

***myo*-Inositolpentakisphosphat-(3/5)-Kinase in  
*Dictyostelium discoideum***

---

Sequenzierung, Generierung von Mutanten und mögliche  
physiologische Funktionen

Dem Fachbereich Mathematik und Naturwissenschaften  
der Bergischen Universität Wuppertal  
zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegte Dissertation

von

Anne-Brigitte Mbonjo

Wuppertal, November 2007

Diese Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20070909

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20070909>]

## ZUSAMMENFASSUNG

---

Die Inositolpentakisphosphat-(3/5)-Kinase (InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase) katalysiert die Umsetzung von Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> und Ins(1,2,3,4,6)P<sub>5</sub> in Inositolhexakisphosphat (InsP<sub>6</sub>). Die physiologische Bedeutung dieser energieverbrauchenden Reaktion sowie die des in den *Dictyostelium discoideum*-Zellen am häufigsten vorkommenden Inositolphosphates InsP<sub>6</sub> ist weitgehend unbekannt. In anderen Organismen wird InsP<sub>6</sub> mit verschiedenen zellulären Prozessen, wie z.B. der Endozytose und dem mRNA-Export aus dem Zellkern in Verbindung gebracht. Des Weiteren gibt es Hinweise, dass InsP<sub>6</sub> in die Steuerung apoptotischer Prozesse und die Regulation der Zellproliferation involviert ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde die InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase in *D. discoideum* bis zur Homogenität gereinigt. Nach der *de novo* Sequenzierung mittels ESI-MS/MS wurde das kodierende Gen durch Sequenzvergleiche identifiziert. Das Enzym zeigt Ähnlichkeiten zu bekannten Inositolphosphatkinasen der PDKG-Familie.

Um Kenntnisse über die Regulation und Funktion von InsP<sub>6</sub> in *D. discoideum* zu erhalten, wurden InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase Mutanten über Antisense-Mutagenese generiert.

Im Gegensatz zum Wildtyp wachsen die Mutanten nur in Medien mit einem Zusatz an InsP<sub>6</sub>, allerdings mit einer geringeren Wachstumsrate im Vergleich zum Wildtyp. In Abwesenheit von InsP<sub>6</sub> verlieren die Mutanten kontinuierlich ihre Adhäsivität auf hydrophilen Polystyrol-Oberflächen, runden sich ab und stellen das Wachstum ein. Die Untersuchung ihres Metabolit-Spektrums zeigte entgegen den Erwartungen keine Veränderung der intrazellulären InsP<sub>6</sub>-Konzentration beim InsP<sub>6</sub>-Entzug. Dagegen wurde eine Abnahme der intrazellulären Konzentrationen der aus der InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase-Rückreaktion stammenden InsP<sub>5</sub>-Isomere beobachtet. Die InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase ist vermutlich an der für das Wachstum offensichtlich essentiellen Aufrechterhaltung der Konzentrationen von InsP<sub>5</sub> und InsP<sub>6</sub> in *D. discoideum* beteiligt.

Beim InsP<sub>6</sub>-Zusatz zum Medium treten die zuvor erwähnten phänotypischen Veränderungen und Auswirkungen auf das Metabolitspektrum der Mutanten nicht in Erscheinung.

## ABSTRACT

---

The inositol pentakisphosphat (3/5)-kinase (InsP<sub>5</sub> 3/5-kinase) catalyzes the phosphorylation of Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> and Ins(1,2,3,4,6)P<sub>5</sub> to InsP<sub>6</sub> in *Dictyostelium discoideum* cells. The physiological significance of this ATP-dependent reaction as well as that of the InsP<sub>6</sub> is unknown in *D. discoideum*. InsP<sub>6</sub> is present in large amounts during the development of *D. discoideum*. InsP<sub>6</sub> is implicated in other organisms in a multitude of essential cellular processes such as endocytosis, nuclear mRNA export and cell proliferation. Further InsP<sub>6</sub> may also influence apoptosis.

In the present thesis InsP<sub>5</sub> 3/5-kinase was purified to homogeneity. The *de novo* sequencing of this protein by ESI-MS/MS followed by sequence similarity screening of bioinformatics databases allowed the identification of the coding gene. The enzyme presents the strictly conserved signature motives of the PDKG family.

The cellular function of InsP<sub>6</sub> in *D. discoideum* was examined. The used approach was to generate mutants of InsP<sub>5</sub> 3/5-kinase by antisense mutagenesis.

The mutants grow only in media supplemented with InsP<sub>6</sub>, however the growth rate is lower compared to that of the wild type. Without InsP<sub>6</sub> the mutants loss continuously their ability to adhere to hydrophilic polystyrene surfaces, round themselves and stop their growth. Contrary to the expectations, InsP<sub>6</sub> withdrawal not altered cellular InsP<sub>6</sub> levels in the mutants. In contrast, the decrease of cellular levels of Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> and Ins(1,2,3,4,6)P<sub>5</sub> was observed. InsP<sub>5</sub> 3/5-kinase may be involved in the regulation of InsP<sub>5</sub> and InsP<sub>6</sub> levels in *D. discoideum*.

The mentioned phenotypical changes of the mutants and the effects on their metabolite spectrum do not occur in presence of InsP<sub>6</sub>.

## DANKSAGUNG

---

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Günther Vogel für die Aufgabenstellung und sein Engagement bei der Betreuung dieser Arbeit.

Fr. AOR Dr. Helga Mölleken danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Meinen Kollegen des Arbeitskreises Biochemie Dr. Stefan Adelt, Dr. Guido Dallmann, Dr. Andreas Fischbach, Dr. Alexander Müller und Dr. Christine Trautwein danke ich für das hervorragende Arbeitsklima, die zahlreichen anregenden Diskussionen und die vielen guten Ratschläge.

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

Meiner Familie und ganz besonders meinem Mann Hervé und meiner Tochter Olivia Cherelle gilt mein Dank für die ständige Unterstützung und Geduld während meiner Promotion.

---

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>vii</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>ix</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>x</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Struktur und Nomenklatur von Inositol und 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 Inositolphosphate (InsP <sub>x</sub> ) . . . . .	6
1.3.2 Pyrophosphorylierte Inositolphosphate (PP-InsP <sub>x</sub> ) . . . . .	10
1.4 Übersicht des Inositolphosphatstoffwechsels in <i>Dictyostelium discoideum</i> . . . . .	12
1.5 Funktionen von Inositolhexakisphosphat . . . . .	13
1.6 Inositolphosphatkinasen . . . . .	16
1.7 Methoden zur Generierung von Mutanten . . . . .	19
1.8 Das <i>Dictyostelium discoideum</i> Genom . . . . .	21
1.9 Aufgabenstellung . . . . .	23
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>26</b>
2.1 Material . . . . .	26
2.1.1 Kits . . . . .	26
2.1.2 Enzyme . . . . .	27
2.1.3 Antibiotika . . . . .	27
2.1.4 Proteingrößen- und DNA-Längenstandard . . . . .	27
2.1.5 Reagenzien . . . . .	28
2.1.6 Vektoren . . . . .	29

## INHALTSVERZEICHNIS

---

2.1.7	Verwendete Oligonukleotide . . . . .	29
2.2	Zellbiologische Methoden . . . . .	30
2.2.1	Kultivierung von <i>D. discoideum</i> . . . . .	30
2.2.1.1	Anzucht von <i>D. discoideum</i> in Flüssigkeitsmedium . . . . .	30
2.2.1.2	Anzucht auf Agarplatten . . . . .	32
2.2.1.3	Anzucht in submersen Standkulturen . . . . .	33
2.2.1.4	Gewinnung und Konservierung von <i>D. discoideum</i> - Sporen . . . . .	33
2.2.1.5	Bestimmung der Zelldichte und der Größenverteilung . . . . .	34
2.2.2	Transformation von <i>D. discoideum</i> . . . . .	34
2.2.3	Messung der Phagozytoserate . . . . .	35
2.2.4	Messung der Pinozytoserate . . . . .	36
2.2.5	Adhäsionstest . . . . .	36
2.3	Proteinchemische Methoden . . . . .	37
2.3.1	Anreicherung der Inositolpentakisphosphat-(3/5)-Kinase . . . . .	37
2.3.1.1	Bestimmung der Inositolpentakisphosphat-(3/5)-Kinase- Aktivität . . . . .	37
2.3.1.2	Chromatographie an Q-Sepharose fast flow . . . . .	37
2.3.1.3	Chromatographie an Heparin-Agarose . . . . .	38
2.3.1.4	Chromatographie an Hydroxylapatit . . . . .	38
2.3.1.5	Gelfiltration an HPLC-Superdex-200 HR . . . . .	39
2.3.1.6	SDS- und Nativgelelektrophorese . . . . .	39
2.3.2	Proteinbestimmung . . . . .	40
2.3.3	Proteinfärbung . . . . .	41
2.4	Sequenzierung der Inositolpentakisphosphat- (3/5)-Kinase . . . . .	42
2.5	Isolierung und Analytik von Inositolphosphaten . . . . .	44
2.5.1	Isolierung von Inositolphosphaten . . . . .	44
2.5.2	HPLC-MDD-Analytik von Inositolphosphaten . . . . .	45
2.6	Bestimmung des intrazellulären <i>myo</i> -Inositolgehalts . . . . .	48
2.7	Molekularbiologische Methoden . . . . .	49
2.7.1	Isolierung von chromosomaler und Plasmid-DNA . . . . .	49
2.7.2	Polymerase-Kettenreaktion . . . . .	49
2.7.3	Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen . . . . .	50
2.7.4	Agarose-Elektrophorese von DNA . . . . .	51
2.7.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen . . . . .	51
2.7.6	Reinigung und Konzentrierung von DNA . . . . .	52
2.7.7	Enzymatische Modifizierung von DNA . . . . .	52
2.7.7.1	Phosphatase Behandlung . . . . .	52
2.7.7.2	Überführung überstehender Enden in glatte Enden . . . . .	52
2.7.8	DNA-Ligation . . . . .	53
2.7.9	Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen . . . . .	54

<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>56</b>
3.1	Aufreinigung der Inositolpentakisphosphat-(3/5)-Kinase . . . . .	56
3.1.1	Gelfiltrations-Chromatographie . . . . .	57
3.1.2	Identifizierung der InsP <sub>5</sub> -(3/5)-Kinase-Proteinbande . . . . .	59
3.2	Sequenzierung der InsP <sub>5</sub> -(3/5)-Kinase mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) . . . . .	63
3.2.1	ESI-MS und ESI-MS/MS-Analyse der InsP <sub>5</sub> -(3/5)-Kinase . . . . .	64
3.2.2	Vergleich der InsP <sub>5</sub> -(3/5)-Kinase mit bekannten Vertretern der Inositolphosphatkinase-Superfamilie . . . . .	69
3.3	Identifizierung von Proteinen, die parallel mit der InsP <sub>5</sub> -(3/5)-Kinase angereichert werden . . . . .	71
3.4	Amplifikation des InsP <sub>5</sub> -(3/5)-Kinase-Gens mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) . . . . .	76
3.5	Gezielte Mutagenese des InsP <sub>5</sub> -(3/5)-Kinase-Gens . . . . .	81
3.5.1	Versuche zur Erzeugung von Knockout-Mutanten durch homologe Rekombination . . . . .	81
3.5.2	Antisense-Mutagenese des InsP <sub>5</sub> -(3/5)-Kinase-Gens . . . . .	85
3.5.2.1	Konstruktion des Antisense-Vektors und Transformation von <i>D. discoideum</i> Zellen . . . . .	85
3.5.2.2	Vergleich der InsP <sub>5</sub> -(3/5)-Kinase-Aktivität von Wildtypzellen und <i>DdIP3/5K</i> -Mutanten . . . . .	88
3.6	Phänotypische Charakterisierung der <i>DdIP3/5K1</i> -Mutante . . . . .	89
3.6.1	Axenisches Wachstum und Differenzierung . . . . .	89
3.6.2	Überlebensfähigkeit nach Inositolhexakisphosphat-Entzug . . . . .	91
3.6.3	Endozytotische Eigenschaften . . . . .	93
3.6.3.1	Phagozytose . . . . .	93
3.6.3.2	Pinozytose . . . . .	95
3.6.4	Inositolmetabolite . . . . .	97
3.6.4.1	Inositolphosphate . . . . .	97
3.6.4.2	Inositolhexakisphosphat und Diphosphoinositolphosphate . . . . .	99
3.6.4.3	<i>myo</i> -Inositol . . . . .	102
<b>4</b>	<b>Fazit und Ausblick</b>	<b>105</b>



---

## Abbildungsverzeichnis

---

1.1	Drei Darstellungen des <i>myo</i> -Inositols . . . . .	2
1.2	Der Lebenszyklus von <i>Dictyostelium discoideum</i> . . . . .	4
1.3	Modell des Inositolphosphat-Stoffwechsels in <i>D. discoideum</i> . . . . .	13
1.4	Schematische Darstellung der Inositolphosphatkinasen-Familie . . . . .	17
1.5	Standardmodell für den Antisense silencing Mechanismus . . . . .	20
2.1	Schematischer Aufbau der HPLC-MDD-Anlage . . . . .	47
3.1	katalysierte Reaktion der Inositolpentakisphosphat-(3/5)-Kinase . . . . .	56
3.2	Elutionsprofil einer repräsentativen Gelfiltration . . . . .	58
3.3	SDS-PAGE (12 %, Silber-Färbung) . . . . .	59
3.4	native Gelelektrophorese . . . . .	61
3.5	SDS-PAGE nach der nativen Gelelektrophorese . . . . .	62
3.6	SDS-PAGE für die ESI/MS-Analyse . . . . .	64
3.7	Nukleotid- und Aminosäuresequenz der $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase . . . . .	68
3.8	Lokales Alignment der katalytisch wichtigen Domäne von drei Vertre- tern der Inositolphosphatkinasen-Superfamilie . . . . .	70
3.9	Die durch die Adenylosuccinat-Synthetase katalysierte Reaktion . . . . .	72
3.10	Primärstruktur der Adenylosuccinat-Synthetase . . . . .	73
3.11	Primärstruktur des eukaryontischen Translationsinitiationsfaktors 3 . . . . .	74
3.12	Primärstruktur eines mit der $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase aufgereinigten Prote- ins aus <i>Dictyostelium</i> . . . . .	75
3.13	Amplifikation des $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase-Gens mit der Hot-Start-PCR . . . . .	77
3.14	Analyse der Klonierung des PCR-Produkts in pUC18 . . . . .	78
3.15	Vergleich des sequenzierten PCR- Fragments mit dem $\text{InsP}_5$ -(3/5)- Kinase-Gen . . . . .	80
3.16	Schematische Darstellung der Vektorkonstruktion für die homologe Rekombination . . . . .	83

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

3.17	Restriktionsanalyse zur Isolierung des <i>bsr</i> -Gens . . . . .	84
3.18	Schematische Darstellung der Vektorkonstruktion für die Antisense-Mutagenese . . . . .	86
3.19	Restriktionsanalyse des Transformationsvektors für die Antisense-Mutagenese . . . . .	87
3.20	Vergleich der $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase-Aktivität im Zytosol des Wildtyps und der mit $\text{InsP}_6$ (0,6 mM) gewachsenen <i>DdIP3/5K</i> -Mutanten . . . . .	88
3.21	Wachstumsvergleich von Wildtyp und <i>DdIP3/5K1</i> ohne $\text{InsP}_6$ und mit 0,6 mM $\text{InsP}_6$ . . . . .	89
3.22	Überlebensrate von <i>DdIP3/5K1</i> nach $\text{InsP}_6$ -Entzug Zu bestimmten Zeitpunkten wurde eine definierte Zellzahl auf SM-Agarplatten in Gegenwart von <i>E.coli</i> B/r ausgestrichen und die entstehenden Plaques gezählt . . . . .	91
3.23	Vergleich der Phagozytose von carboxylierten Latexpartikeln bei AX-2 und der <i>DdIP3/5K1</i> Mutante Zellen des Wildtyps und der <i>DdIP3/5K1</i> Mutante . . . . .	94
3.24	Vergleich des Pinozytoseverhaltens des Wildtyps und der <i>DdIP3/5K1</i> Mutante . . . . .	96
3.25	HPLC-MDD Analyse (saures System) von extrahierten Inositolphosphat-Metaboliten aus <i>DdIP3/5K1</i> . . . . .	98
3.26	$\text{InsP}_6^-$ , $\text{InsP}_7^-$ und $\text{InsP}_8^-$ -Konzentration von Wildtypzellen und <i>DdIP3/5K1</i> Mutante . . . . .	101
3.27	Intrazelluläre <i>myo</i> -Inositolkonzentration von Wildtyp und <i>DdIP3/5K1</i> Mutante . . . . .	103

---

## Tabellenverzeichnis

---

1.1	Vergleich des <i>D. discoideum</i> - und menschlichen Genoms . . . . .	23
2.1	Verwendete Vektoren . . . . .	29
2.2	Verwendete Oligonukleotide . . . . .	29
2.3	Zusammensetzung des semi-synthetischen axenischen Mediums (HL5-Medium) . . . . .	31
2.4	Zusammensetzung des synthetischen-FM-Mediums . . . . .	31
2.5	Stocklösungen für das synthetische FM-Medium . . . . .	32
2.6	Zusammensetzung der Agarplatten . . . . .	33
2.7	Zusammensetzung der Probenpuffer . . . . .	40
2.8	Zusammensetzung der Coomassie-Färbelösung . . . . .	41
2.9	Zusammensetzung der Coomassie-Entfärbelösungen . . . . .	41
2.10	Silberfärbungsprotokoll . . . . .	42
2.11	Zusammensetzung der Lösungen für die Silberfärbung . . . . .	42
2.12	Protokoll zur Elution der Peptide nach dem tryptischen Verdau . . . . .	43
2.13	Geräte der HPLC-Anlage . . . . .	48
2.14	Elutionslösungen für die Analyse von Inositolphosphaten . . . . .	48
2.15	PCR-Programm . . . . .	50
2.16	Zusammensetzung des DNA-Lauf- und des 6xDNA-Auftragungspuffers . . . . .	51
2.17	Zusammensetzung des SOC-Mediums . . . . .	54
2.18	Zusammensetzung der Medien für die Kultur von Bakterien-Stämmen . . . . .	55
3.1	Anreicherungstabelle, Zusammenfassung der partiellen Aufreinigung der InsP <sub>5</sub> -(3/5)-Kinase . . . . .	59
3.2	Ermittelte Aminosäuresequenzen aus der ESI-MS/MS-Analyse der InsP <sub>5</sub> -(3/5)-Kinase . . . . .	66
3.3	Ergebnis der Datenbankrecherchen für die InsP <sub>5</sub> -(3/5)-Kinase . . . . .	67
3.4	Parameter der Phagozytose von carboxylierten Latexpartikeln . . . . .	94

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

A/T	Adenin/Thymin
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-Trisphosphat
$C_i$	intrazelluläre Konzentration
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dNTP	2-desoxyribonukleotid 5'-phosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
ESI	Elektrospray-Ionisation
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G418	Geneticin
GTP	Guanosin 5'-Triphosphat
GDP	Guanosin 5'-diphosphat
g	Gramm; Erdbeschleunigung
h	Stunde
Hepes	N-2 Hydroxyethylpiperazin- N'-2- ethanolsulfonsäure

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

HPLC	<u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography (Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie)
IPK	Inositolphosphatkinase
InsP <sub>6</sub>	<i>myo</i> -Inositolhexakisphosphat
Ins	<i>myo</i> -Inositol
InsP <sub>7</sub>	D-6-Diphospho- <i>myo</i> -Inositol(1,2,3,4,5)pentakisphosphat
InsP <sub>8</sub>	D-5,6-Bis-Diphospho- <i>myo</i> -Inositol(1,2,3,4)tetrakisphosphat
InsP <sub>x</sub>	<i>myo</i> -Inositolphosphat (x-fach phosphoryliert)
kDa	Kilodalton
kb	Kilobasen
MDD	<u>M</u> etal- <u>D</u> ye- <u>D</u> etection (Metall-Indikator-Detektion)
min	Minute
M	Molar
Mb	Megabasen
mRNA	Boten-Ribonucleinsäure
MS	Massenspektrometrie
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAR	4-(2-pyridylazo)-Resorcinol
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PLC	Phospholipase C
PtdInsP <sub>x</sub>	Phosphatidyl- <i>myo</i> -Inositolphosphat (x-fach phosphoryliert)
rDNA	ribosomale DNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
Tris	<i>tris</i> -(Hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer Ribonucleinsäure
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	volume per volume (Volumen bezogen auf das Gesamtvolumen)
w/v	weight per volume (Masse bezogen auf das Gesamtvolumen)
w/w	weight per weight (Masse bezogen auf die Gesamtmasse)

