gene* *96*(1), 23-8
- ¹⁴⁴ 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 kinases, *Curr. Biol.* *9*, 1323-26

- ¹⁴⁵ Schmidt, M.W., Baldrige, K.K., Boatz, J.A., Elbert, S.T., Gordon, M.S., Jensen, J.H., Koseki, S., Matsunaga, N., Nguyen, K.A., Windus, T.L., Dupuis, M., Montgomery, J.A. (1993) General Atomic and Molecular Electronic Structure System, *J. Comput. Chem.* *14*, 1347-63
- ¹⁴⁶ Sharpe, P.T., Knight, G.M., Watts, D.J. (1984) Changes in the DNA content of amoebae *Dictyostelium discoideum* during growth and development, *Biochem. J.* *217*, 839-43
- ¹⁴⁷ Winckler, T., Tschepke, C., de Hostos, E.L., Jendretzke, A., Dingermann, T. (1998) Tdd-3, a tRNA gene-associated poly(A) retrotransposon from *Dictyostelium discoideum*, *Mol. Gen. Genet.* *257*(6), 655-61
- ¹⁴⁸ Beavis, R.C., Fenyö, D. (2000) Database searching with mass-spectrometric information, Review in *Proteomics: A Trends Guide*, July, 22-7
- ¹⁴⁹ Kinter, M., Sherman, N.E. (2000) Protein Sequencing and Identification using Tandem Mass Spectrometry, Wiley Interscience, INC. New York, Kap. 6-9
- ¹⁵⁰ Mann, M., Wilm, M. (1994) Error-Tolerant Identification of Peptides in Sequence Databases by Peptide Sequence Tags, *Anal. Chem.* *66*, 4390-9
- ¹⁵¹ Crawford, M.E., Cusick, M.E., Garrels, J.I. (2000) Databases and knowledge resources for proteomic research, Review in *Proteomics: A Trends Guide*, July, 17-21
- ¹⁵² Altschul, S.F., Lipman, D.J. (1990) Protein database searches for multiple alignments, *PNAS* *87*, 5509-13
- ¹⁵³ Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* *25*, 3389-402
- ¹⁵⁴ Pearson, W.R., Lipman, D.J. (1988) Improved Tools for Biological Sequence Comparison, *PNAS* *85*, 2444-8
- ¹⁵⁵ Nico-Farber, K., Harder, W., Ab, G., Veenhuis, M. (1995) Review: Methylotrophic Yeasts as Factories for the Production of Foreign Proteins, *Yeast* *11*, 1331-44
- ¹⁵⁶ Scorer, C.A., Buckholz, R.G., Clare, J.J., Romanos, M.A. (1993) The intracellular Produktion and secretion of HIV-1 Envelope Protein in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*, *Gene* *136*, 111-119
- ¹⁵⁷ Schmitt, M.E., Brown, T.A., Trumpower, B.L. (1990) A Rapid and Simple Method for Preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic Acids Res.* *18*, 3091
- ¹⁵⁸ Berlot, C.H.; Spudich, J.A., Devreotes, P.N. (1985) Chemoattractant-elicited Increases in Myosin-Phosphorylation in *Dictyostelium*, *Cell* *43*, 307-314
- ¹⁵⁹ Griffith, L.M.; Downs, S.M., Spudich, J.A. (1987) Myosin light chain Kinase and Myosin light chain Phosphatase from *Dictyostelium* : Effekts of Reversible Phosphorylation on Myosin Structure and Function, *J. Cell Biology* *104*, 1309-1323
- ¹⁶⁰ Anschutz, A., Um, H.-D., Tao, Y.-P., Klein, C. (1991) Regulation of Protein Phosphorylation in *Dictyostelium discoideum*, *Devel. Gen.* *12*, 14-18
- ¹⁶¹ Clarke, M., Kayman, S.C., Riley, K. (1987) Density dependent induction of discoidin-I synthesis in exponentially growing cells of *Dictyostelium discoideum*, *Differentiation* *34*, 79-87