# KAPITEL 1

---

## Einleitung

---

### 1.1 Struktur und Nomenklatur von Inositol und Inositolphosphaten

Inositole sind Cyclohexanhexole der allgemeinen Summenformel  $C_6H_{12}O_6$  und gehören zur Gruppe der Cyclitole [1]. Aufgrund der individuellen Anordnung der Hydroxylgruppen lassen sich insgesamt neun verschiedene Stereoisomere aus dem Grundgerüst ableiten, von denen zwei ein Enantiomerenpaar (D-chiro-Inositol und L-chiro-Inositol) bilden. Die sieben anderen Stereoisomere (*cis*-, *epi*-, *allo*-, *myo*-, *muco*-, *neo*- und *scyllo*-) sind optisch inaktive meso-Formen. *myo*-Inositol (Abk.: „Ins“) ist das am häufigsten natürlich vorkommende Inositol und tritt sowohl in freier wie auch in gebundener Form im Gewebe beinahe aller lebenden Spezies auf. Inositol kann an seinen sechs Hydroxylgruppen durch Inositolphosphatkinasen phosphoryliert werden. Die gebildeten *myo*-Inositol(poly)phosphate auch einfach Inositol(poly)phosphate ( $Ins(a,b,\dots)P_x$  mit  $a,b,\dots$  = phosphorylierte Position(en) und  $x$  = Anzahl der Phos-

phatgruppen) genannt, stellen neben den Phosphoinositiden die biologisch relevanten *myo*-Inositolderivate dar. In dieser Arbeit stehen die Inositol(poly)phosphate im Mittelpunkt. Der unterschiedliche Phosphorylierungsgrad und die verschiedenen möglichen Stellungen der Phosphatgruppen am *myo*-Inositolring führen zu 63 verschiedenen Inositolphosphaten. Um diese eindeutig zu bezeichnen, werden die Isomere nach der IUPAC-Nomenklatur [2] benannt. Zur Vereinfachung der Inositolphosphatbezeichnung kann bei der Durchnummerierung der Phosphatgruppen die Agranoff Schildkröte (Abb.1.1a, [3]), die das *myo*-Inositol in der Sesselkonformation darstellt, verwendet werden. Das rechte Vorderbein der Schildkröte markiert die D-1-Position. Von hier aus erfolgt die Nummerierung nach der inzwischen allgemein verwendeten D-Nomenklatur gegen den Uhrzeigersinn, so dass der Kopf der Schildkröte der D-2-Position entspricht. Bei der thermodynamisch stabileren *myo*-Inositol Sesselkonformation (Abb. 1.1 b) steht die Hydroxylgruppe an Position 2 axial und die verbleibenden fünf Hydroxylgruppen äquatorial. Das Molekül besitzt eine Spiegelebene, die durch die Kohlenstoffatome 2 und 5 verläuft (Abb. 1.1 c).

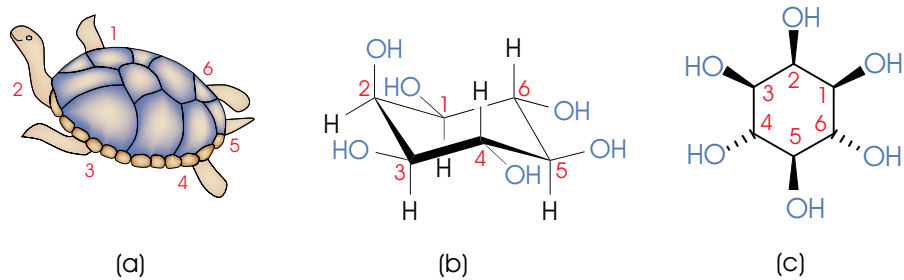


Abbildung 1.1: Drei Darstellungen des *myo*-Inositols:

- (a) zeigt die Agranoff Schildkröte. Das rechte Vorderbein markiert die D-1-Position in der Sesselkonformation, von dort aus wird gegen den Uhrzeigersinn nummeriert [3].
- (b) Sesselkonformation des *myo*-Inositols
- (c) planare Darstellung des *myo*-Inositols.

## 1.2 *Dictyostelium discoideum* als Modellorganismus

Die erste entdeckte Art der Dictyosteliden wurde 1869 von Brefeld als *Dictyostelium mucoroides* beschrieben [4]. *Dictyostelium discoideum* (*D. discoideum*) ist ein amöboid lebender Protist, der 1933 im Waldboden in North Carolina von Rapper entdeckt und aufgrund seiner Morphologie den zellulären Schleimpilzen (Acrasiomyceten) zugeordnet wurde [5]. Der Lebenszyklus des eukaryontischen Mikroorganismus gliedert sich in vegetative und Differenzierungsphase (Abbildung 1.2). In der vegetativen Phase ernähren sich die einzelligen, haploiden Amöben von Bodenbakterien, die von ihnen phagozytiert werden [6]. Wenn ihre Nahrungsquelle jedoch erschöpft ist, stellen die Amöben die einfache mitotische Zellteilung ein und die Differenzierung wird eingeleitet. Die Differenzierungsphase ist durch morphologische Veränderungen und unterschiedliche Genexpression gekennzeichnet. Dabei geben die Amöben die einzellige Lebensweise zugunsten eines vielzelligen Organismus auf. Als Reaktion auf Nahrungsmangel beginnen einige Amöben, pulsartig zyklisches AMP (cAMP) zu produzieren und auszuschleiden. Diese Verbindung wirkt als chemotaktisches Signal, das andere Amöben anzieht, die ebenfalls cAMP produzieren und ausscheiden. Die Zellen, die als erste cAMP abgeben, werden zu so genannten Aggregationszentren, aus denen regelmäßige cAMP-„Wellen“ ausgehen, die eine Bewegung der Zellen zum Zentrum veranlassen. Es werden zunächst Aggregate aus bis zu  $10^5$  Zellen gebildet. Im Anschluss kommt es zur Ausbildung eines von einer Schleimhülle umgebenen Pseudoplasmodiums, welches die Form einer kleinen Nacktschnecke (Slug) aufweist. Bereits im Pseudoplasmodium beginnt die Differenzierung in zwei unterschiedliche Zelltypen, Prästielzellen und Präsporezellen. Die Prästielzellen sind im Vorderbereich lokalisiert und machen ungefähr 20 % der gesamten Zellpopulation dieser Struktur aus. Das Pseudoplasmodium ist in der Lage eine Migrationsphase zu durchlaufen und phototaktisch bzw. thermotaktisch einen günstigen Standort für die Kulmination, bei der es sich senkrecht aufrichtet, zu erreichen. Diese Fortbewegung wird durch die Schleimhülle erleichtert. Im Laufe der Kulmination, die etwa 16 bis 19 h nach Beginn der Aggregati-



## KAPITEL 1. EINLEITUNG

on eintritt, wandern die Prästielzellen durch die Präsporenmass zur Fußplatte und bilden den Stiel aus, während die Präsporenmass nach oben wandern und schrumpfen. Nach etwa 24 h endet der Differenzierungsvorgang mit der Entstehung des Fruchtkörpers. Dieser besteht aus abgestorbenen, stark vakuolisierten Stielzellen und der Dauerform, den Sporenmass. Beide Zelltypen besitzen eine Zellulose-enthaltende Zellwand, wobei bei den Sporenmass zusätzlich Glykoproteine eingelagert sind. Sporenmass sind in der Lage extreme Umweltbedingungen zu überdauern. Unter günstigen Bedingungen, vor allem bei ausreichendem Nahrungsangebot, keimen die Sporenmass aus und es entstehen wieder frei lebende Amöben.

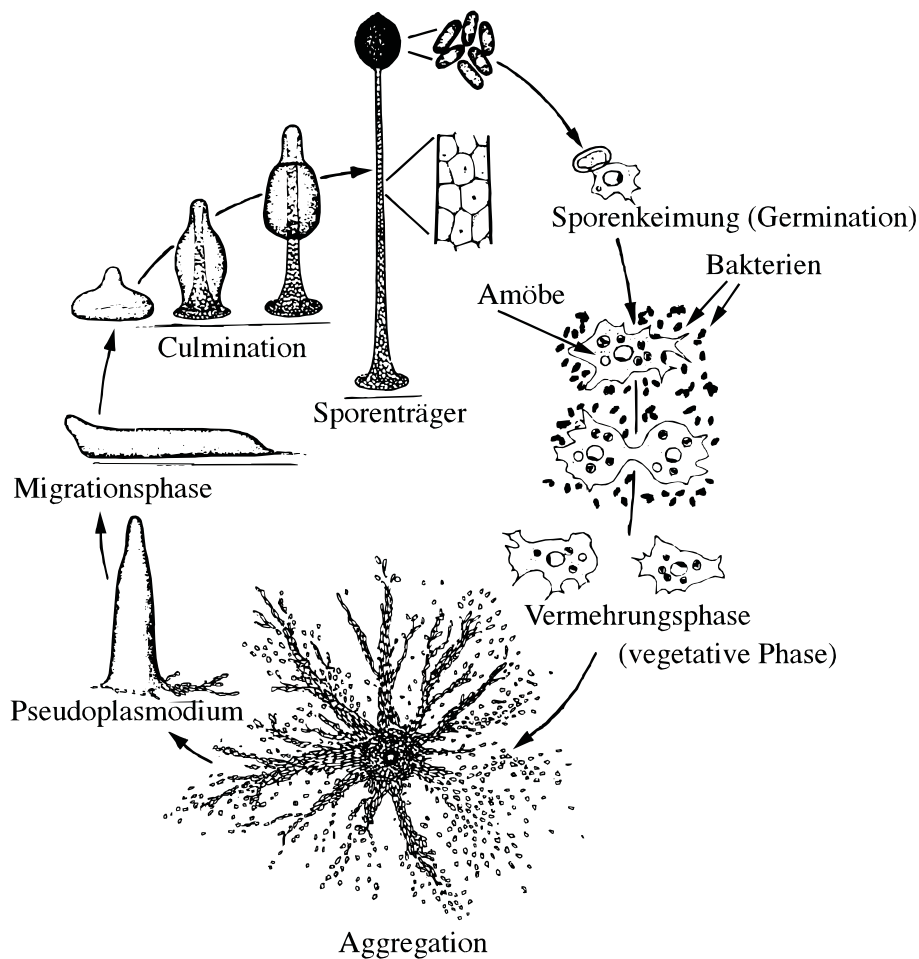


Abbildung 1.2: Der Lebenszyklus von *Dictyostelium discoideum*

Aufgrund seiner „artspezifischen Eigenschaften“ ist *D. discoideum* ein geeigneter Or-

ganismus zur Erforschung grundlegender zellulärer Prozesse, wie z.B. Genregulation, Signaltransduktion, Zelldifferenzierung, Chemotaxis, Phagozytose, Zytokinese und Zellmotilität. Viele dieser Prozesse ähneln denen in Säugetierzellen. Dies war mit ein Grund dafür, dass *D. discoideum* 2002 vom National Institutes of Health (NIH) in die Liste der Modellorganismen für die biomedizinische Forschung aufgenommen wurde. Der in dieser Arbeit verwendete Stamm AX-2 wurde von Watts und Ashworth [7] aus dem Stamm AX-1 gewonnen, der im Gegensatz zum Wildtyp NC-4 infolge zweier unabhängigen Mutationen in der Lage ist in axenischen Nährmedien zu wachsen [8]. Diese Laborstämme besitzen weiterhin die Fähigkeit, sich durch Phagozytose von Bakterien zu ernähren. So können vegetative Amöben des Stammes AX-2 auf bakterienbewachsenen Agarplatten, in Bakteriensuspension und in halbsynthetischen oder vollsynthetischen flüssigen Nährmedien (axenischen Nährmedien) kultiviert werden. Die Verdopplungszeit liegt bei 3-4 h für das Wachstum auf Bakterien und 8-12 h für das in Flüssigmedien. Angesichts seiner Eigenschaften wurde die Taxonomie von *D. discoideum* eine zeitlang diskutiert. Rapper ordnete *D. discoideum* aufgrund der Gesamtmorphologie in das Reich der Pilze, in die Abteilung Myxomyceten und in die Klasse Acrasiomyceten (zelluläre Schleimpilze). Die Bezeichnung Schleimpilz ist für *D. discoideum* jedoch irreführend, da er weder den eigentlichen, plasmodischen Schleimpilzen noch den echten Pilzen zugeordnet werden kann. *D. discoideum* unterscheidet sich von den echten Pilzen durch das Fehlen von Hyphen. Weiterhin lebt er im Gegensatz zu den echten Schleimpilzen nicht saprophytisch und bildet kein Plasmodium. Phylogenetische Untersuchungen zur Folge wird die Gruppe der Dictyostelea zusammen mit der Gruppe der Myxogastrea (plasmodische Schleimpilze) und der Proto-stelea den Mycetozoa (Schleimpilzen) eingeordnet [9]. Aufgrund der Sequenzanalyse verschiedener Proteine werden die Schleimpilze als eine zu den Pilzen und Metazoen (Vielzellern) benachbarte Klasse im Reich der eukaryontischen Lebewesen eingeordnet [9]. Mit der Entschlüsselung des Genoms von *D. discoideum* konnten mittlerweile über 5000 Proteinsequenzen von *D. discoideum* mit denen anderer Organismen verglichen werden. Demnach sind viele Proteine aus *D. discoideum* den entsprechenden

orthologen humanen Proteinen ähnlicher, als die orthologen Proteine aus *Saccharomyces cerevisiae* (Hefe) sind [10]. *D. discoideum* scheint also enger mit den Metazoen als mit den Pilzen und Pflanzen verwandt zu sein.

### 1.3 Inositolphosphate in *Dictyostelium discoideum* und anderen Organismen

*D. discoideum* besitzt einen sehr komplexen Inositolphosphat-Stoffwechsel, der in vielen Gesichtspunkten dem von Säugetieren ähnelt. Dieser wird durch eine Reihe von Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungs-Kaskaden, die zur Bildung von verschiedenen Inositolphosphat-Isomeren führen, beeinflusst. Etwa 25 *myo*-Inositolphosphate mit unterschiedlichen Substitutionsgraden sind in axenisch kultivierten Amöben nachgewiesen worden [11]. Das Inositolhexakisphosphat und die Diphosphoinositolphosphate (InsP<sub>7</sub> und InsP<sub>8</sub>) heben sich dabei durch ihre relativ hohen Konzentrationen von den Inositolphosphaten mit einer geringeren Zahl an Phosphatgruppen ab. Dieser Abschnitt gibt einen Überblick über die verschiedenen Inositolphosphat-Isomere in *D. discoideum*. Des Weiteren werden bekannte physiologische Funktionen von Inositolphosphaten in anderen eukaryontischen Organismen beschrieben.

#### 1.3.1 Inositolphosphate (InsP<sub>x</sub>)

Die **Inositolmonophosphate** Ins(1)P, Ins(3)P und Ins(4)P wurden in Zellextrakten von *D. discoideum* identifiziert. Bislang konnte diesen keine physiologische Funktion nachgewiesen werden. Während Ins(1)P und Ins(4)P Abbauprodukte darstellen, wird das Ins(3)P bei der *de novo* Synthese von *myo*-Inositol gebildet. *D. discoideum* kann auf synthetischen Medien wachsen, die kein *myo*-Inositol enthalten [12]. Die Zellen sind also in der Lage, diese für den Inositolphosphat-Stoffwechsel grundlegende Verbindung zu synthetisieren. Die Ausgangsverbindung ist das D-Glucose-6-Phosphat. Dieses wird unter katalytischer Wirkung der *myo*-Inositol-3-Phosphat-Syn-

thase (MIPS) zu Ins(3)P umgesetzt. Wie in anderen Organismen, kann das entstandene Ins(3)P durch eine Monophosphatase zu freiem Inositol umgesetzt werden [13]. Aus *D. discoideum* wurde die MIPS, ein zytosolisches Protein, bereits isoliert und charakterisiert [14]. Die Deletion des MIPS-Gens führte bei den resultierenden inositol-auxotrophen Mutanten u.a. zum Wachstumsdefekt auf Bakterien. Die Merkmale dieser Mutante belegen, dass *myo*-Inositol und dessen Derivate eine zentrale Rolle bei verschiedenen physiologischen Prozessen in *D. discoideum* spielen.

Bei den **Inositolbisphosphat**-Isomeren sind Ins(3,6)P<sub>2</sub>, Ins(1,4)P<sub>2</sub> und Ins(4,5)P<sub>2</sub> beschrieben worden. Die Inkubation von zytosolischen Zellextrakten mit *myo*-Inositol und ATP führt zur Entstehung von InsP<sub>6</sub>, wobei Ins(3,6)P<sub>2</sub> als Zwischenprodukt gebildet wird. Die Einstiegsreaktion wird durch die *myo*-Inositol 3-Hydroxykinase katalysiert. Ins(1,4)P<sub>2</sub> und Ins(4,5)P<sub>2</sub> entstehen bei dem Abbau von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> durch eine 1- bzw. 5-Phosphatase [15]. Das Ins(1,4)P<sub>2</sub> ist in der Lage, eine wenig affine Form der DNA-Polymerase  $\alpha$  zu aktivieren und ist somit möglicherweise in einigen Zelllinien an der DNA-Replikation beteiligt [16].

In *D. discoideum* entsteht das **Inositoltrisphosphat** Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> aus der, durch die Phospholipase C, katalysierten hydrolytischen Spaltung von Phosphatidylinositol -4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>). Durch Bindung von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> an InsP<sub>3</sub>-Rezeptoren des ER kommt es zur Mobilisierung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus intrazellulären Speichern, die eine Vielzahl von Stoffwechselreaktionen regulieren. Die Phospholipase C abhängige Bildung des Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> stellt nicht den einzigen Syntheseweg dieses Signalmoleküls dar. Van Dijken et al. beschrieben 1995 [17] die Phospholipase C unabhängige *de novo* Synthese von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> in *D. discoideum*. Dies entsteht bei der Dephosphorylierung von Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> durch eine Ca<sup>2+</sup>-abhängige 3/6-Bisphosphatase. Zur Inaktivierung wird Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> entweder durch eine 5- bzw. 1-Phosphatase zu Ins(1,4)P<sub>2</sub> bzw. Ins(4,5)P<sub>2</sub> dephosphoryliert [18] oder durch die Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase zu Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> phosphoryliert [19]. Dieser Schritt wurde allerdings bislang nur im Zellkern von *D. discoideum* nachgewiesen [20]. Es bleibt unklar, ob das umgesetzte Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> aus dem Cytosol stammt oder im Zellkern gebildet wurde.

Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> wurde erstmals als sekundärer Botenstoff in der Signaltransduktion beschrieben [21]. Inzwischen wird vermutet, dass dieses ebenfalls bei der Transkription, Translation und Zellmigration eine Rolle spielt [22]. Die am intensivsten untersuchte Funktion von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> ist jedoch die intrazelluläre Mobilisierung von Calcium.

Das Ins(3,4,6)P<sub>3</sub> wurde als Zwischenprodukt der InsP<sub>6</sub>-Biosynthese in *D. discoideum* [23] beschrieben. Ins(1,2,3)P<sub>3</sub>, Ins(1,2,4)P<sub>3</sub> und Ins(1,2,6)P<sub>3</sub> entstehen *in vitro* bei dem Abbau von InsP<sub>6</sub> unter Einwirkung einer membranassoziierten InsP<sub>6</sub> - Phosphatase (Phytase) [24]. Das pharmakologisch relevante Ins(1,2,6)P<sub>3</sub> entsteht ebenfalls als Produkt einer InsP<sub>5</sub>/InsP<sub>4</sub>-Phosphatasereaktion [25]. Ein breites Wirkungsspektrum wird dieser Verbindung zugeschrieben. So konnten entzündungshemmende, schmerzstillende und antivasokonstriktorische Wirkungen festgestellt werden, wobei die Wirkungsweise bislang nicht geklärt wurde. Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> wird als Vorstufe zur Biosynthese von Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>, InsP<sub>6</sub>, InsP<sub>7</sub> und InsP<sub>8</sub> beschrieben. Dieser Stoffwechselweg ist jedoch nur in tierischen Zellen nachgewiesen worden [26].

In *D. discoideum* sind verschiedene **Inositoltrakisphosphate** beschrieben worden. Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> kommt als Produkt der Phosphorylierungsreaktion von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> vor. Des Weiteren entsteht Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> ebenso wie Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub> als Abbauprodukt von Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>. Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub> ist ein Intermediat der InsP<sub>6</sub> -Biosynthese. Weitere Inositoltrakisphosphate treten als Produkte des Phytase-katalysierten Abbaus auf.

Dem Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> wird die Regulation des durch Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> verursachten Ca<sup>2+</sup>-Ionen Einstroms zugeschrieben [30]. In höheren Zellen ist Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> an der GAP-vermittelten (GTPase-aktivierendes Protein) Signaltransduktion beteiligt [27]. Ein weiteres biologisch relevantes Inositoltrakisphosphat ist das Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub>. Die Plasmamembran vieler Zelltypen enthält Chloridkanäle, die durch die Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration aktiviert werden [28]. Die Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Chloridkanäle sind an der Aufrechterhaltung der Salz- und Flüssigkeits-Balance beteiligt. Die spezifische Inhibierung solcher Kanäle durch Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub> wurde nachgewiesen [28].

In Extrakten von *D. discoideum*-Zellen wurden drei **Inositolpentakisphosphat**-Isomere nachgewiesen. Es handelt sich hierbei um Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> ( $C_i \approx 8 \mu\text{M}$ ), Ins(1,2,3,4,6)P<sub>5</sub>

( $C_i \approx 16 \mu\text{M}$ ) und  $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$  ( $C_i \approx 32 \mu\text{M}$ ). Die zwei letztgenannten  $\text{InsP}_5$ -Isomere entstehen als Produkt der Dephosphorylierungsreaktion bei der Inkubation von zytosolischen Extrakten mit  $\text{InsP}_6$  und ADP. In Gegenwart eines ATP-regenerierenden Systems wird jedoch keine Dephosphorylierung von  $\text{InsP}_6$  beobachtet. Demnach stellen  $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$  und  $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$  Zwischenstufen sowohl bei dem  $\text{InsP}_6$ -Abbau als auch bei der  $\text{InsP}_6$ -Synthese dar. Diese Wege des Inositolphosphatstoffwechsels werden als futile Zyklen bezeichnet [23]. Ein an diesem Prozess beteiligtes Enzym wurde bereits partiell aufgereinigt und charakterisiert [29]. Es handelt sich um die Inositolpentakisphosphat-(3/5)-Kinase ( $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase) mit der sich der experimentelle Teil dieser Arbeit beschäftigen wird. Dieses zytosolische Enzym scheint für die Synthese von  $\text{InsP}_6$  aus Inositoltetrakis- und -pentakisphosphaten, mit freier 3- und/oder 5-Position, verantwortlich zu sein.

Das biologisch relevante  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  entsteht sowohl aus  $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$  als auch aus  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  und kann zu  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  abgebaut werden [13]. In *D. discoideum* wird  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  als Vorläufer von  $\text{InsP}_6$  angesehen. Die Übertragung der Phosphatgruppe auf die zweite Position wird durch die Inositol-1,3,4,5,6-Pentakisphosphat-2-Kinase ( $\text{InsP}_5$ -2-K) katalysiert. Eine derartige  $\text{InsP}_5$ -2-Kinase wurde in *D. discoideum* noch nicht enzymatisch nachgewiesen. Aus menschlichen, Hefe- und Sojabohnenzellen wurde diese jedoch bereits isoliert.

Im Gegensatz zu anderen  $\text{InsP}_5$ -Isomeren ist  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  aufgrund seiner guten Verfügbarkeit intensiv untersucht worden. In kernhaltigen Erythrozyten von Vögeln und Amphibien reguliert  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  durch die Bindung an Hämoglobin dessen Sauerstoffaffinität und übernimmt so die Rolle des 2,3-Bisphosphoglycerats in Säugern [27, 30].

60 Jahre nach der Entdeckung von **Inositolhexakisphosphat** als Phosphatspeicher in Samen von Pflanzen wurde festgestellt, dass dieses ubiquitär in tierischen Zellen vorkommt und, dass es das in der Natur am häufigsten vorkommende Inositolphosphat ist [27]. In vegetativen *D. discoideum*-Zellen kultiviert auf Flüssigmedien liegt seine Konzentration im Bereich von 300-600  $\mu\text{M}$  und kann während der Differenzie-

rung und in Sporen bis auf 2 mM ansteigen [31]. In tierischen Zellen liegt die  $\text{InsP}_6$ -Konzentration nur bei 10-100  $\mu\text{M}$ . In *D. discoideum* entsteht  $\text{InsP}_6$  durch sequentielle Phosphorylierung von *myo*-Inositol (Abb. 1.3) über  $\text{Ins}(3)\text{P}$ ,  $\text{Ins}(3,6)\text{P}_2$ ,  $\text{Ins}(3,4,6)\text{P}_3$ ,  $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$  und  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  [23]. Ein weiterer Syntheseweg stellt die Phosphorylierung im Zellkern von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  über  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  und  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  zu  $\text{InsP}_6$  dar [20].

### 1.3.2 Pyrophosphorylierte Inositolphosphate (PP- $\text{InsP}_x$ )

Im Rahmen der Untersuchungen zum Inositolphosphat-Metabolismus in *D. discoideum* wurde eine neue Klasse von Inositolphosphaten mit „energiereichen“ Diphosphatgruppen, die **pyrophosphorylierten Inositolphosphate** auch **Diphosphoinositolphosphate** genannt, entdeckt. Die Beobachtung, dass Zellen relativ große Mengen von zwei Inositolphosphaten enthalten, die auf Anionenaustauschern nach  $\text{InsP}_6$  eluieren, lieferte den ersten Hinweis auf die Existenz von Diphosphoinositolphosphaten. Der direkte Nachweis und die endgültige Strukturaufklärung dieser pyrophosphorylierten  $\text{InsP}_6$ -Derivate erfolgten durch NMR-Spektroskopie und den Einsatz spezifischer Enzyme [32, 33]. Bei den nachgewiesenen Diphosphoinositolphosphaten handelt es sich um die  $\text{InsP}_7$ -Isomere D-6-Diphospho-*myo*-Inositolpentakisphosphat (6-PP- $\text{InsP}_5$ ), D-5-Diphospho-*myo*-Inositolpentakisphosphat (5-PP- $\text{InsP}_5$ ) und das  $\text{InsP}_8$ -Isomer D-5,6-Bisdiphospho-*myo*-Inosoltetrakisphosphat (5,6-bis-PP- $\text{InsP}_4$ ). Die Reaktion von 6-PP- $\text{InsP}_5$  zu 5,6 bis-PP- $\text{InsP}_4$  wird durch eine spezifische 6-PP- $\text{InsP}_5$ -(5)-Kinase katalysiert [33]. In *D. discoideum* stellen die Diphosphoinositolphosphate die häufigsten Inositolphosphate nach  $\text{InsP}_6$  dar. Die intrazelluläre Konzentration von  $\text{InsP}_7$  liegt bei *D. discoideum* zwischen 30 und 100  $\mu\text{M}$ , die von  $\text{InsP}_8$  zwischen 60 und 300  $\mu\text{M}$  [34]. Diese neue Stoffklasse ist offensichtlich ubiquitär verbreitet, denn nach ihrer Entdeckung in *D. discoideum* wurde sie auch in diversen Zelltypen anderer Organismen nachgewiesen. So konnte das Vorkommen der Diphosphoinositolphosphate in Hefen [35], Pflanzenzellen [36] und Säugerzellen [37] gezeigt werden. Nach bisheri-

gen Erkenntnissen entstehen die Diphosphoinositolphosphate in *D. discoideum* bei der  $\text{InsP}_6$ -Kinase katalysierten Phosphorylierung von  $\text{InsP}_6$  durch ATP [38]. Die Wachstumsbedingungen und das Einsetzen der Hungerphase beeinflussen die Konzentration der Diphosphoinositolphosphate in *D. discoideum*. Die Anreicherung dieser Verbindungen in der spät exponentiellen Wachstumsphase oder unter Hungerbedingungen wurde dokumentiert [31].

In Hefen und Säugetierzellen werden die Diphosphoinositolphosphate ausgehend von  $\text{InsP}_5$  und  $\text{InsP}_6$  gebildet [39]. In den letzten Jahren wurden viele Enzyme identifiziert, die an dem Stoffwechsel dieser Verbindungen beteiligt sind. Es handelt sich dabei um Inositolphosphatmultikinasen (IPMK) [40] und eine Familie von  $\text{InsP}_6$ -Kinasen [39]. Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung der Diphosphoinositolphosphate geben Hinweise auf mögliche Funktionen dieser Verbindungen. So wird vermutet, dass diese energiereichen Verbindungen aufgrund ihres Phosphatgruppenübertragungspotentials als Phosphatgruppendonor bei spezifischen Proteinphosphorylierungen dienen könnten [41]. Möglicherweise sind die Diphosphoinositolphosphate an endo- und exozytotischen Vorgängen beteiligt. Diese Funktion könnte für einen professionellen Phagozyten wie *D. discoideum* von Bedeutung sein. Die Gendeletion des  $\text{InsP}_6$ -Kinase kodierenden Gens in *Saccharomyces cerevisiae* führt zum langsameren Wachstum. Weiterhin weisen die Mutanten geringere Diphosphoinositolphosphat-Konzentrationen auf und enthalten ungewöhnlich kleine, fragmentierte Vakuolen [39]. Defekte in der Endozytose werden ebenfalls beobachtet [42]. In *D. discoideum* wurde ein  $\text{InsP}_6$ -Kinase-Gen identifiziert und ausgeschaltet [43]. Die erzeugten Mutanten können weder  $\text{InsP}_7$  noch  $\text{InsP}_8$  bilden. Im Gegenzug wurde ein Anstieg der  $\text{InsP}_6$ -Konzentration um das 2,5-fache beobachtet. Im Vergleich zum Wildtyp zeigten die Mutanten keine Veränderungen in Pino- und Phagozytose, Wachstumsraten, Zellgröße und Differenzierung. Lediglich eine beschleunigte Chemotaxis wurde beobachtet.



## 1.4 Übersicht des Inositolphosphatstoffwechsels in *Dictyostelium discoideum*

Bei den meisten Untersuchungen zur Aufklärung des Inositolphosphatstoffwechsels wurden Zellen aus der vegetativen Wachstumsphase bzw. frühen Aggregationsphase verwendet. Der Stoffwechsel während der Differenzierungsphase ist dagegen wenig untersucht worden. Bei den dokumentierten Untersuchungen lag der Schwerpunkt eher auf der Analytik der Metabolite und nicht auf der Reinigung und Charakterisierung der beteiligten Enzyme. Zellen oder auch Zellhomogenate wurden mit vorgegebenen, isopenmarkierten Substraten versetzt und das entstandene Metabolitmuster untersucht. Unter diesem Gesichtspunkt ist es schwierig ein weitgehend vollständiges Inositolphosphat-Metabolismus-Modell aufzustellen, da die Substratspezifität der beteiligten Enzyme und eine mögliche Kompartimentierung innerhalb der Zelle bei den maßgeblichen Versuchen meist unberücksichtigt blieb. In der Abb. 1.3 ist das Modell des Inositolphosphat-Stoffwechsels in *D. discoideum* dargestellt. Die Phytase-Metabolite sind ebenfalls angegeben.

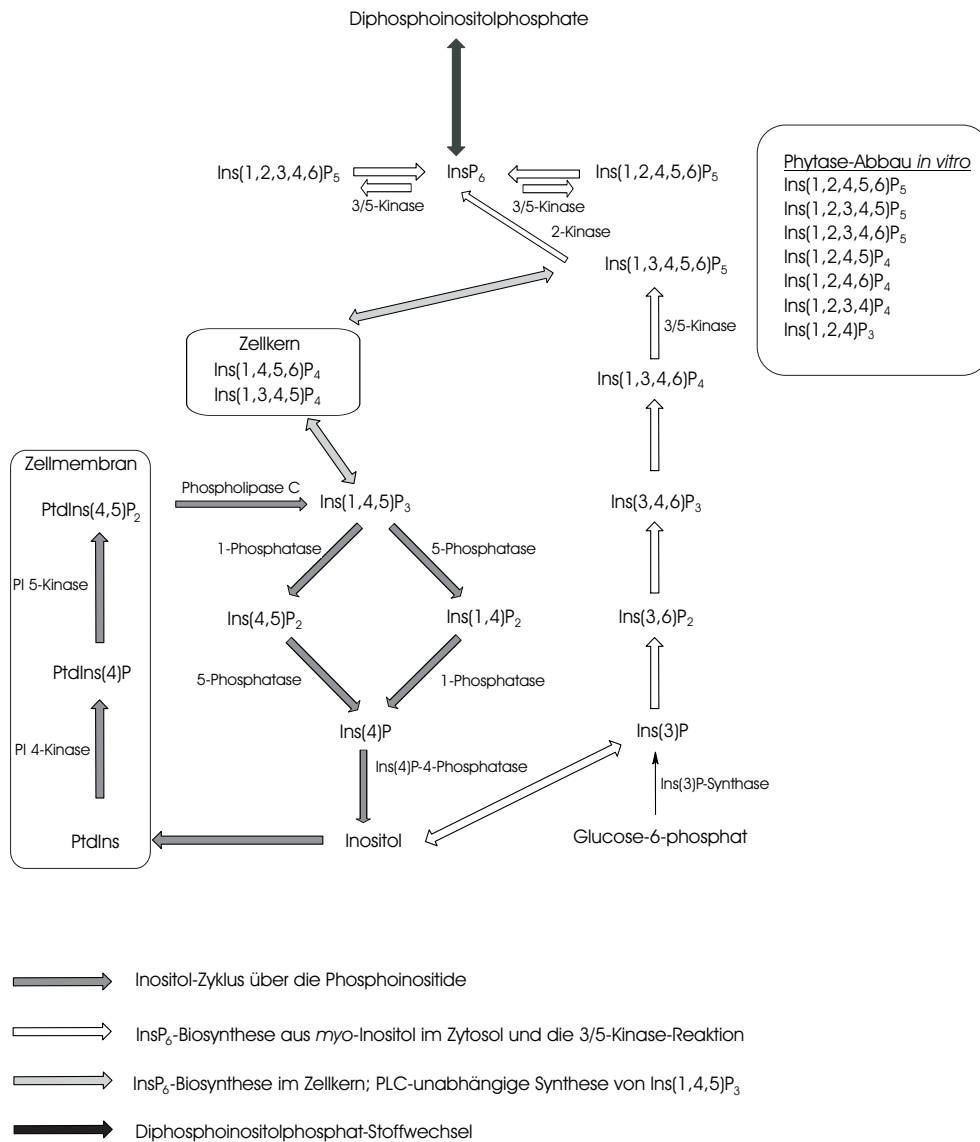


Abbildung 1.3: Modell des Inositolphosphat-Stoffwechsels in *D. discoideum*; Phytase-Metabolite

## 1.5 Funktionen von Inositolhexakisphosphat

Das Inositolhexakisphosphat, auch Phytinsäure genannt, kommt in der Natur als Anion (Phytat) vor. Das Phytat wurde zuerst als wichtigster Phosphatspeicher in Pflanzensamen beschrieben. Der  $\text{InsP}_6$ -Gehalt beträgt hier 1-5 % (w/w) und entspricht somit

75 ± 10 % des gesamten Phosphatgehaltes und 90 % der in ausgereiften Pflanzensamen vorkommenden Inositolphosphate [44]. In Pflanzen wird das Phytat in speziellen membranumhüllten Organellen, den Protein-Bodies, deponiert, die zum vakuolären Kompartiment gehören. In diesem extrazytoplasmatischen Kompartiment unterliegt es während der Samenentwicklung keinem Abbau. Erst mit der Keimung beginnt der Abbau durch die Phytase und die Mobilisierung von Phosphat, Inositol und lebenswichtigen Kationen. Kürzlich wurde  $\text{InsP}_6$  als physiologisches Signal beschrieben, das an der Regulation von Stomataöffnungen beteiligt ist, über die der Wasser- und Gasaustausch zwischen Pflanze und Aussenwelt reguliert wird [45]. Beim Trockenstress wird infolge von Wasserverlust die Abscisinsäure in der Wurzel und auch in den Blättern gebildet. Sie wird durch den Transpirationsstrom an die Schließzellen herangeführt. In diesen Zellen kommt es u.a. zum Anstieg der intrazellulären  $\text{InsP}_6$ -Konzentration. Der gesteigerte  $\text{InsP}_6$ -Spiegel bewirkt die Aktivierung der  $\text{K}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in der Vakuolenmembran und mobilisiert über letztere Calcium aus Endomembranspeichern [46].

In den letzten Jahren wurde bei eukaryontischen Zellen eine Reihe physiologischer Funktionen von  $\text{InsP}_6$  vorgeschlagen. Wegen der Komplexierungseigenschaften von  $\text{InsP}_6$  gibt es aber noch Vorbehalte hinsichtlich dieser Ergebnisse. In der Zelle kann das  $\text{InsP}_6$  2- und 3-wertige Kationen komplexieren und dadurch deren Verfügbarkeit reduzieren. Weiterhin wird die intrazelluläre Verfügbarkeit von  $\text{InsP}_6$  durch die Unlöslichkeit seines  $\text{Ca}^{2+}$ -bzw.  $\text{Mg}^{2+}$  Salzes und die Bindung an Proteine begrenzt. Bei der Zuordnung dieser Funktionen wurde immer von lokal begrenzten Pools von Inositolphosphaten ausgegangen, deren Schwankungen für die beobachteten Effekte verantwortlich sein müssen. Nur so lassen sich die unterschiedlichen Funktionen, die meist hohe Umsatzraten von  $\text{InsP}_6$  erfordern, mit dem scheinbar konstanten  $\text{InsP}_6$ -Spiegel in Einklang bringen [47]. In *D. discoideum* ist die physiologische Bedeutung von  $\text{InsP}_6$  bisher noch unklar. In anderen Zelllinien konnte gezeigt werden, dass  $\text{InsP}_6$  für den mRNA-Export aus dem Zellkern erforderlich ist [48]. In eukaryontischen Zellen sind die Transkription und Translation räumlich durch die Kernhülle

getrennt. Diese beiden Prozesse sind über den „nuclear pore complex“ (NPC) miteinander verknüpft, der den selektiven nucleocytoplasmatischen Austausch von Proteinen ermöglicht. Für den Export von mRNA aus dem Zellkern sind Vorgänge wie die Prozessierung der pre-mRNA erforderlich. In menschlichen Zellen führt die Überexpression der Inositol-Phosphatase SopB, ein Virulenzfaktor der Salmonellen, zur Erschöpfung der  $\text{InsP}_6$ -Konzentration, die mit der Anreicherung von polyadenylierter RNA im Zellkern koinzidiert [49]. Dieses Ergebnis lässt einen Defekt beim Export von mRNA aus dem Zellkern vermuten, der mit der niedrigen  $\text{InsP}_6$ -Konzentration zusammenhängt. Mutationsstudien in Hefen ergaben weitere Hinweise auf die Rolle von  $\text{InsP}_6$  bei dem mRNA-Export. Diese belegen, dass die Phospholipase C und zwei andere Proteine (potentielle Inositolphosphat-Kinasen), die die  $\text{InsP}_6$ -Synthese beeinflussen, für den mRNA-Export benötigt werden [48]. Die Beteiligung von  $\text{InsP}_6$  an anderen Prozessen im Zellkern, wie der Transkription, wird auch diskutiert. Die Beteiligung an einem Reparaturmechanismus für strahlungs- und chemisch-induzierte DNA-Doppelstrangbrüche durch Aktivierung einer DNA-abhängigen Serin/Threonin Proteinkinase, die Teil eines multimeren „DNA-endjoining-complex“ ist, der eine Bindungsstelle für  $\text{InsP}_6$  besitzt, wird beschrieben [50].

Untersuchungen der Endozytose bei pankreatischen  $\beta$ -Zellen zeigen, dass  $\text{InsP}_6$  durch die Regulation der intrazellulären Phosphoinositid-Konzentration und den Einfluss auf die Protein-Phosphorylierung an deren Regulation involviert ist. Hierbei kommt es zur Aktivierung der Proteinkinase C und Inhibierung der Phosphoinositid-Phosphatase Synaptojanin und folglich zur Anreicherung von Phosphatidylinositol 4,5 bisphosphat [51]. Ferner dient  $\text{InsP}_6$  durch Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Aktivität und Insulin-Exozytose als Signal bei der Stimulus-Sekretions-Kopplung dieser Zelllinie.