- ¹⁶² Lydan, M.A., Cotter, D.A., O'Day, D.H. (1994) Stage-Specific Changes In Protein Phosphorylation During Spore Germination In *Dictyostelium*: Role Of Calmodulin, *Biochem. Biophys. Res. 201*(1), 430-5
- ¹⁶³ Rebecchi, M.J., Pentylala, S.N. (2000) Structure, Function, and Control of phosphoinositide-Specific Phospholipase C, *Physiol. Rev. 80*(4), 1291-1335
- ¹⁶⁴ Meier, K., Klein, C. (1988) An unusual proteinkinase phosphorylates the chemotactic receptor of *Dictyostelium discoideum*, *PNAS 85*, 2181-85
- ¹⁶⁵ Gliksman, N.R., Santoyo, G., Novak, K.D., Titus, M.A. (2001) Myosin I Phosphorylation Is Increased by Chemotactic Stimulation, *JBC 276*(7), 5235-9
- ¹⁶⁶ Tan, J.L., Ravid, S., Spudich, J.A. (1992) Control Of Nonmuscle Myosins By Phosphorylation, *Annu. Rev. Biochem. 61*, 721-59
- ¹⁶⁷ Bosgraaf, L., Russcher, H., Smith, J.L., Wessels, D., Soll, D.R., Van Haastert, P.J.M. (2002) A novel cGMP signalling pathway mediating myosin phosphorylation and chemotaxis in *Dictyostelium*, *EMBO J. 21*(17), 4560-70
- ¹⁶⁸ Nalaskowski, M.M., Deschermeier, C., Fanick, W., Mayr, G.W. (2002) The human homologue of yeast ArgRIII protein is an inositol phosphate multikinase with predominantly nuclear localization, *Biochem. J. 366*(2), 549-56
- ¹⁶⁹ Foresman, J.B., Frisch, Æ. (1996) Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods, 2nd ed., Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, 3-11
- ¹⁷⁰ Weiner, S.J., Kollman, P.A., Case, D.A., Singh, U.C., Ghio, C., Alagona, G., Profeta, S.Jr., Weiner, P. (1984) A New Force Field for Molecular Mechanical Simulation of Nucleic Acids and Proteins, *J. Amer. Chem. Soc. 106*, 765
- ¹⁷¹ Dewar, M.J.S., Zoebisch, E.G., Healy, E.F., Stewart, J.J.P. (1985) AM1: A New General Purpose Quantum Mechanical Molecular Model, *J. Am. Chem. Soc. 107*, 3902-3909
- ¹⁷² Stewart, J.J.P. (1989) Optimization of Parameters for Semi-Empirical Methods I-Method, *J. Comp. Chem. 10*, 221
- ¹⁷³ Stewart, J.J.P. (1989) Optimization of Parameters for Semi-Empirical Methods II-Applications, *J. Comp. Chem. 10*, 221
- ¹⁷⁴ Dewar, M.J.S., Thiel, W. (1977) Ground States of Molecules, 38. The MNDO-Method. Approximations and Parameters, *J. Am. Chem. Soc. 99*, 4899-907
- ¹⁷⁵ Costello, A.J.R., Glonek, T., Myers, T.C. (1976) ³¹P Nuclear Magnetic Resonance-pH Titrations of *myo*-Inositol Hexaphosphate, *Carbohydr. Res. 46*, 159-71
- ¹⁷⁶ Emsley, J., Niazi, S. (1981) The Structure Of *myo*-Inositol Hexaphosphate In Solution: ³¹P N.M.R. Investigation, *Phosphorus and Sulfur 10*, 401-8
- ¹⁷⁷ Barrientos, L.G., Murthy, P.P.N. (1996) Conformational studies of *myo*-inositol phosphates, *Carbohydr. Res. 296*, 39-54
- ¹⁷⁸ Felemez, M., Ballereau, S., Schlewer, G., Spiess, B. (2000) Inframolecular protonation process of 6-modified *myo*-inositol 1,4,5-tris(phosphates): substitution effects on the cooperativity between the phosphate groups, *New J. Chem. 24*, 631-8
- ¹⁷⁹ De Stefano, C., Milea, D., Pettignano, A., Sammartano, S. (2003) Specification of phytate ion in aqueous solution. Alkali metal complex formation in different ionic media, *Anal. Bioanal. Chem. 376*(7), 1030-40

¹⁸⁰ Felemez, M., Spiess, B. (2003) ¹H NMR Titrations of Hydroxy Protons in Aqueous Solution as a Method of Investigation of Intramolecular Hydrogen-Bonding in Phosphorylated Compounds: Examples of *myo*-Inositol 2-Phosphate and *myo*-Inositol 1,2,6-Tris(phosphates), *J. Am. Chem. Soc.* *125*, 7768-69

¹⁸¹ Mernissi-Arifi, K., Schmitt, L., Schlewer, G., Spiess, B. (1995) Complete Resolution of the Microscopic Protonation Equilibria of D-*myo*-Inositol 1,2,6-Tris(phosphate) and Related Compounds by ³¹P NMR and Potentiometry, *Anal. Chem.* *67*, 2567-74

¹⁸² Trautwein, C., Ligon, P. (2000/2001) Konformationsanalyse von Diphosphoinositolphosphaten Teil I und II in Kooperativer Informationsverarbeitung an der Universität zu Köln, Bericht für das Jahr 2000, 267-70 und Bericht für das Jahr 2001, 187-90

¹⁸³ Teodorescu, O., Galor, T., Pillardy, J., Elber, R. (2004) Enriching the sequence substitution matrix by structural information, *Proteins, Structure, Function and Genetics* *54*, 41-48

¹⁸⁴ Meller, J., Elber, R. (2001) Linear Programming Optimization and a double Statistical Filter for protein threading protocols, *Proteins, Structure, Function and Genetics*, *45*, 241-261

¹⁸⁵ Tobi, D., Elber, R. (2000) Distance dependent, pair potential for protein folding: Results from linear optimization, *Proteins, Structure Function and Genetics*, *41*, 40-6

¹⁸⁶ Murzin, A.G., Brenner, S.E., Hubbard, T., Chothia, C. (1995) SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures, *J. Mol. Biol.* *247*, 536-540

¹⁸⁷ Andreeva, A., Howorth, D., Brenner, S.E., Hubbard, T.J.P., Chothia, C., Murzin, A.G. (2004). SCOP database in 2004: refinements integrate structure and sequence family data, *Nucl. Acid Res.* *32*, Database Issue, D226-D229