$\text{InsP}_6$  ist an der Regulation verschiedener Proteinkinasen involviert. Es aktiviert unter anderem eine bisher unbekannt Proteinkinase, die spezifisch Pacsin/Syndapin I phosphoryliert. Dadurch wird die Interaktion mit Dynamin I begünstigt. Pacsin/Syndapin I und Dynamin I sind Proteine die am synaptischen Vesikelrecycling beteiligt sind [52]. In vielen Studien wird die hohe Affinität von  $\text{InsP}_6$  zu verschiedenen Proteinen be-

schrieben. Demnach könnte  $\text{InsP}_6$  durch Bindung an Rezeptorproteine an der Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Freisetzung von Neurotransmittern involviert sein [53]. In Zusammenhang mit der Internalisierung und dem Recycling von Membranen bei der Endozytose wurde die Bindung an die Vesikeladaptorproteine AP-2 [54], AP-3 und AP-180 [55] beschrieben. Hier wird die Inhibierung der durch diese Proteine katalysierten Clathrinkäfig-Bildung postuliert.

Erwähnenswert ist ebenfalls die beschriebene antioxidative Wirkung von  $\text{InsP}_6$ . Wie bereits erwähnt ist  $\text{InsP}_6$  ein guter Komplexbildner. Durch die Bindung von  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen an  $\text{InsP}_6$  wird die  $\text{Fe}^{3+}$  katalysierte Bildung reaktiver Hydroxylradikale und die Peroxidation von Lipiden inhibiert und damit die Zelle vor oxidativen Schäden geschützt. Seit einigen Jahren wird dem  $\text{InsP}_6$  eine Anti-Tumor-Wirkung zugeordnet, die auf seiner antioxidativen Wirkung beruht. Es wird vermutet, dass die 1,2,3 (äquatorial-axial-äquatorial)-Trisphosphat-Gruppe für die Anti-Tumor-Wirkung sowie andere biologische Effekte des  $\text{InsP}_6$  verantwortlich ist [56, 57]. In diesem Zusammenhang konnte in Tiermodellen eine Hemmung des Tumor-Wachstums und eine Abnahme der Tumorgroße beim Verabreichen von  $\text{InsP}_6$  beobachtet werden.  $\text{InsP}_6$  als Wirkstoff wurde ebenfalls als Antineoplastikum [58] und zur Vorbeugung der Nierensteinbildung [59] diskutiert.

## 1.6 Inositolphosphatkinasen

Inositolphosphatkinasen sind an der Regulation der intrazellulären  $\text{InsP}_x$ -Konzentrationen durch Phosphorylierung verschiedener  $\text{InsP}_x$ -Isomere beteiligt. Basierend auf der Sequenzhomologie können drei verschiedene Klassen von Inositolphosphatkinasen unterschieden werden: Die Inositolphosphatkinase-Superfamilie (auch PDKG-Kinasen genannt), die sich aus drei Subfamilien zusammensetzt: Die Inositol(1,4,5)trisphosphat 3-Kinasen ( $\text{IP}_3\text{K}$ ), die Inositolphosphatmultikinasen (IPMK) und die Inositolhexakisphosphatkinasen ( $\text{IP}_6\text{K}$ ) [60]. Die anderen zwei Klassen der Inositolphosphatkinasen sind die Inositol(1,3,4,5,6)pentakisphosphat 2-Kinase ( $\text{IP}_5\text{-2-K}$ ) und die Inosi-

tol(1,3,4)triphosphat 5/6-Kinase / Inositol(3,4,5,6)tetrakisphosphat 1-Kinase (IP<sub>3</sub>-5/6-K / IP<sub>4</sub>-1-K).

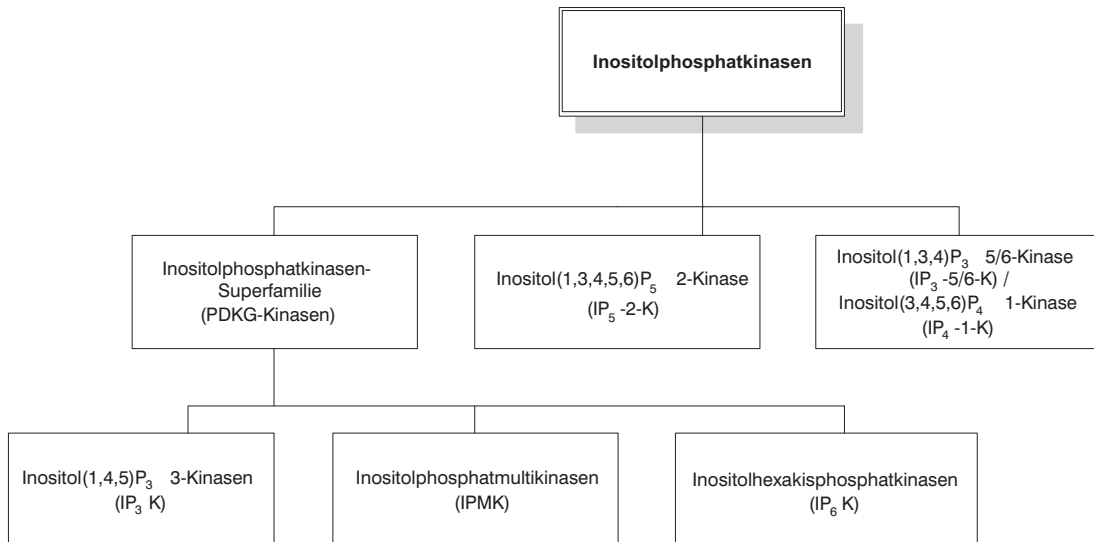


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Inositolphosphatkinasen-Familie

Die katalytischen Domänen der Enzyme der Inositolphosphatkinasen-Superfamilie enthalten ein charakteristisches Aminosäuremotiv der Form (P-C-[VAI]-[ML]-D-X-K-[MI]-G). Dieses PDKG-Motiv spielt möglicherweise eine essentielle Rolle bei dem katalytischen Transfer der Phosphatgruppe von ATP auf den Inositolring und/oder der Positionierung des ATP- $\gamma$ -Phosphates in die Nähe der Akzeptor-Hydroxylgruppe des Inositolringes [61]. Weitere katalytisch essentielle Konsensusmotive sind das an der Katalyse beteiligte SSSL-Motiv [40] und das IDFG/A-Motiv, das für die Bindung des ATPs verantwortlich ist [62].

Die Inositol(1,4,5)triphosphat 3-Kinase wurde zunächst im Tierreich nachgewiesen. Drei Isoformen wurden identifiziert die hochkonservierte Domänen, die an der Bindung, Ausrichtung und Phosphorylierung der InsP<sub>x</sub>-Substrate beteiligt sind, beinhalten. In der Nähe der katalytischen Domänen ist die Calmodulin-Bindedomäne lokalisiert, die durch Bindung von Ca<sup>2+</sup> die IPK-Aktivität stimuliert [63].

Im Gegensatz zur Inositol(1,4,5)trisphosphat 3-Kinase ist die Inositolphosphatmultikinase (IPMK) in der Natur weit verbreitet und stellt wahrscheinlich die evolutionäre Vorstufe der IP<sub>3</sub>K und der IP<sub>6</sub>K dar, die alle das PDKG-Motiv enthalten [26]. Die als erste identifizierte IPMK aus Hefe (IPK2) ist eine InsP<sub>3</sub>/InsP<sub>4</sub> 3/6-Kinase und identisch mit Arg 82/Arg RIII. Dieses ist Teil des Arg82-Mcm 1-Transkriptionskomplexes [38, 64], der die Transkription von Genen kontrolliert, die am Argininmetabolismus beteiligt sind [65]. Die intrazelluläre Lokalisation des IPMK-Homologs in Menschen und *Drosophila melanogaster* wurde als nuklear beschrieben.

Die Inositolhexakisphosphatkinase (IP<sub>6</sub>K) katalysiert die Phosphorylierung von InsP<sub>6</sub> zu PP-InsP<sub>5</sub> sowie die Phosphorylierung von Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> zu PP-InsP<sub>4</sub> [39]. Es wurden bisher drei Isoformen dieser Inositolphosphatkinasesubfamilie identifiziert. Die IP<sub>6</sub>Ks enthalten ein typisches GF[RK]-Motiv, welches vermutlich an der Bindung hochphosphorylierter Inositolphosphate beteiligt ist [66].

Neben den PDKG-Kinasen gehören ebenfalls die IP<sub>5</sub>-2-K und die IP<sub>3</sub>-5/6-K/IP<sub>4</sub>-1-K zu den Inositolphosphatkinasenarten. Die Inositol(1,3,4,5,6)pentakisphosphat 2-Kinase katalysiert den letzten Schritt, der zur InsP<sub>6</sub>-Bildung führt. Das Enzym wurde erstmals in Hefen beschrieben und SCIPK1 genannt [67]. Das humane Homologe wurde erst später aufgrund der Sequenzähnlichkeit mit SCIPK1 identifiziert [68]. Durch Northern Blot Analysen konnte eine ubiquitäre aber sehr schwache Expression in allen Geweben mit höheren Konzentrationen des Transkripts im Herz, Gehirn und Plazenta nachgewiesen werden. Über die Domänenstruktur der IP<sub>5</sub>-2-K und der IP<sub>3</sub>-5/6-K/IP<sub>4</sub>-1-K ist bisher wenig bekannt. Sie weisen keine Homologien zu den typischen IPK-Domänen auf, wie sie für die PDKG-Kinasen beschrieben wurden. Die essentiellen Aminosäurereste für die Katalyse der InsP<sub>x</sub>-Phosphorylierung konnten ebenfalls noch nicht eindeutig bestimmt werden. Lediglich eine für die ATP-Bindung verantwortliche Grasp-Domäne in der IP<sub>3</sub>-5/6-K/IP<sub>4</sub>-1-K wurde bereits identifiziert [26].

## 1.7 Methoden zur Generierung von Mutanten

Das haploide Genom, die Entwicklung eines Transformationssystems sowie die Verfügbarkeit geeigneter Vektoren machen *D. discoideum* für molekularbiologische Manipulationen und damit für eine Genfunktionsanalyse zugänglich. Eine genetische Manipulation ist über zwei Wege möglich: Die Zufallsmutagenese und die zielgerichteten Mutationen. Bei der konventionellen Zufallsmutagenese werden mutagene Substanzen eingesetzt, die nicht gerichtete und zufällige Punktmutationen, die im gesamten Genom verstreut sind, einführen. Eine weitere Methode zur zufälligen Insertionsmutagenese bei *D. discoideum* ist die „restriction enzyme mediated integration“ (REMI). Diese Methode beruht auf der Verwendung eines Restriktionsenzym und einer Transformations-Vektorplasmid DNA mit entsprechender singulärer Schnittstelle im Transformationsansatz und führt zur Integration der Plasmid-DNA in entsprechende Restriktionsschnittstellen im Genom der transformierten Zellen [69]. Diese Methode eignet sich besonders, da der Vektorintegrationsort markiert wird und somit das mutierte Gen isoliert werden kann. Der Integrationsmechanismus bei diesem Prozess ist bislang nicht bekannt. Vermutlich gelangt das Restriktionsenzym mit der transformierenden linearen Plasmid-DNA in den Zellkern. Dort führt das Restriktionsenzym an seinen Erkennungs- und Spaltstellen zu wiederholten Verdau- und Ligationsvorgängen innerhalb des Genoms. Aufgrund der komplementären Enden kommt es dann zur heterologen Integration der Plasmid-DNA in das Genom.

Eine Möglichkeit der gerichteten Mutagenese bietet die homologe Rekombination. Diese erlaubt das zielgerichtete Ausschalten eines Gens. Das Vektorkonstrukt, das für die gezielte Inaktivierung verwendet wird, besteht aus einem Selektionsmarkergen (Resistenzkassette), umgeben von zwei zum Zielgen homologen DNA-Abschnitten. Nach Einführung des Transformationsvektors kommt es durch homologe Rekombination zur Mutation, wenn sich die genomische DNA öffnet und der vollständige Vektor in die DNA-Sequenz des Zielgens integriert wird (doppeltes crossing-over). Nach der Genzerstörung ist die nicht mehr funktionsfähige DNA des Zielgens aber weiterhin



vollständig im Genom vorhanden, was zu unerwünschten Rekombinationsereignissen führen kann.

Die Antisense vermittelte Geninaktivierung durch Expression der Antisense-RNA (asRNA) in transformierten Zellen ist eine Alternative zur homologen Rekombination. Die Mechanismen, wie komplementäre RNA zum Gene-Silencing führt, sind noch weitgehend unverstanden [70]. Die Vorstellung, das sich komplementäre Basensequenzen auf der mRNA und der asRNA zu Doppelsträngen vereinigen mit dem Ergebnis, dass das Ablesen der betreffenden mRNA blockiert wird, erwies sich als nicht haltbar. In der Abbildung 1.5 ist das Standardmodell für den Antisense silencing Mechanismus dargestellt.

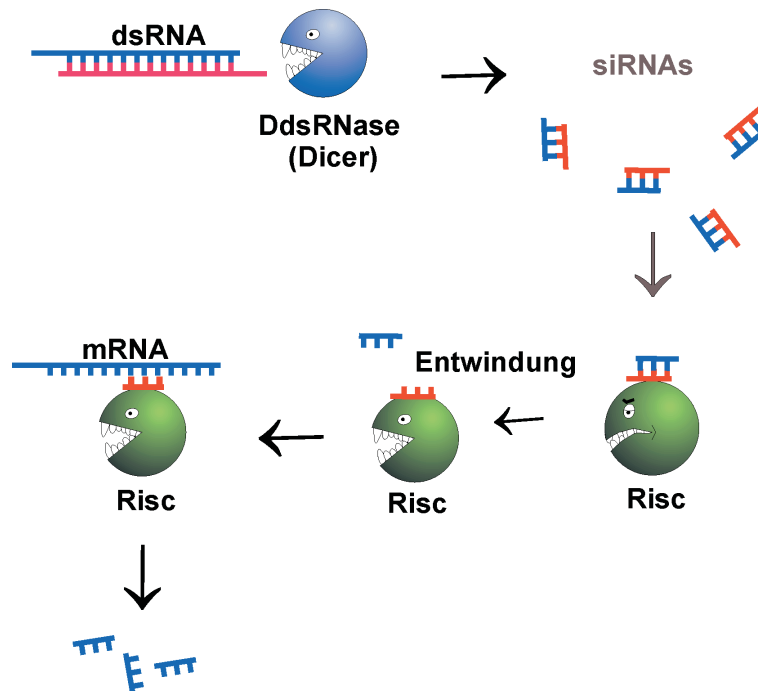


Abbildung 1.5: Standardmodell für den Antisense silencing Mechanismus: doppelsträngige RNA wird von Dicer in small interfering RNAs (siRNAs) zerlegt, siRNAs werden von RNA induced silencing complex (RISC) gebunden und entwunden, der Antisense-Strang spezifiziert RISC zur Degradation der Ziel-mRNA [71]

Bei Gene-Silencing-Experimenten am Rundwurm *C. elegans* in den Jahren 1996-1998 beobachteten Fire und Mitarbeiter, dass nicht das Antisense Transkript sondern kontaminierende doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNAs) eine drastische Verstärkung des hemmenden Effekts hervorrufen [72]. Dabei zeigte sich, dass die Injektion von substöchiometrischen Mengen dsRNA einen besseren Silencing-Effekt hatte als große Mengen von Antisense-Transkripten. Das Phänomen sollte später die Bezeichnung „RNA-Interferenz“ (RNAi) erhalten und wurde schließlich auch bei anderen Organismen, z. B. der Fruchtfliege, dem Zebrafisch und in Säugerzellen gefunden. Ein unerwarteter Befund war das Auffinden der eingeführten dsRNA und der „verlorenen mRNA“ in Form von kleinen, etwa 20 bis 23 bp großen Stücken, die als small interfering RNAs (siRNAs) bezeichnet wurden [73]. Die Autoren zeigten, dass diese kleinen doppelsträngigen RNAs für die RNA-Interferenz verantwortlich sind. Der Ursprung der 21mere zeigte sich, als in *Drosophila* ein Proteinkomplex „Dicer“ gefunden wurde. Diese Nuklease zerschneidet *in vitro* doppelsträngige RNA in 21mere [74]. In *D. discoideum* war die dsRNA-Aktivität bekannt, die *in vitro* 23mere produziert [75], aber erst kürzlich wurden im Genom zwei Dicer-Homologe gefunden. Die Rolle der 21mere beim RNAi-Mechanismus wurde dann durch die Entdeckung des RNA induced silencing complex (RISC) in *Drosophila* aufgeklärt. RISC ist ein Proteinkomplex, der ein 21mer als RNA Komponente enthält. Der Komplex hat small sense RNase (ssRNase)-Aktivität und erhält seine Spezifität durch das 21mer. Offensichtlich findet der Komplex seine Ziel-RNA durch den Antisense Strang des 21mers und schneidet dann die mRNA in der Mitte des Hybrids [76]. Das bestehende Modellsystem wurde für bestimmte Organismen erweitert [71].

### **1.8 Das *Dictyostelium discoideum* Genom**

Das haploide Genom von *D. discoideum* ist etwa 34 Mb groß. Die Gene verteilen sich auf sechs Chromosomen, welche zwischen 4 und 8 Mb groß sind. Einen weiteren Bestandteil des Genoms ist das ca. 88 kb große extrachromosomale Palindrom, auf dem

die ribosomalen Ribonukleinsäuren-Gene lokalisiert sind [10]. Die rDNA ist ebenfalls im Zellkern lokalisiert und macht etwa 23 % der DNA im Zellkern aus. Ähnlich wie *Saccharomyces cerevisiae* besitzt auch *D. discoideum* zusätzlich im Zellkern bis zu 300 Kopien eines 1,5 bis 27 kb großen Plasmides, wobei die Art des Plasmids vom jeweiligen *Dictyostelium*-Stamm abhängig ist [77]. Diese Plasmide (DdP, *Dictyostelium discoideum* plasmid) besitzen einen Replikationsursprung und kodieren für ein als „Rep“ bezeichnetes Protein, welches für die autonome Replikation und Regulation der Anzahl der Plasmide benötigt wird [78,79]. Neben den bereits erwähnten Bestandteilen des *D. discoideum* Genoms enthält jede Zelle ungefähr 200 Mitochondrien mit je einer Kopie einer etwa 55 kb großen mitochondrialen DNA [80], die hauptsächlich für Gene des Energie-Stoffwechsels kodiert. Das mitochondriale Genom von *D. discoideum* mit einem Adenin/Thymin (AT)-Gehalt von 73 % ist größer als das von Säugetieren. Während des vegetativen Wachstums kann der mitochondriale DNA-Anteil (mitDNA) bis zu 40 % der Gesamt-DNA betragen.

Die Sequenzierung des Genoms des *D. discoideum*-Stammes AX-4 durch das *D. discoideum* Genom-Projekt ist 2005 abgeschlossen worden [10]. Als experimentelle Vorgehensweise wurde die „whole chromosome shotgun“-Methode gewählt. Dazu werden die Chromosomen mittels Pulsfeldgelelektrophorese getrennt, in Segmente definierter Länge geschnitten, in einen Plasmidvektor inkloniert und sequenziert. Es werden so viele Klone analysiert bis jede Base statistisch fünf bis zehnmal sequenziert wurde. Die Assemblierung besteht aus der Rekonstruktion der gesamten genomischen Sequenz mittels Anordnung der überlappenden Fragmente. Aufgrund des hohen A/T-Gehalts von durchschnittlich 78 % erwies sich die Sequenzierung als recht schwierig. In Exons liegt der A/T-Gehalt im Mittel bei 73 %, wobei Adenin und Thymin bevorzugt in der 3. Position des Basentriplets auftreten. Dagegen liegt der A/T-Gehalt in den nicht-kodierenden Regionen bei 85 %. Homopolymere poly (dA)- bzw. poly(dT)-Sequenzen können eine Länge von bis zu 180 bp erreichen. Das *D. discoideum* -Genom kodiert für etwa 12500 Gene und ist damit ein sehr dichtes Genom, d.h. 71 % des Genoms werden durch Gene repräsentiert bzw. 63 % des Genoms sind Exon-kodierend. Durch-

schnittlich fällt auf ca. 2600 bp ein Gen, so dass zwischen den kodierenden Regionen der Gene durchschnittlich nur ein Abstand von 780 bp besteht. Diese Gendichte wird bisher nur von den sequenzierten Organismen *Schizosaccharomyces* (2500 bp/Gen) und *Saccharomyces cerevisiae* (2000 bp/Gen) übertroffen. Innerhalb dieser Abstände zwischen den kodierenden Regionen der Gene in *D. discoideum* liegen auch die regulatorischen Bereiche wie Promotoren und Terminatoren. Im Vergleich zu einigen anderen sequenzierten Eukaryonten enthält das *D. discoideum* Genom mit etwa 10 % einen bemerkenswert großen Anteil mobiler genetischer Elemente (Transposons). Der Vergleich des Humangenoms mit dem *D. discoideum*-Genom (s. Tabelle 1.1) zeigt, dass das erste zwar etwa 85 mal größer ist aber nur ca. 1,8 mal so viele Gene besitzt.

	<i>D. discoideum</i>	Mensch
Genomgröße (Mb)	34	2900
Zahl der Chromosomen	1 x 6	2 x 23
Anzahl der Gene	~ 12500	~ 22300
Gendichte (kb/Gen)	2,5	128
mittlere Genlänge (bp)	~ 1750	~ 27000
kodierende Regionen (%)	~ 62	~ 1
Länge der kodierenden Regionen (aa)	518	509
A/T-Gehalt (%)	78	59
A/T-Gehalt Introns (%)	88	62
tRNA-Gene	390	496
Transposongehalt (%)	10	45

Tabelle 1.1: Vergleich des *D. discoideum*- und menschlichen Genoms.

Die Tabelle wurde in modifizierter Form von [10] und [81] übernommen.

## 1.9 Aufgabenstellung

In den letzten Jahren erlangte das Inositolhexakisphosphat große Bedeutung in der Medizin und Biologie, weil ihm eine Reihe physiologischer Funktionen nachgewiesen wurden, wie z.B. die Beteiligung an dem Export von mRNA aus dem Zellkern sowie an der DNA-Reparatur.

In *D. discoideum* Zellen stellt das Inositolhexakisphosphat das häufigste Inositolphos-

phat dar. Sein Metabolismus ist jedoch bisher noch nicht vollständig aufgeklärt worden. Ebenfalls ist seine Funktion noch unklar.

Eine Reihe artspezifischer Eigenschaften machen *D. discoideum* zu einem geeigneten System zur Untersuchung vieler zentraler zellbiologischer Fragen. Es hat einen kurzen Lebenszyklus, ist leicht zu züchten und kann in großen Mengen geerntet werden. Das haploid Genom dieses Organismus kann mit Hilfe von einer wachsenden Anzahl molekulargenetischer Techniken manipuliert werden.

Die Schwerpunkte der vorliegenden Arbeit sind:

*Optimierung des Anreicherungsverfahrens der Inositolpentakisphosphat-(3/5)-Kinase aus D. discoideum*

Das Bestehen „futiler Zyklen“ zwischen Inositolhexakisphosphat und den beiden Inositolpentakisphosphaten ( $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$  und  $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$ ) wurde bereits unter 1.3.1 erwähnt. Die  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase ist an diesen Prozessen beteiligt. Die physiologische Bedeutung dieser energieverbrauchenden Zyklen ist noch nicht verstanden. Durch die Identifizierung dieses Proteins sollte die anschließende Sequenzierung ermöglicht werden.

*Sequenzierung der Inositolpentakisphosphat-(3/5)-Kinase*

Der erste Schritt zur Aufklärung der  $\text{InsP}_6$ -Funktion(en) in *D. discoideum* ist die Sequenzierung der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase. Nach der Bestimmung der Primärstruktur dieses Proteins durch Massenspektrometrie soll das entsprechende kodierende Gen durch Recherchen in Protein- sowie Genomdatenbanken identifiziert werden. Des Weiteren können Struktur-Homologien zu bereits bekannten Enzymen aufgedeckt werden.

*Generierung von Mutanten mit Defekten in der Expression des  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase Gens ; Funktionelle Analyse der erzeugten Mutanten*

Durch das Ausschalten des Gens bzw. die partielle Verminderung der Proteinexpression der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase sollten Mutanten erzeugt werden. Diese sollten dazu die-

## KAPITEL 1. EINLEITUNG

---

nen, mögliche physiologische Funktionen der  $\text{InsP}_5\text{-(3/5)}$ -Kinase, deren Substrate und Produkte in *D. discoideum* aufzudecken. Dabei lag der Schwerpunkt in der Untersuchung möglicher phänotypischer Veränderungen und des Einflusses der Mutation auf die intrazelluläre Konzentration verschiedener Metabolite des Inositolphosphatstoffwechsels.

# KAPITEL 2

---

## Material und Methoden

---

### 2.1 Material

Die nachfolgenden Tabellen enthalten alle nicht standardmäßig eingesetzten Kits, Enzyme, Chemikalien und ihre Bezugsquellen.

#### 2.1.1 Kits

<b>Produkt</b>	<b>Bezugsquelle</b>
DNeasy Plant Maxi (für bis zu 260 $\mu$ g genomische DNA)	Qiagen
DNeasy Plant Mini (für bis zu 30 $\mu$ g genomische DNA)	Qiagen
DC Protein Assay	Bio-Rad
HotStar Taq Master Mix	Qiagen
Micro BCA Protein Assay	Pierce
QIAfilter Plasmid Maxi (für bis zu 500 $\mu$ g Plasmid-DNA)	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep (für bis zu 20 $\mu$ g Plasmid-DNA)	Qiagen
QIAquick Gel Extraction	Qiagen
QIAquick PCR Purification	Qiagen

### 2.1.2 Enzyme

<b>Produkt</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Alkalische Phosphatase aus Shrimps	Boehringer
Klenow Fragment	Fermentas
Restriktionsendonukleasen	Boehringer, Roche, New England Biolabs, Sigma
T4 DNA Ligase	Fermentas
T4 DNA Polymerase	Fermentas
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	New England Biolabs
Trypsin	Sigma
<i>Vent</i> -DNA-Polymerase	New England Biolabs

### 2.1.3 Antibiotika

<b>Produkt</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Ampicillin	Roth
Blasticidin S	Roth / ICN
Dihydrostreptomycinsulfat	ICN
Geneticin (G 418)	Gibco-BRL Life Technologie

### 2.1.4 Proteingrößen-und DNA-Längenstandard

<b>Produkt</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Molekulargewichtsstandard-Protein (97,4 - 14,4 kDa), low range	Bio-Rad
100 bp DNA-Leiter (100-5000bp), extended	Roth



### 2.1.5 Reagenzien

<b>Substanz</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Acrylamid	Biomol
Agar	Roth
Agarose NEE0	Roth
Aminosäuren	Roth, Sigma
Ammoniumperoxodisulfat	Biomol
ATP	Sigma
Bacto-Trypton	Oxoid
Biotin	Serva
Bromphenol blau	Biomol
Coomassie R-250	Biomol
Cyanocobalamin	Sigma
dNTP's	Roth
Ethidiumbromid	Roth
FITC-Dextran 60	Amersham Biosciences
Fleischpepton (Trypton/Pepton aus Casein)	Roth
Folsäure	Serva
Hefeextrakt	Oxoid
Heparin-Agarose (Typ II)	Sigma
Hydroxylapatit	Bio-Rad
Inositolhexakisphosphat	Sigma
Latexpartikel (1 $\mu$ m Durchmesser; hydrophil)	Polysciences
Liponsäure	Serva
$\beta$ - Mercaptoethanol	Biomol
Mono Q	Amersham Biosciences
N,N'-bis-Methylenacrylamid	Biomol
PAR	Sigma
Q-Sepharose FF	Amersham Biosciences
Resource Q	Amersham Biosciences
Riboflavin	Serva
SDS	Biomol
Superdex-200 HR	Amersham Biosciences
Thiamin	Serva
Tris	Roth
Xylen Cyanol	Serva

## 2.1.6 Vektoren

Tabelle 2.1: Verwendete Vektoren

Vektor	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
pDexRH	bla	A. Noegel (Universität Köln) [82]
pUCBsr $\Delta$ Bam	bla	A. Noegel (Universität Köln) [83]
pUC18	bla, lac Z', col E1	U. Wehmeier (Universität Wuppertal) [84]

## 2.1.7 Verwendete Oligonukleotide

Die eingesetzten Oligonukleotide stammen von der Firma MWG-Biotech AG. Unterschriebene Abschnitte geben die generierte Erkennungssequenz für die jeweilige Restriktionsendonuklease. Die dazu notwendigen Basenaustausche sind durch fett gedruckten Buchstaben gekennzeichnet.

Tabelle 2.2: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5' $\rightarrow$ 3'	Restriktions- endonuklease	Gen
3/5 Kin sense 1	GTG AAA ATA TCC <u>CAA GCT T</u> TT TAA AAT C	Hind III	InsP <sub>5</sub> -(3/5)-Kinase
3/5 Kin antisense 1	CAA ACT <u>GGT ACC</u> AAT ATT TGA GTC AT	Kpn I	InsP <sub>5</sub> -(3/5)-Kinase
3/5 Kin sense 2	TAT GGG TAT TGA <u>AGC TTT</u> AAC ATA TGG A	Hind III	InsP <sub>5</sub> -(3/5)-Kinase
3/5 Kin antisense 2	CTA CAT GAG <u>CGA ATT</u> CAA TCA TTT TCA A	EcoRI	InsP <sub>5</sub> -(3/5)-Kinase

## 2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.1 Kultivierung von *D. discoideum*

In der vorliegenden Arbeit wurde der axenisch wachsende Stamm *Dictyostelium discoideum* AX-2(ATCC: 24397) verwendet. Für diesen Laborstamm wurde ein definiertes Medium entwickelt, das das Wachstum unter bakterienfreien Bedingungen ermöglicht [7]. AX-2-Zellen werden adhäsiv an hydrophilen und hydrophoben Oberflächen und phagozytieren neben Bakterien hydrophile und hydrophobe Modellpartikel. Die Anzucht erfolgte aus Sporen, die bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in 17 mM Phosphatpuffer (Sörensen-Puffer), 30 % (v/v) Glycerin; pH 6,5 gelagert wurden. Die Germination erfolgte in Gewebekulturflaschen (50 ml, 25 cm<sup>2</sup> Grundfläche) innerhalb von 2-3 Tagen.

#### 2.2.1.1 Anzucht von *D. discoideum* in Flüssigkeitsmedium

Die Zellen wurden in HL5-Medium (Tabelle 2.3) oder FM-Medium (Tabelle 2.4) bei  $22,5^{\circ}\text{C}$  in Erlenmeyerkolben (100-1000 ml) oder Fernbachkolben (1200 bzw. 3000 ml) und unter konstantem Schütteln (Rundschüttler; Braun HT) mit 120 upm/min kultiviert. Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten betrug die Füllhöhe der verwendeten Kulturgefäße maximal 10 % (bei den Erlenmeyerkolben) und maximal 30 % (bei den Fernbachkolben) der maximal angegebenen Füllmenge. Die Zellen werden bis zu einer Zelldichte von  $1,5 \cdot 10^7$  Zellen/ml im Medium gehalten. In der logarithmischen Wachstumsphase betrug die Verdopplungszeit 10-16 h.

Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Kleinere Probenvolumina (1-50ml) wurden 5 min bei 1000 g und größere Probenvolumina (über 200 ml) 15 min bei 2000 g abzentrifugiert. Die Zellen wurden je nach Verwendungszweck zweimal mit eiskaltem Puffer (Sörensen-Phosphatpuffer, 50 mM Tris/HCl; pH 7,7 oder 20 mM HEPES-Puffer; pH 6,8) gewaschen. Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte unter Eiskühlung.

Tabelle 2.3: Zusammensetzung des semi-synthetischen axenischen Mediums (HL5-Medium) [7]. Das Medium wurde 16 min bei 120°C autoklaviert.

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,48 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,64 g/l
Glucose	15,4 g/l
Hefeextrakt	7,15 g/l
Fleischpepton	14,3 g/l
Dihydrostreptomycin	0,25 g/l

Tabelle 2.4: Zusammensetzung des synthetischen-FM-Mediums [12]. Das Medium wurde 14 min bei 120°C autoklaviert.

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
Aminosäurelösung	250 ml/l
Salzlösung	20 ml/l
Spurenelementlösung	0,1 ml/l
NaHCO <sub>3</sub>	16,8 mg/l
Glucose	10 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,14 g/l
Dihydroxystreptomycin	50 mg/l
Vitaminlösung	10 ml/l
pH 6,8 eingestellt mit 85 %-iger Phosphorsäure	

Tabelle 2.5: Stocklösungen für das synthetische FM-Medium

<b>Aminosäurelösung</b>		<b>Spurenelementlösung</b>	
Substanz	Konzentration	Substanz	Konzentration
NaOH	0,4 g/l	Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	48,4 g/l
Arginin	2,9 g/l	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	23 g/l
Asparagin	1,5 g/l	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11,1 g/l
Cystein	1 g/l	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	5,1 g/l
Glutamat	2,5 g/l	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,7 g/l
Glycin	4,5 g/l	CuCl <sub>2</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1,5 g/l
Histidin	1,12 g/l	Ammoniummolybdat	1 g/l
Isoleucin	3 g/l	Einstellung auf pH 6,5	
Lysin	3,6 g/l		
Methionin	1,5 g/l		
Prolin	4 g/l		
Threonin	2,5 g/l		
Tryptophan	1 g/l		
Valin	3,5 g/l		
<b>Salzlösung</b>		<b>Vitaminlösung</b>	
Substanz	Konzentration	Substanz	Konzentration
NH <sub>4</sub> Cl	2,675 g/l	Biotin	2 mg/l
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,147 g/l	Folsäure	20 mg/l
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,35 g/l	Cyanocobalamin	0,5 mg/l
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	16,8 mg/l	Liponsäure	40 mg/l
		Riboflavin	50 mg/l
		Thiamin	50 mg/l
		Einstellung auf pH 7 mit NaOH	

### 2.2.1.2 Anzucht auf Agarplatten

Zum Klonieren von Transformanten wurden SM-Agarplatten verwendet. Hierzu wurden je 200 µl einer dichten *E. coli* B/r-Suspension und eine adäquate Menge *D. discoideum* Zellen in Sörensen-Phosphatpuffer auf SM-Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden anschließend bei 22,5°C ca. 2-4 Tage inkubiert. Die Generationszeit betrug hierbei 3-4 Stunden. *D. discoideum*-Kolonien zeigten sich als klare Fresshöfe („plaques“) auf dem Bakterienrasen.

Für die Gewinnung von Sporen wurden Wasseragarplatten verwendet. Hierzu wurden axenisch wachsende Zellen bis zu einer Dichte von  $0,5 \cdot 10^7$  Zellen/ml kultiviert,

geerntet, mit eiskaltem Sörensen-Phosphatpuffer gewaschen und auf eine Dichte von  $2 \cdot 10^9$  Zellen/ml mit dem Phosphatpuffer eingestellt. Auf frisch gegossene Phosphat-Agarplatten wurden dann  $2-4 \cdot 10^8$  Zellen/Platte ausgestrichen. Die Platten wurden dann anschließend bei  $22,5^\circ\text{C}$  inkubiert. Eine längere Inkubation führte zum vollständigen Ausdifferenzieren von *D. discoideum*.

Tabelle 2.6: Zusammensetzung der Agarplatten. Das Medium wurde 14 min bei  $120^\circ\text{C}$  autoklaviert.

SM-Agarplatten		Wasseragarplatten	
Substanz	Konzentration	Substanz	Konzentration
Agar	10 g/l	Agar	15 g/l
Bacto-Trypton	10 g/l	mit Sörensen-Phosphatpuffer (pH 6,0)	
Glucose	10 g/l	auf 1 l auffüllen	
Hefeextrakt	1 g/l		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 g/l		
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2,2 g/l		
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1 g/l		

### 2.2.1.3 Anzucht in submersen Standkulturen

Zur längeren Haltung der Zellen und zur besseren mikroskopischen Betrachtung wurden die Zellen in submersen Standkulturen gehalten (50 ml,  $25 \text{ cm}^2$  Grundfläche). Nach Erreichen eines geschlossenen Monolayers wurde die Kulturflasche bei  $22,5^\circ\text{C}$  und 120 Upm für 16 Stunden geschüttelt und die Zellsuspension verdünnt. Als Medium wurde sowohl das HL5-Medium als auch das FM-Medium verwendet.

### 2.2.1.4 Gewinnung und Konservierung von *D. discoideum*-Sporen

Nach vollständiger Differenzierung von *D. discoideum* auf Agarplatten wurden die Sporen durch kräftiges Abklopfen der Agarplatte in einen frischen Petrischale-Deckel geerntet und mit jeweils 1 ml steriler Glycerinlösung (30 % in Sörensen-Puffer) abgespült. Die so erhaltene Sporen-Suspension wurde bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert und war unter diesen Bedingungen mehrere Jahre haltbar. Zum Animpfen einer neuen Kultur wurde

ein Aliquot bei Raumtemperatur aufgetaut, mindestens einmal gewaschen (Sörensen-Phosphatpuffer; 4500 g, 5 min, 4°C) und 200-500  $\mu\text{l}$  in eine Gewebekulturflasche (50 ml, 25  $\text{cm}^2$  Grundfläche) mit 4 ml HL5-Medium oder FM-Medium gegeben.

### 2.2.1.5 Bestimmung der Zelldichte und der Größenverteilung

Die Zelldichte und das mittlere Zellvolumen wurden mit einem Partikelzählgerät (Coulter Counter Modell Z2) der Firma Coulter Electronics GmbH bestimmt. Hierzu wurde unter sterilen Bedingungen aus der Zellsuspension ein Aliquot entnommen und 5 min auf Eis inkubiert. Die nun einheitlich abgerundeten Zellen wurden vorsichtig resuspendiert und verdünnt. Die Messdaten wurden anschließend elektronisch ausgewertet (Coulter Z2 AccuComp vers. 3.01a).

### 2.2.2 Transformation von *D. discoideum*

Die Elektroporation ist eine effiziente Methode zur Transformation von *D. discoideum*. Die zu transformierenden Zellen wurden bis zu einer Dichte von  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml in axenischem Medium kultiviert. Pro Transformationsansatz wurden  $1 \cdot 10^7$  Zellen geerntet (1000 g, 4 min, 4°C und zweimal mit kaltem, sterilem Elektroporationspuffer gewaschen. Das Pellet wurde in 800  $\mu\text{l}$  kaltem Elektroporationspuffer (10 mM  $\text{NaPO}_4$ , 50 mM Saccharose; pH 6,1) resuspendiert, in eine gut gekühlte 0,4 cm Elektroporationsküvette gefüllt und auf Eis gestellt. Anschließend wurden 40  $\mu\text{g}$  DNA zu der Zellsuspension gegeben und sofort wieder für 5 min auf Eis gestellt. Die Nachfolgende Elektroporation erfolgte in einem Elektroporationsgerät der Firma Eppendorf (Multiporator/Elektroporator 2510) bei einer eingestellten Spannung von 1300 V und einer Zeitkonstante von 5 ms.

Nach der Elektroporation wurde der Transformationsansatz zur Regeneration der Zellen 10 min auf Eis gestellt. Je 10 ml axenisches Medium wurden in Petrischalen (8 cm Durchmesser) mit 600  $\mu\text{M}$   $\text{InsP}_6$  pipettiert, nach der zehnmütigen Inkubation auf Eis 200  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension überführt, durch Schwenken verteilt und 24 h bei

22,5°C inkubiert. Einen Tag später wurden die Transformanten unter Selektionsdruck mit Blasticidin oder Geneticin gesetzt. Alle zwei Tage wurde das Medium mit den toten Zellen vorsichtig ausgetauscht. Nach ca. 10 Tagen waren resistente Klone zu sehen. Es wurden 12 unabhängige Klone überführt. Hierzu wurde mit einer 200 µl-Pipette die Zellen eines Klons vorsichtig vom Boden gelöst, mit ca. 100 µl Medium aufgesaugt und in eine Gewebekulturflasche (50 ml, 25 cm<sup>2</sup> Grundfläche) gegeben. Die gepickten Klone wurden kultiviert und anschließend überprüft.

### 2.2.3 Messung der Phagozytoserate

Der Phagozytostest erfolgte mit Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase. Die Zellen wurden geerntet (1000 g, 4°C, 10 min), dreimal mit Sörensen-Phosphatpuffer gewaschen und auf eine Zelldichte von  $2\cdot 5\cdot 10^6$  Zellen/ml resuspendiert. Die Zellen wurden 30 min vorinkubiert (22°C, 120 Upm) und anschließend carboxylierte Latexpartikel zugesetzt, so dass sich eine Relation von rund 500 Partikeln pro Zelle ergab. Zu definierten Zeitpunkten wurden die Phagozytose gestoppt, indem je 1 ml Zellsuspension in ein Reagenzglas mit 5 ml eiskaltem Sörensen-Phosphatpuffer pipettiert wurde. Um nicht internalisierte, an der Oberfläche der Zellen adsorbierte Partikel zu entfernen wurde die Zellsuspension anschließend durch 10 ml 20 %ige PEG-6000-Lösung zentrifugiert (4°C, 10 min, 2000 g). Das Zellpellet wurde zweimal mit eiskaltem Sörensen-Phosphatpuffer gewaschen (1000 g, 4°C, 5 min) und in 2 ml 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 9,3) resuspendiert. Nach Ermittlung der Zellzahl wurden die Zellen durch Zusatz von 20 µl 10 %igen (w/v) Triton X-100 lysiert. Die Proben wurden gründlich für die Bestimmung der optischen Dichte bei 570 nm durchmischt. Um die Anzahl internalisierter Partikel zu quantifizieren wurden für definierte Partikelkonzentrationen die optische Dichte gemessen und die entsprechende Kalibrierfunktion ermittelt.



### 2.2.4 Messung der Pinozytoserate

Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden geerntet (1000 g, 4°C, 5 min), zweimal mit eiskaltem Sörensen-Phosphatpuffer gewaschen und mit Sörensen-Phosphatpuffer auf eine Zelldichte zwischen  $2\cdot 5\cdot 10^6$  Zellen/ml resuspendiert. Nach einer 30 minütigen Vorinkubation (22,5°C, 120 Upm) wurde FITC-Dextran in einer Konzentration von 2 mg/ml den Zellen zugesetzt. Als Stocklösung diente eine Lösung von 100 mg/ml FITC-Dextran in Sörensen-Puffer. Die Zellsuspensionen wurden auf einem Rundschtüttler inkubiert (22,5°C, 120 Upm). Um den Verlauf der Pinozytose zu verfolgen, wurden zu definierten Zeitpunkten 1 ml Zellsuspension entnommen und mit eiskaltem Sörensen-Phosphatpuffer 1:5 verdünnt. Die Proben wurden zentrifugiert (1000 g, 4°C, 5 min) und dreimal mit eiskaltem Sörensen-Phosphatpuffer gewaschen. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und das Pellet in 2 ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 9,5) resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die restlichen Zellen durch Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  10 %igen (w/v) Triton X-100 und kräftiges Schütteln (Vortex) lysiert. Zur Vermeidung von Streueffekten erfolgte eine erneute Zentrifugation (5000 g, 4°C, 5 min). Die Fluoreszenz der Proben wurde bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm und eine Emissionswellenlänge von 520 nm gemessen (Spectrofluorimeter RF-510; Shimadzu). Die Quantifizierung der pinozytotisch aufgenommenen Flüssigkeitsmengen geschah durch Vergleich mit einer Kalibriergerade.

### 2.2.5 Adhäsionstest

Für den Adhäsionstest wurden axenisch wachsende Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase verwendet. Die Zellen wurden geerntet (1000 g, 4°C, 5 min), zweimal mit eiskaltem Sörensen-Phosphatpuffer gewaschen und mit FM-Medium auf eine Zelldichte von  $1,5\cdot 10^6$  Zellen/ml resuspendiert. 4 ml der Zellsuspension wurden in eine 50 ml Gewebekulturflasche überführt und die Zellen zunächst für ca. 10 min auf einem Rundschtüttler (120 Upm, 22,5°C) geschüttelt, anschließend 30 min ohne Schütteln inkubiert und danach erneut für 5 min (120 Upm, 22,5°C) geschüttelt. Durch Be-

stimmung der Zelldichte vor Überführung in die Gewebekulturflaschen (50 ml, 25 cm<sup>2</sup> Grundfläche), sowie nach Abschluss der Inkubation im Überstand, konnte der prozentuale Anteil adhäsiver Zellen bestimmt werden.

## **2.3 Proteinchemische Methoden**

### **2.3.1 Anreicherung der Inositolpentakisphosphat-(3/5)-Kinase**

Die säulenchromatographischen Anreicherungsschritte (außer Chromatographie an Hydroxylapatit und Superdex-200 HR; Raumtemperatur) wurden bei 8°C durchgeführt. Eine peristaltische Pumpe (Pharmacia peristaltic pump P1) diente der Probenauftragung und -elution. 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.

#### **2.3.1.1 Bestimmung der Inositolpentakisphosphat-(3/5)-Kinase-Aktivität**

Der Reaktionsansatz enthielt 50 µl Puffer (50 mM Tris/HCl; pH 7,5, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,66 mM CaCl<sub>2</sub>), 15 µl Enzymlösung, 4 mM ATP und 15 µM Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub>. Der Ansatz wurde bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde zu verschiedenen Zeitpunkten durch Zugabe von 80 µl 10 % TCA gestoppt. Die Abnahme von Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> wurde durch HPLC-MDD (saurer Elutionssystem s. Abschnitt 2.5) bestimmt. Dazu wurden die denaturierenden Proteine durch Zentrifugation (13000 g, 10 min, RT) abgetrennt, der Überstand mit Wasser auf 2 ml aufgefüllt und mit der HPLC-MDD analysiert.

#### **2.3.1.2 Chromatographie an Q-Sepharose fast flow**

2 l Zellsuspension (1·10<sup>7</sup> Zellen/ml) wurden nach 2.2.1.1 geerntet. Die Zellen wurden zweimal mit 50 mM Tris/HCl; pH 7,7 gewaschen und anschließend mit 50 mM Tris/HCl mit 10 % Glycerin; pH 7,7 auf eine Zelldichte von 2·10<sup>8</sup> Zellen/ml resuspendiert. Durch zweimaliges Einfrieren und Auftauen der Zellsuspension wurden die

Zellen aufgeschlossen. Das Lysat wurde nach mikroskopischer Kontrolle zentrifugiert (Beckman Ultrazentrifuge L7-55, Rotor 70Ti, 45000 Upm, 4°C, 30 min). Der zytosolische Überstand wurde abdekantiert, durch Glasswolle filtriert und unverdünnt mit einer Flussrate von 2 ml/min auf eine mit 50 mM Tris/HCl; pH 7,7 äquilibrierte Q-Sepharose-Säule (Säulenvolumen ca. 100 ml) aufgetragen. Eluiert wurde die InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase von der Q-Sepharose durch 50 mM NaCl in 50 mM Tris/HCl; pH 7,7. Die Flussrate betrug 2 ml/min. Anschließend wurde die Säule nach dem Gebrauch mit jeweils 5 Säulenvolumina 1M NaOH, 1M NaCl und 1M HCl regeneriert.

### **2.3.1.3 Chromatographie an Heparin-Agarose**

Die InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase-Präparation wurde nach der Chromatographie an der Q-Sepharose mit 1 mM MgCl<sub>2</sub> versetzt und mit einer Flussrate von 1 ml/ml auf eine mit 50 mM Tris/HCl pH 7,7, 50 mM NaCl und 1 mM MgCl<sub>2</sub> äquilibrierte Heparin-Agarose-Säule (Säulenvolumen ca. 10 ml) aufgetragen. Die InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase wurde von der Säule mit 50 mM Tris/HCl pH 7,7, 300 mM NaCl und 1 mM MgCl<sub>2</sub> eluiert. Die Flussrate betrug 0,8 ml/min. Die Säule wurde anschließend mit 50 mM Tris/HCl; pH 7,7, 500 mM NaCl und 1 mM MgCl<sub>2</sub> gespült. Die Säule wurde nach dem Gebrauch mit jeweils 5 bis 10 Säulenvolumina 0,5 NaCl in 100 mM Tris/HCl; pH 8,5 und 0,5 M NaCl; pH 4,5 regeneriert und anschließend neutral gewaschen.

### **2.3.1.4 Chromatographie an Hydroxylapatit**

Nach der Chromatographie an Heparin-Agarose wurde die InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase-Präparation mit Hilfe einer Centriprep-10 Ultrafiltrationseinheit (MW cut off 10 kDA, Millipore) auf das Minimalvolumen (ca. 1 ml) aufkonzentriert und mit einer HPLC-Anlage (s. Abschnitt 2.5, ohne Nachsäulenderivatisierung) auf eine mit 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,0 äquilibrierte Hydroxylapatitsäule (Bio-Rad Macro prep ceramic Hydroxylapatit 20 µm Säulenvolumen ca. 1 ml) mit einer Flussrate von 0,5 ml/min aufgetragen. Eluiert wurde die InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase durch einen Gradient von 10-500 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,0. Frak-

tionen à 0,5 ml wurden gesammelt und die  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase-Aktivität nach 2.3.1.1 bestimmt. Zum Regenerieren wurde die Hydroxylapatitsäule nach dem Gebrauch mit 500 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; pH 6,8, 400 mM  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ; pH 11-12 und anschließend mit Wasser gewaschen.

### 2.3.1.5 Gelfiltration an HPLC-Superdex-200 HR

Die aktivsten Hydroxylapatitfraktionen wurden auf ca. 0,2 ml konzentriert (Microcon YM-10; Amicon) und auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen. Als Material für die Gelfiltration diente Superdex-200 HR mit einem Trennbereich von 10-600 kDa. Die Säule (1 cm x 30 cm, Volumen ca. 24 ml) wurde durch die HPLC-Anlage (s. Abschnitt 2.5, ohne Nachsäulenderivatisierung) betrieben. Als Laufpuffer diente 40 mM Bis/Tris, 50 mM NaCl, 1 mM DTT; pH 7,0 bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. Fraktionen à 0,25 ml wurden gesammelt und die  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase-Aktivität nach 2.3.1.1 bestimmt. Die Kalibrierung erfolgte durch Standardproteine: Aldolase (158 kDa), Rinderserumalbumin (68 kDa), Ovalbumin (45 kDa),  $\alpha$ -Chymotrypsinogen (25 kDa) und Cytochrom C (12,5 kDa). Die Lagerung der Gelfiltrationssäule erfolgte unter 20 %-Ethanol.

### 2.3.1.6 SDS- und Nativgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde nach der von Laemmli beschriebenen Methode in einem Tris-Glycin-Puffersystem durchgeführt. Standardmäßig wurden 10-12 % Acrylamidgele verwendet. Als Apparatur diente eine Mini-Protein II Gelkammer (BioRad). Die aufzutrennenden Proteinlösungen wurden gegebenenfalls mit Microcon YM-10 aufkonzentriert, mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. In der Regel wurden 5  $\mu\text{g}$  Protein (bei einem maximalen Volumen von 25  $\mu\text{l}$ ) in jede Geltasche aufgetragen. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes wurde die relative Beweglichkeit der Protein-Banden mit der von Marker-Proteinen definierten Molekülmassen verglichen (SDS-Standard, low range, BioRad).

Die nativen Gelelektrophorese schloß sich an die Gelfiltration an. Es wurde im Ge-

gensatz zu der SDS-PAGE auf das SDS in den Gelen, Lauf- und Probenpuffer, auf das  $\beta$ -Mercaptoethanol in dem Probenpuffer sowie auf die Hitzedenaturierung verzichtet. Weiterhin wurde die Gelkammer auf Eis gestellt.

Die aktivsten Gelfiltrationsfraktionen wurden auf ca. 50  $\mu$ l konzentriert (s. Abschnitt 2.3.1.5). Das aufgetragene Volumen betrug 25  $\mu$ l pro Geltasche. Eine Gelbande wurde gefärbt (meist Silberfärbung aufgrund der geringeren Proteinkonzentration), während die anderen zur Extraktion des nativen Proteins, mit einem Skalpell in 3 mm Ausschnitte zerkleinert wurden. Jedes Gelstück wurde in ein Gelnebulizer (Millipore), der sich in einem Eppendorf-Röhrchen befand, überführt und abzentrifugiert (5000 g, 10 min, 4°C). Nach einem Zentrifugationsschritt wurden zu der im Eppendorf-Röhrchen homogenisierten Gelmasse 50  $\mu$ l 500 mM Tris/HCl; pH 7,7 zugesetzt und anschließend zur Diffusion der Proteinmoleküle aus dem Gel drei Stunden bei 22°C inkubiert. Die Probe wurde nach der Inkubationszeit wie oben erneut zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde den InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase Aktivität-Test durchgeführt, wobei hier die verwendete Pufferlösung sich aus 500 mM Tris/HCl; pH 7,5; 8 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,66 mM CaCl<sub>2</sub> zusammensetzte.

Tabelle 2.7: Zusammensetzung der Probenpuffer

<b>1 x SDS-Gelelektrophorese</b>		<b>1 x native Gelelektrophorese</b>	
Substanz	Konzentration	Substanz	Konzentration
Tris-HCl (pH 6,8)	62,5 mM	Tris-HCl (pH 6,8)	62,5 mM
Glycerin	25 %	Glycerin	40 %
SDS	2 %	Bromphenol blau	0,01 %
$\beta$ -Mercaptoethanol	5 %		
Bromphenol blau	0,01 %		

### 2.3.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung von Proben im Bereich von 0,2-2 mg/ml wurde mit dem kommerziellen BioRad Dc Protein Assay, das auf einer modifizierten Methode nach Lowry beruht, durchgeführt.

Für Proben bei der eine sehr geringere Proteinkonzentration vermutet wurde, wie z.B. nach der Gelfiltration und der nativen Gelelektrophorese, erfolgte die Proteinbestimmung nach der von Bradford beschriebenen Methode.

Als Alternative zur Bradford-Proteinbestimmung wurde das Micro BCA Protein Assay Kit der Firma Pierce verwendet. Dieses lieferte im Bereich von 2-20  $\mu\text{g/ml}$  akzeptable Ergebnisse.

Zur Erstellung einer Eichkurve wurden Standardlösungen von Rinderserumalbumin (BSA) in den entsprechenden Konzentrationsbereichen verwendet.

### 2.3.3 Proteinfärbung

Die SDS-PAGE Gele wurden in der Regel mit Coomassie eine Stunde gefärbt. Die anschließende Entfärbung mit Lösung I und II dauerte je eine Stunde. Für die Färbung nativer Gele und der SDS-Gele im Anschluss an der nativen Gelelektrophorese wurde die Silberfärbung gewählt. Der Vorteil dieser Methode liegt in ihrer Empfindlichkeit. So können noch ca. 50-100 pg Protein pro Bande nachgewiesen werden.

Tabelle 2.8: Zusammensetzung der Coomassie-Färbelösung

<b>Coomassie-Färbelösung</b>	
Substanz	Konzentration
Coomassie R-250	0,1 %
Methanol	45 %
Essigsäure	10 %

Tabelle 2.9: Zusammensetzung der Coomassie-Entfärbelösungen

<b>Coomassie-Entfärbelösungen</b>			
Lösung I		Lösung II	
Substanz	Konzentration	Substanz	Konzentration
Methanol	45 %	Methanol	5 %
Essigsäure	10 %	Essigsäure	7 %

Tabelle 2.10: Silberfärbungsprotokoll

Arbeitsschritte	Dauer
Fixieren: Lösung I	30 min
Fixieren: Lösung II	15 min
Waschen: Wasser	3 x 5 min
Reduktion: Lösung III	90 sec.
Waschen: Wasser	3 x 30 sec.
Färben: Lösung IV	25 min
Waschen: Wasser	2 x 1 min
Entwickeln: Lösung V	ca. 3-5 min
Abstoppen: Lösung VI	ca. 30 min
Aufbewahren in Wasser	

Tabelle 2.11: Zusammensetzung der Lösungen für die Silberfärbung

Lösungen für die Silberfärbung	Substanz	Konzentration
Lösung I	Ethanol	50 %
	Essigsäure	10 %
Lösung II	Ethanol	5 %
	Essigsäure	1 %
Lösung III	Natriumthiosulfat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	0,2 g/l
	Lösung wurde frisch hergestellt	
Lösung IV	Silbernitrat ( $\text{AgNO}_3$ )	0,2 g /100 ml
	Formalaldehyd (37 %)	75 $\mu\text{l}$ /100 ml
	Lösung wurde im Dunkel aufbewahrt	
Lösung V	Lösung III	2 ml /100 ml
	Formalaldehyd (37 %)	75 $\mu\text{l}$ /100 ml
	Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	6 g/100 ml
Lösung VI	Essigsäure	6 %

## 2.4 Sequenzierung der Inositolpentakisphosphat-(3/5)-Kinase

Nach der Gelfiltration wurden die aktivsten Fraktionen vereinigt und aufkonzentriert. Die Trennung der Proteine erfolgte durch SDS-PAGE. Das Gel wurde mit Coomas-

sie gefärbt und anschließend die Bande der  $\text{InsP}_5\text{-(3/5)}$ -Kinase knapp aus dem Gel ausgeschnitten. Der Gelspot wurde weiter zerkleinert und in ein 0,5ml silikonisiertes Eppendorf-Röhrchen überführt. Zur Entfärbung wurde mit 100  $\mu\text{l}$  25 mM Ammoniumcarbonatpuffer; pH 8 / 50 % Acetonitril 10 min geschüttelt. Der Überstand wurde verworfen und dieser Waschschrift viermal wiederholt, bis die Gelstücke vollständig entfärbt wurden. Vor dem „In-Gel-Verdau“ wurden sie zum dehydratisieren einmal mit 100 % Acetonitril gewaschen und 30 min in einer Vakuum-Zentrifuge getrocknet. Für den „In-Gel-Verdau“ der  $\text{InsP}_5\text{-(3/5)}$ -Kinase wurden die Gelstücke in (10-20  $\mu\text{l}$ ) in einer frisch hergestellten Trypsinlösung ( 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in kaltem 25 mM Ammoniumcarbonat-Puffer; pH 8) rehydratisiert. Vor der Inkubation wurde der Überschuss an Flüssigkeit entfernt, um die Autoproteolyse des Trypsins zu minimieren. Die rehydratisierten Gelstücke wurden mit 25 mM Ammoniumcarbonatpuffer pH 8 überschichtet und 16 h bei 37°C inkubiert. Nach dem tryptischen Verdau wurden die entstandenen Peptide der  $\text{InsP}_5\text{-(3/5)}$ -Kinase aus den Gelstücken eluiert (Tabelle 2.12), in der Vakuumzentrifuge bis zur Trockne eingengt und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Tabelle 2.12: Protokoll zur Elution der Peptide nach dem tryptischen Verdau

Arbeitsschritte	Dauer
1. Extraktion mit 30 $\mu\text{l}$ bidestilliertes Wasser Vortexen und Ultraschallbad	je 5 min
2. Extraktion mit 30 $\mu\text{l}$ 5 % Ameisensäure/50 % Acetonitril Vortexen und Ultraschallbad	je 5 min
3. Schritt 2. wiederholen	
4. Extraktion mit 100 % Acetonitril Vortexen und Ultraschallbad	je 5 min

Bei der Nanoelektrosprayionisation werden sehr feine Kapillare verwendet. Salze, insbesondere Kationen und Pufferkomponenten in den Proben, beeinflussen zum einem stark die Auflösung der Spektren und führen zum anderen dazu, dass diese Kapillaren durch Kristallbildung sehr schnell verstopft werden. Deshalb wurden die Peptide aus dem proteolytischen Verdau vor der Aufnahme der ESI-Spektren mit ZipTip $_{\mu\text{C}18}$  (Eppendorf) aufgereinigt, entsalzt und aufkonzentriert. Dazu wurde das Peptidgemisch in



1 % Ameisensäure/4 % Methanol aufgenommen und auf das entsprechend vorbereitete Säulenmaterial gebunden und dreimal mit 6  $\mu$ l 1 % Ameisensäure/4 % Methanol gewaschen. Eluiert wurde das Peptidgemisch mit 10  $\mu$ l 1 % Ameisensäure/60 % Methanol.

Die Aufnahme der Spektren 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 1, Applied Biosystems MDS Sciex) mit einer Nanoelektrospray-Ionenquelle (Protana) aufgenommen. Ausgewählte Peptide wurden im Tandemmassenspektrometriemodus analysiert. Die aus der Fragmentierung durch niederenergetische Stöße erhaltenen Spektren wurden teilweise *de novo* sequenziert. Die ermittelten Peptidsequenzen wurden dazu verwendet Datenbanken mit Hilfe der BLAST- und T BLAST-Programme zu durchsuchen.

## 2.5 Isolierung und Analytik von Inositolphosphaten

### 2.5.1 Isolierung von Inositolphosphaten

Die Zellen ( $1 \cdot 10^9$ ) wurden nach Bestimmung der Zelldichte geerntet und zwei bis dreimal mit eiskühlem 20 mM Mes/Na<sup>+</sup>-Puffer; pH 6,5 gewaschen. Das Feuchtgewicht des Pellets wurde bestimmt und die Zellen bei -80°C eingefroren. Zum Aufschluss wurde das gefrorene Zellmaterial mit 1,5 Teile v/w eiskalter 2 M HClO<sub>4</sub> bezogen auf das Feuchtgewicht des Pellets versetzt. Des Weiteren wurde 1/10 des Perchlorsäurevolumens an 100 mM EDTA (pH 6) und 1/100 an 100 mM NaF hinzugesetzt. Durch mehrmaliges Vortexen wurden die Zellen lysiert und das denaturierte Material abgetrennt (6000 Upm, 5 min, 4°C). Alle nun folgende Arbeitsschritte erfolgten unter Eiskühlung. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und in ein 50 ml Zentrifugationsrohr überführt. Zur Neutralisation des Überstandes wurde eine Lösung von 1,5 M KOH in 60 mM Bis-Tris verwendet, der man kurz vor Gebrauch 3 Tropfen Universal-

Indikator (pH 4-10, Merck) je 5 ml Volumen zusetzte. Im pH-Bereich zwischen 5 und 6 schlägt die Farbe von rosa/orange nach gelb/grün um. Die Puffer-Substanz Bis-Tris verhinderte einen zu schnellen pH-Drift. Bei der Zugabe sorgte man durch Rühren mit der Pipettenspitze für eine gründliche Durchmischung. Nach 20 min Inkubation wurde das präzipitierte  $\text{KClO}_4$  abzentrifugiert (6000 Upm, 5 min, 4°C), der Überstand entnommen und in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Der Überstand wurde mit 500  $\mu\text{l}$  Aktivkohlesuspension (20 % (w/v) Norit A (Sigma)), 100 mM NaCl, 50 mM Natriumacetat, pH 4) versetzt und 15 min bei 4°C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. In diesem Schritt wurden neben Nukleotiden auch der (die) Farbstoff(e) des Indikators abgetrennt. Die Aktivkohle wurde abzentrifugiert (6000 Upm, 5 min, 4°C), der Überstand in einem sauberen 50 ml Zentrifugationsröhrchen gesammelt und gefriergetrocknet. Die getrockneten Proben wurden entweder bis zur Durchführung der Analyse bei -20°C gelagert oder in 1 ml bidestilliertem Wasser aufgenommen und zur HPLC-MDD Analytik eingesetzt.

### 2.5.2 HPLC-MDD-Analytik von Inositolphosphaten

Inositolphosphate besitzen keine chromophore Gruppen und sind daher nicht direkt photometrisch nachweisbar. Zur Detektion der Inositolphosphate wurde daher ein von G. W. Mayr entwickeltes, als HPLC-MDD (HPLC-Metal-Dye-Detection) bezeichnetes Verfahren zur Nachsäulenderivatisierung eingesetzt [85, 86]. Der gelb gefärbte Indikator Pyridazolazoresorcin (PAR) bildet im alkalischen pH mit  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen einen intensiv orangerot gefärbten Komplex. Die stark komplexierenden Inositolphosphate verdrängen den Indikator aus dem Komplex und bilden mit den  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen einen farblosen Komplex. Dies führt zu einer Farbverschiebung von orangerot nach gelb, die als Extinktionsabnahme bei 546 nm verfolgt werden kann. Durch Invertierung der Signale am Integrator werden im Chromatogramm positive Peaks erhalten. Die Abbildung 2.1 zeigt den schematischen Aufbau der HPLC-MDD-Anlage. Die entsprechend vorbereiteten Proben wurden über Autosampler mit einer 1 ml Probenschleife auf die an der

HPLC angeschlossenen Anionenaustauschersäule aufgetragen. Die an dem Säulenmaterial gebundenen Inositolphosphate wurden mit einem für das Trennproblem optimierten pH- und Ionenstärkegradienten (saueres System) eluiert. Der Gradient wurde aus den Lösungen A und B mit Hilfe eines Gradientenmischers erzeugt. Zum Nachweis von UV-absorbierenden Substanzen, wie z.B. Nukleotiden, passierte das Eluat zunächst ein Photometer (Wellenlänge ( $\lambda$ ) = 254 nm). Über eine Mischschleife wurde dem PAR-Reagenz zugesetzt. Die Extinktion des Gemisches wurde dann mit einem zweiten Photometer (Wellenlänge ( $\lambda$ ) = 546 nm) gemessen. Durch Vergleich der Chromatogramme beider Photometer konnten Nukleotiden, die ebenfalls eine Extinktionsänderung des PAR-Reagenzes bewirken, von Inositolphosphaten unterschieden werden. Die Chromatogramme wurden mit dem EZChrom (V 6.1 Scientific Software) dargestellt und ausgewertet.

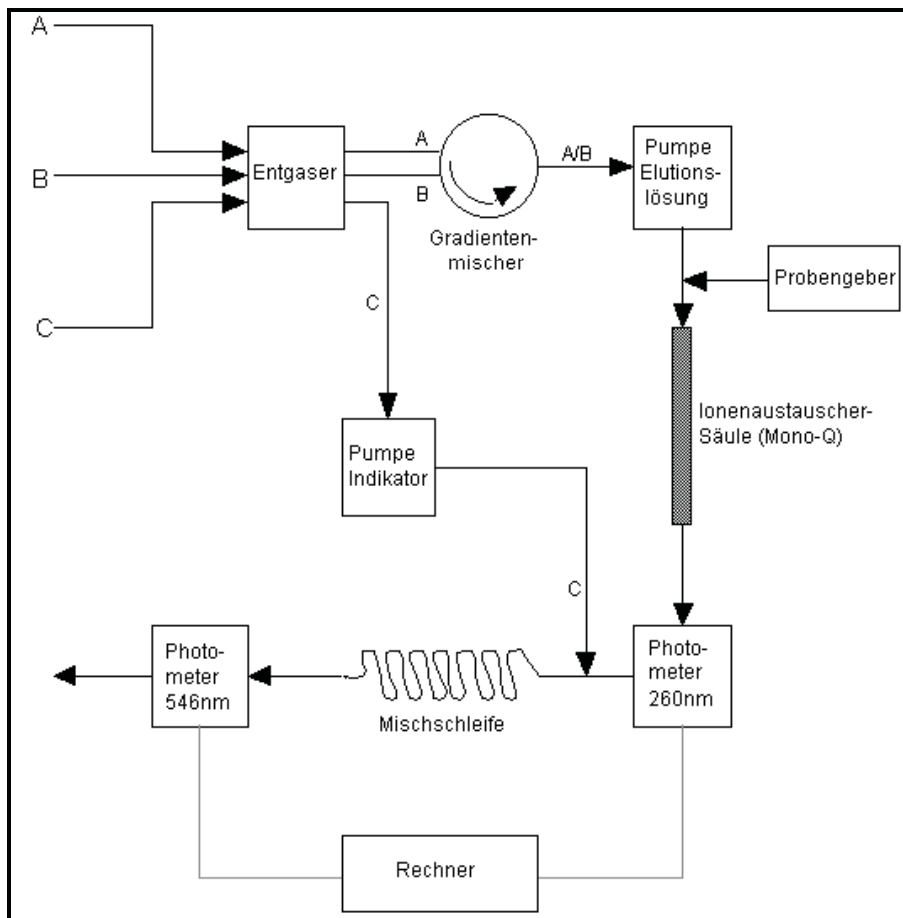


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau der HPLC-MDD-Anlage

Tabelle 2.13: Geräte der HPLC-Anlage

Komponente	Hersteller/Modell
Entgaser	Uniflows Degasys DG1310
Gradientenmischer	Pharmacia LKB Low-Pressure-Mixer
Controller	Pharmacia LKB LC 2252
Eluentenpumpe	Pharmacia LKB HPLC Pump 2248 Flußrate: 1,50 ml/min
Autosampler	Marathon
Säulen	Vorsäule: Pharmacia Resource Q HR 5/5 Trennsäule: Pharmacia Mono Q HR 10/10
Photometer I	Pharmacia LKB VWM 2141, $\lambda = 254$ nm
Reagenzienpumpe	Pharmacia LKB HPLC Pump 2248 Flußrate: 0,75 ml/min
Photometer II	Pharmacia LKB VWM 2141, $\lambda = 546$ nm

In dieser Arbeit wurde ein kombinierter pH- und Chlorid-Gradienten (Tabelle 2.14) verwendet. Dieser ermöglicht die Trennung von Inositolphosphaten mit Phosphorylierungsgraden von drei bis acht.

Tabelle 2.14: Elutionslösungen für die Analyse von Inositolphosphaten. Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde die Inositolphosphate in 10 min mit einem Gradienten von 30-100 % B eluiert. Inositolphosphat-Gemische wurden mit folgendem Gradienten analysiert: 0 min, 75 % B; 15 min, 100 % B; 60 min, 100 % B.

Lösungen	Zusammensetzung
Lösung A	0,2 mM HCl in bidest. Wasser
Lösung B	0,5 M HCl in bidest. Wasser
Lösung C (PAR-Reagenz)	2 M Tris/HCl (pH 9,1) 200 $\mu$ M PAR 30 $\mu$ M YCl <sub>3</sub> 10 % (v/v) Methanol in bidest. Wasser

## 2.6 Bestimmung des intrazellulären *myo*-Inositolgehalts

Die Zellen wurden wie unter 2.5.1 beschrieben durch Perchlorsäure aufgeschlossen und mit Aktivkohle behandelt. Unmittelbar vor der Bestimmung des intrazellulären

*myo*-Inositolgehalt wurden die Proben durch Mischbettaustauscher Amberlite MB-3 entsalzt. Aliquots wurden anschließend für die Quantifizierung von *myo*-Inositol verwendet. Diese erfolgte nach der von Fischbach et al. [14] beschriebenen Methode.

## 2.7 Molekularbiologische Methoden

### 2.7.1 Isolierung von chromosomaler und Plasmid-DNA

Genomische DNA aus *D. discoideum* wurde mit dem DNeasy-Plant Maxi-Kit von QIAGEN entsprechend dem Hersteller-Protokoll isoliert. Pro Aufreinigungssäule erhielt man aus  $4 \cdot 10^8$  Zellen ca.  $50 \mu\text{g}$  genomischer DNA.

Die Isolierung von Plasmid aus *E. coli* erfolgte nach Herstellerangaben mit QIAprep Spin Miniprep Kit für kleinere Volumina und mit QIAprep Spin Maxiprep Kit für große Volumina. Bei beiden Präparationsmethoden wurde hochreine DNA mit Hilfe chromatographischer Methoden gewonnen. Die DNA wurde mit 10 mM Tris-HCl; pH 8,5 eluiert.

Die Konzentration der DNA-Proben wurde spektralphotometrisch bei 260 nm ermittelt. Eine  $\text{OD}_{260\text{nm}}$  von 1 entspricht etwa  $50 \mu\text{g/ml}$  dsDNA. Der Reinheitsgrad der Proben wurde durch Bestimmung des Quotienten  $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$  ermittelt. Ist dieser Quotient größer als 1,8 kann von einer sauberen Probe ausgegangen werden. Zusätzlich wurde die Konzentration durch Vergleich mit DNA-Proben bekannter Konzentration in der Agarosegelelektrophorese abgeschätzt.

### 2.7.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction, abgekürzt PCR) wurde in einem programmierbaren „TPersonal-Thermocycler“ (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die für die Amplifizierung des jeweiligen DNA-Abschnitts geeigneten Primerpaare und deren Hybridisierungstemperatur wurden mit dem Programm Primer-Master Version 1.0 [87] berechnet.

Für die PCR wurde das HotStar Taq Master Mix Kit von QIAGEN entsprechend dem Herstellerprotokoll verwendet. Des Weiteren wurden 1-300 ng Template DNA oder 1-5 ng Plasmid DNA und 1,2  $\mu\text{M}$  je Primer zugesetzt. Das Standard-PCR Programm umfasste folgende Schritte.

Tabelle 2.15: PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit	Beschreibung
1	95°C	15 min	Aktivierung der Taq-DNA-Polymerase Denaturierung
2	95°C	1 min	30 Zyklen Denaturierung
3	50°C	1 min	
4	74°C	2 min/1000 bp	
5	74°C	10 min	Amplifikation

### 2.7.3 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen

Der Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte jeweils in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem und unter den angegebenen Temperaturbedingungen. Der Reaktionsansatz setzte sich standardmäßig aus folgenden Komponenten zusammen:

- Analytischer Restriktionsverdau
  - x  $\mu\text{l}$  DNA (bis zu 2  $\mu\text{g}$ )
  - 2  $\mu\text{l}$  10 x Inkubationspuffer
  - x  $\mu\text{l}$  Restriktionsendonuklease(n) (1-5 U)
  - H<sub>2</sub>O ad 20  $\mu\text{l}$
  
- Präparativer Restriktionsverdau
  - x  $\mu\text{l}$  DNA (bis zu 50  $\mu\text{g}$ )
  - 50  $\mu\text{l}$  10 x Inkubationspuffer
  - x  $\mu\text{l}$  Restriktionsendonuklease(n) (50-100 U)
  - H<sub>2</sub>O ad 20  $\mu\text{l}$

Definiert ist 1 U eines Enzyms als die Aktivität, die 1  $\mu\text{g}$  DNA in 1 h bei 37°C spaltet. Der analytische Restriktionsverdau wurde mindestens 1 h und der präparative über

Nacht bei der für das Enzym spezifischen Temperatur inkubiert. Die Überprüfung der vollständigen Spaltung erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (s. Abschnitt 2.7.4). Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch zehnmütiges Erhitzen auf 65°C bzw. durch Zusatz von EDTA.

### 2.7.4 Agarose-Elektrophorese von DNA

Die DNA-Fragmente wurden wie von Sambrook et al. [88] beschrieben, durch horizontale, submerse Agarosegelelektrophorese mit 5-10 V/cm Laufstrecke in TAE-Puffer (50 x TAE-Puffer: 2 M Tris, 1 M Essigsäure, 100 mM EDTA, gegebenenfalls mit konzentrierter Essigsäure auf pH 8,3 einstellen) aufgetrennt. Die Agarosekonzentration wurde dabei dem jeweiligen Trennproblem angepasst. Vor der Elektrophorese wurde der DNA-Lösung 1/6 Volumenteile Auftragungspuffer zugesetzt. Zur Detektion der DNA-Fragmente unter UV-Licht (366 nm) enthielten Agarose und Laufpuffer (0,1 µg/ml) Ethidiumbromid.

Tabelle 2.16: Zusammensetzung des DNA-Lauf- und des 6xDNA-Auftragungspuffers

DNA-Laufpuffer		6xDNA-Auftragungspuffer	
Substanz	Konzentration	Substanz	Konzentration
Ethidiumbromid (Stocklösung: 10 mg/ 10 ml)	0,1 µg/ml	Bromphenol Blau	0,25 %
50xTAE-Puffer	20 ml	Xylen Cyanol	0,25 %
H <sub>2</sub> O ad 1 l		Glycerin in H <sub>2</sub> O	30 %

### 2.7.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die zu isolierenden DNA-Fragmente wurden in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde im UV-Licht betrachtet und das entsprechende Fragment mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel geschnitten. Das Gelstück wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Isolierung erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Die DNA wurde mit einem Volumen



von 30  $\mu\text{l}$  eluiert. Zur Kontrolle wurde anschließend eine Probe auf ein Gel aufgetragen.

## 2.7.6 Reinigung und Konzentrierung von DNA

Die Reinigung und Konzentrierung von DNA erfolgte mit QIAquick PCR Purification Kit entsprechend dem mitgelieferten Protokoll. Die DNA wurde mittels 50  $\mu\text{l}$  TE-Puffer (10 mM Tris/HCl; pH 8,5) eluiert. Diese Methode diente der Reinigung von PCR-Produkten, wurde aber auch zur Reinigung präparativer Restriktionen eingesetzt.

## 2.7.7 Enzymatische Modifizierung von DNA

### 2.7.7.1 Phosphatase Behandlung

Um die Religation des linearisierten Vektors zu unterbinden wurden die 5'-Ende Phosphatgruppen mit der alkalischen Phosphatase aus Shrimps entfernt.

Der Dephosphorylierungsansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- 1  $\mu\text{g}$  linearisierte Vektor-DNA
- 7  $\mu\text{l}$  10 x Puffer
- 10 U alkalische Phosphate (Shrimps)
- $\text{H}_2\text{O}$  ad 70  $\mu\text{l}$

Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 65°C (15 min) gestoppt und der linearisierte und dephosphorylierte Vektor anschließend nach 2.7.6 aufgereinigt.

### 2.7.7.2 Überführung überstehender Enden in glatte Enden

Viele Restriktionsenzyme erzeugen kohäsive Enden mit einem 5'- oder 3'-überstehenden Ende. Mit Hilfe der 5'  $\rightarrow$  3' Polymeraseaktivität des Klenow-Fragments der *E. coli*

DNA-Polymerase I können 5' überstehende Enden aufgefüllt werden. 3'-überhängende Enden geschnittener DNA können mit Hilfe der 3' → 5' Exonukleaseaktivität der T<sub>4</sub>-DNA-Polymerase (T<sub>4</sub> ist ein *E. coli* Bakteriophage) abgebaut und nach Zugabe von Nukleotiden mit Hilfe ihrer 5' → 3' Polymeraseaktivität wieder zu glatten Enden aufgefüllt werden.

Um 5'-überstehende Enden aufzufüllen, wurden ca. 1 µg DNA mit 2 µl 2 mM dNTP, 5 µl 10 fach Puffer des Enzymherstellers und 2 U Klenow-Fragment versetzt, und auf 50 µl mit Wasser aufgefüllt. Nach der Inkubation für 30 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Hitzedenaturierung bei 70°C für 10 min gestoppt. Die Aufreinigung der DNA erfolgte nach 2.7.6.

Zur Entfernung von 3'-überhängenden Enden wurden ca. 1 µg DNA mit 14 µl 5 fach Puffer des Enzymherstellers und 5 U T<sub>4</sub>-DNA-Polymerase versetzt, auf 46 µl mit Wasser aufgefüllt und 2 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hitzedenaturierung bei 70°C für 10 min gestoppt. Die Aufreinigung der DNA erfolgte nach 2.7.6.

### 2.7.8 DNA-Ligation

DNA-Fragmente und linearisierte Vektor-DNA wurden mit Hilfe der T<sub>4</sub>-DNA-Ligase verknüpft. Das molare Vektor/Insert-Verhältnis wurde der Problemstellung, d.h. Ligation mit kohäsiven oder mit glatten Enden, der Größe des zu klonierenden Fragmentes und des Vektors angepasst. Es wurde meist ein molares Vektor/Insert-Verhältnis von 1:4 eingesetzt. Bei der Klonierung sehr kleiner Fragmente wurde das Verhältnis auf 1:10 erhöht. Ein typischer Reaktionsansatz wurde in einem Volumen von 20 µl durchgeführt, der ca. 50-100 ng Vektor-DNA, 2 µl 10 fach Puffer des Enzymherstellers, 5 U T<sub>4</sub>-DNA-Ligase, 2 µl 50 % PEG-Lösung und eine entsprechende Menge Insert-DNA enthielt. Die Ligation von kohäsiven Enden erfolgte mindestens 90 min bei 10-14°C und die der glatten Enden 2 h bei 22°C oder über Nacht bei 14-16°C.

Gute Ergebnisse bei der Ligation von glatten Enden wurden auch mit dem Rapid-DNA Ligation Kit (Roche) gemäß den Empfehlungen des Herstellers erzielt. Mit dieser Va-

riante konnte innerhalb kürzester Zeit die Ligation stattfinden. Die für die Ligation verwendeten Vektoren wurden stets dephosphoryliert eingesetzt. Nach der Ligation wurde der Ansatz nach 2.7.9 in DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert.

### 2.7.9 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

***E. coli* DH5 $\alpha$ -Genotyp:** F<sup>-</sup>, supE44,  $\Delta$ lacU169,  $\varphi$ 80d, lacZ $\Delta$ M15, recA1, gyr A69, thi-1 [89]

Die Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach Inoue [90]. Aliquots von je 200  $\mu$ l wurden entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und 1-10  $\mu$ l DNA oder die Hälfte des Ligationsansatzes zupipettiert und vorsichtig gemischt. Nach einer dreißigminütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 30 s einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und dann sofort wieder auf Eis gekühlt. Anschliessend wurden 800  $\mu$ l SOC-Medium zugesetzt und 1 h bei 37°C inkubiert.

Tabelle 2.17: Zusammensetzung des SOC-Mediums

Substanz	Konzentration
Bacto-Trypton	2 %
Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	10 mM
Nach dem Autoklavieren; (16 min bei 120°C)	
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
Glucose	20 mM

Aliquots der Zellsuspension wurden auf selektive LB-Agarplatten (z.B. 100  $\mu$ g/ml Ampicillin) ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C bebrütet.

Tabelle 2.18: Zusammensetzung der Medien für die Kultur von Bakterien-Stämmen.

Die Medien wurden 16 min bei 120°C autoklaviert.

<b>LB-Medium</b>		<b>KB-Medium</b>	
Substanz	Konzentration	Substanz	Konzentration
Fleischpepton	10 g/l	Fleischpepton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l	Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l	NaCl	10 g/l
Einstellung auf pH 7,0		Glucose	10 g/l
<b>LB-Agar</b>			
Substanz	Konzentration		
Fleischpepton	10 g/l		
Hefeextrakt	5 g/l		
NaCl	10 g/l		
Agar	15 g/l		
Einstellung auf pH 7,0			

---

## Ergebnisse und Diskussion

---

### 3.1 Aufreinigung der Inositolpentakisphosphat-(3/5)-Kinase

Die Optimierung des Anreicherungsverfahrens der Inositolpentakisphosphat-(3/5)-Kinase stellte das erste Ziel der vorliegenden Arbeit dar. Wie bereits unter 1.3.1 erwähnt, katalysiert dieses Enzym die ATP-abhängige Synthese von  $\text{InsP}_6$  aus Inositol(1,2,4,5,6)- und Inositol(1,2,3,4,6)pentakisphosphat (Abb. 3.1).

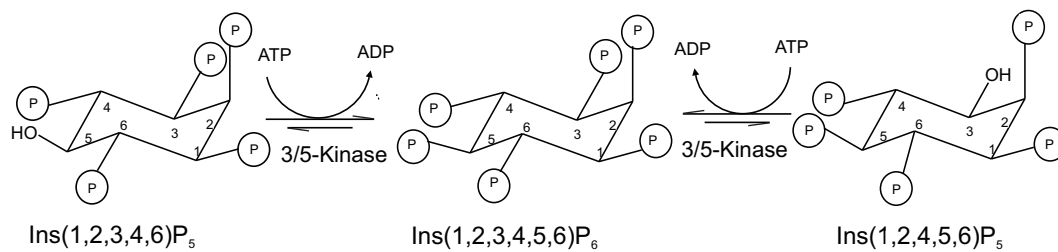


Abbildung 3.1: katalysierte Reaktion der Inositolpentakisphosphat-(3/5)-Kinase

Die Inositolpentakisphosphat-(3/5)-Kinase ist ebenfalls in der Lage Inositol-tetrakisphosphate zu phosphorylieren.  $\text{Ins}(1,2,4,5)\text{P}_4$  und  $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$  werden zu  $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$  bzw.  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  umgesetzt.

Eine Methode zur partiellen Aufreinigung der Inositolpentakisphosphat-(3/5)-Kinase aus dem Zytosol von *D. discoideum* Zellen wurde bereits etabliert [29]. Für die im Rahmen dieser Arbeit vorgesehene Sequenzierung der Inositolpentakisphosphat-(3/5)-Kinase mußte versucht werden das Enzym bis zur Homogenität aufzureinigen. Hierzu wurde das bestehende Protokoll zur Proteinaufreinigung um einen Schritt erweitert. Die anschließende genauere Identifizierung der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase-Proteinbande sollte dazu dienen, die Fehlerquote bei der massenspektrometrischen Proteinsequenzierung und den anschließenden Datenbankrecherchen zu minimieren.

### 3.1.1 Gelfiltrations-Chromatographie

Zu Beginn wurde wie bereits dokumentiert [29] eine Ionenaustausch-, Heparin-Agarose- und Hydroxylapatit-Chromatographie durchgeführt. Die aktivsten Hydroxylapatit-Fractionen wurden zusätzlich einer Gelfiltrations-Chromatographie unterworfen (Abb. 3.2), wodurch sich eine weitere 6-fache Anreicherung der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase-Aktivität erzielen ließ. Diese Anreicherung der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase ist jedoch mit hohen Verlusten verbunden. Die Ausbeute, bezogen auf den zytosolischen Extrakt, betrug nur noch 5%. Für die im nachfolgenden Abschnitt 3.1.2 beschriebene Identifizierung der Proteinbande wurde deshalb, um ausreichendes Material zu erhalten, die Gelfiltrations-Chromatographie mit vier Hydroxylapatit-Enzympräparationen durchgeführt und die aktivsten Fraktionen vereinigt.

Die Gelfiltration ergab nach Vergleich mit Standardproteinen ein Molekulargewicht von etwa 37 kDa für die native  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase.

### KAPITEL 3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

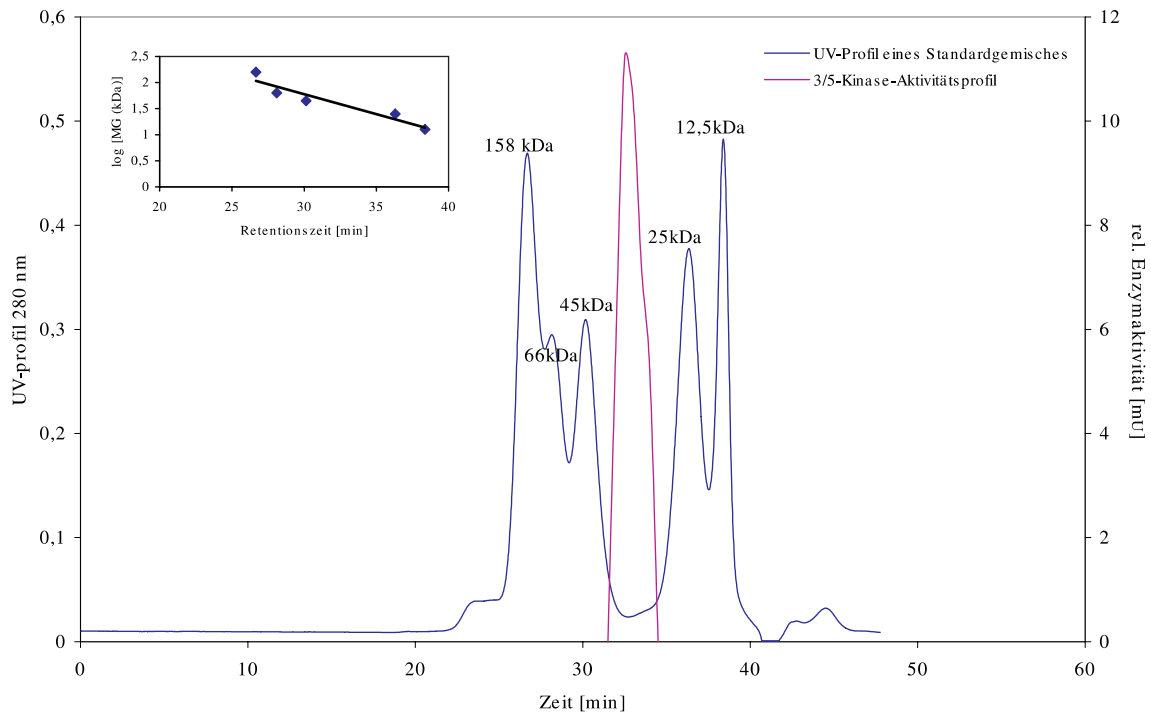


Abbildung 3.2: Elutionsprofil einer repräsentativen Gelfiltration (Superdex 200-HR; 1 cm x 30 cm). Oben links eingesetzt: Kalibriergerade der Gelfiltration mit Standardproteinen

In der Tabelle 3.1 ist eine repräsentative Zusammenfassung der Anreicherung der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase wiedergegeben. Die Abbildung 3.3 zeigt das dazu gehörige Elektropherogramm. In der Präparation nach der Hydroxylapatit-Chromatographie findet man noch eine große Menge an Begleitproteinen. Nach der Trennung an Superdex-200 werden wenige scharfe Banden in der SDS-PAGE nachgewiesen. Dennoch lässt sich die Bande der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase noch nicht eindeutig identifizieren.

Tabelle 3.1: Anreicherungstabelle, Zusammenfassung der partiellen Aufreinigung der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase

Reinigungsschritt	Proteinmenge [mg]	spezifische Aktivität [mU/mg]	Gesamtaktivität [mU]	Ausbeute [%]	Anreicherungs-faktor
Zytosol $2 \times 10^{10}$ Zellen	912	1,2	1026	100	1
Q-Sepharose	113	7,5	840	82	7
Heparin-Agarose	19,5	24	462	45	20
Hydroxylapatit	0,45	278	125	12	232
Gelfiltration	0,036	1567	57	5	1306

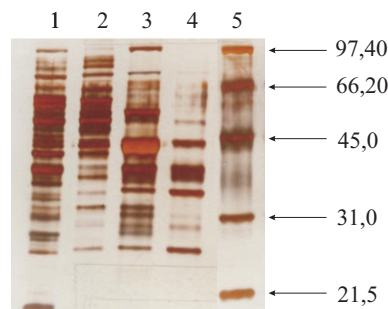


Abbildung 3.3: SDS-PAGE (12 %, Silber-Färbung)

- 1- Anionenaustausch an Q-Sepharose
- 2- Chromatographie an Heparin
- 3- Chromatographie an Hydroxylapatit
- 4- Gelfiltration an Superdex-200
- 5- Molekulargewichtsmarker

### 3.1.2 Identifizierung der $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase-Proteinbande

Enzymaktivitätstests im Anschluss einer SDS-Gelelektrophorese können bei monomeren Proteinen angewendet werden, um den Ursprung einer katalytischen Aktivität innerhalb eines heterogenen Proteingemischs zu ermitteln. Dies setzt die erfolgreiche Renaturierung des betroffenen Proteins nach der Gelelektrophorese voraus. Die



Regenerierung der Enzymaktivität mehrerer Proteinphosphatasen und Proteinkinasen aus verschiedenen Organismen nach der SDS-Gelelektrophorese wurde bereits beschrieben [91]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode bei der Identifizierung der zu der  $\text{InsP}_5\text{-(3/5)}$ -Kinase gehörenden Proteinbande angewendet. Eine SDS-Gelelektrophorese wurde mit den aktivsten Fraktionen aus der Gelfiltration durchgeführt. Der anschließende Versuch zur Renaturierung blieb jedoch erfolglos. Um die Renaturierung der  $\text{InsP}_5\text{-(3/5)}$ -Kinase im Anschluss an die Gelelektrophorese zu umgehen, wurde als Alternative zur SDS-PAGE eine Trennung unter nativen Bedingungen ausgewählt.

Die Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen kann auch zur Reinigung von Proteinen anstelle von oder zusätzlich zu chromatographischen Methoden eingesetzt werden. Im Gegensatz zu der SDS-PAGE, bei der Proteine nur anhand ihrer Größe aufgetrennt werden, erfolgt bei der nativen Gelelektrophorese eine Trennung nach der Ladung, Größe und Form des Proteins. Die meisten Proteine sind in dem verwendeten schwach alkalischen Laufpuffer (pH 8-9) negativ geladen und wandern zur Anode. Alle unter diesen Bedingungen positiv geladenen Proteine gelangen nicht in das Gel sondern diffundieren in den Kathodenpuffer.

Die native Gelelektrophorese wurde mit den aktivsten Gelfiltrations-Fraktionen durchgeführt. Von den drei benachbarten Gelspuren mit aufgetragenen identischen Proteinmengen wurden zwei, zur Extraktion des nativen Proteins, in 3mm Abschnitte zerkleinert. Bei dem anschließenden Enzymaktivitätstest ließ sich die  $\text{InsP}_5\text{-(3/5)}$ -Kinase Aktivität nur in den Fraktionen 6 und 7 wiederfinden. Diese Aktivität korreliert mit der obersten Proteinbande auf der vergleichbaren angefärbten dritten Gelspur (Abb. 3.4). Unter nativen Bedingungen sind nach der Anfärbung keine scharfen Proteinbanden zu sehen. Dies ist bei dieser Trennmethode jedoch ein häufig beobachtetes Phänomen. Meist wandern die Proteine aufgrund ihres isoelektrischen Punktes nur sehr langsam in das native Gelsystem ein.

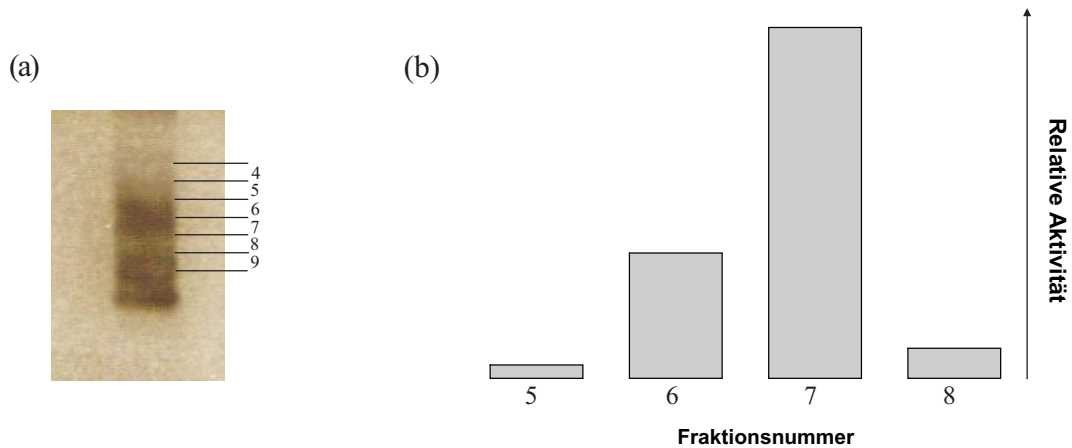


Abbildung 3.4: (a) native Gelelektrophorese (10 %, Silberfärbung) der aktivsten Gelfiltrations-Fractionen.

(b) Aktivitätsvergleich der aus (a) isolierten Fractionen

Die Abbildung 3.5 zeigt das Silber-gefärbte SDS-Gel nach der nativen Gelelektrophorese. Von den beiden aufgetragenen Fractionen 6 und 7 der nativen Gelelektrophorese ließ sich unter denaturierenden, reduzierenden Bedingungen nur bei der aktivsten Fraktion 7 eine gut erkennbare 34 kDa Proteinbande nachweisen. Dieses Molekulargewicht stimmt im Rahmen der Fehlergrenzen mit dem von 37 kDa der  $\text{InsP}_5\text{-(3/5)}$ -Kinase überein, wie es bei der Gelfiltration ermittelt wurde. Daher handelt es sich bei der  $\text{InsP}_5\text{-(3/5)}$ -Kinase um ein monomeres Enzym.

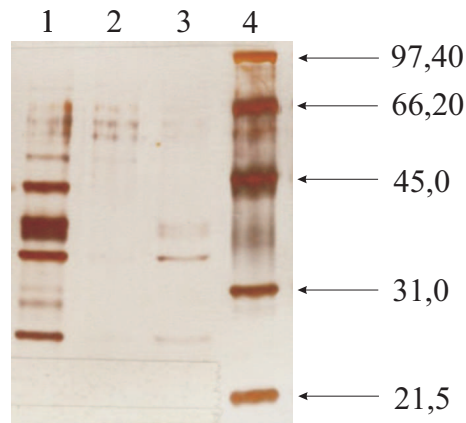


Abbildung 3.5: SDS-PAGE nach der nativen Gelelektrophorese (12 %, Silberfärbung)

- 1- Gelfiltration an Superdex-200
- 2- Fraktion 6 der nativen Gelelektrophorese
- 3- Fraktion 7 der nativen Gelelektrophorese
- 4- Molekulargewichtsmarker

Bei der vorgestellten Methodik zur Aufreinigung und Identifizierung der  $\text{InsP}_5\text{-(3/5)}$ -Kinase konnte das Enzym weitgehend aufgereinigt und das Molekulargewicht exakter bestimmt werden. Aufgrund erheblicher Ausbeuteverluste durch die native Gelelektrophorese, reichte die in einer Bande vorhandene Proteinmenge für weitere Analysen nicht aus. Um diese Verluste zu minimieren und für die geplante Proteinsequenzierung ausreichend Material zu erhalten, wurde das Enzym nur bis zur Gelfiltration aufgereinigt, da die Bande der  $\text{InsP}_5\text{-(3/5)}$ -Kinase in der nativen Gelelektrophorese eindeutig identifiziert wurde.

## 3.2 Sequenzierung der $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI- MS)

In der Proteinanalytik ist die Massenspektrometrie in Kombination mit Datenbankrecherchen die Methode der Wahl zur Identifizierung von Proteinen. Die Entwicklung schonender Ionisationsverfahren, wie ESI, schaffte die Voraussetzung Peptide jeder Größe bis hin zu Proteinen massenspektrometrisch zu charakterisieren. Dabei können Informationen über das Protein gewonnen werden. So kann die molekulare Masse des intakten Proteins bestimmt werden. Die Massen der Spaltprodukte nach einem spezifischen enzymatischen Verdau können erfasst werden (Peptide Mass Fingerprinting; PMF). Die enzymatischen Spaltprodukte können außerdem im Massenspektrometer isoliert und zum Zerfallen angeregt werden. Aus den Massen der im Spektrometer gebildeten Fragmente (MS/MS) kann man die Aminosäuresequenz der Peptide bestimmen (*de novo* Sequenzierung).

Die Routine-Methode zur Proteinidentifikation ist das PMF. Dabei wird über statistische Verfahren das theoretische Muster von Massen nach spezifischer Spaltung eines Proteins in der Datenbank mit dem tatsächlichen Muster identifizierter Massen verglichen. Sind die daraus gewonnenen Informationen nicht ausreichend für die Identifizierung des Proteins, werden MS/MS-Daten herangezogen (Peptidfragmentierung Fingerprint oder MS/MS-Ionensuche). Eine wichtige Voraussetzung und gleichzeitig Einschränkung der beiden Verfahren PMF und MS/MS-Ionensuche ist das Vorhandensein einer Proteindatenbank, da die Identifizierung allein auf einem Vergleich mit den Massenspektren bekannter Proteine beruht. Neue, bisher nicht erfasste Proteine können daher nicht identifiziert bzw. sequenziert werden.

Bei der *de novo* Sequenzierung wird hingegen versucht, aus den MS/MS-Spektren eines Proteins direkt seine Aminosäuresequenz zu rekonstruieren. Die Auswertung der MS/MS-Spektren ist allerdings sehr aufwendig. Spezielle Algorithmen errechnen je-

doch zuverlässig Sequenzabschnitte von bis zu 15 Aminosäuren. In der Regel ist dies ausreichend, um in großen Sequenz-Datenbanken die vollständige Sequenz zu finden, falls das Protein oder das entsprechende Gen erfasst ist. Dieser Vorgehensweise ist jedoch durch die Auswertung großer Datenmengen wesentlich anspruchsvoller.

### 3.2.1 ESI-MS und ESI-MS/MS-Analyse der $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase

Für die Proteinidentifizierung/-sequenzierung mittels Massenspektrometrie ist die Analyse von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen, die Coomassie gefärbt wurden, erfolgsversprechend. Die Abbildung 3.6 zeigt das zur Sequenzierung verwendete Polyacrylamidgel. Für eine optimale Trennung wurde eine Gelkonzentration von 10 % ausgewählt. Erkennbar ist die 34 kDa Proteinbande der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase sowie drei weitere.

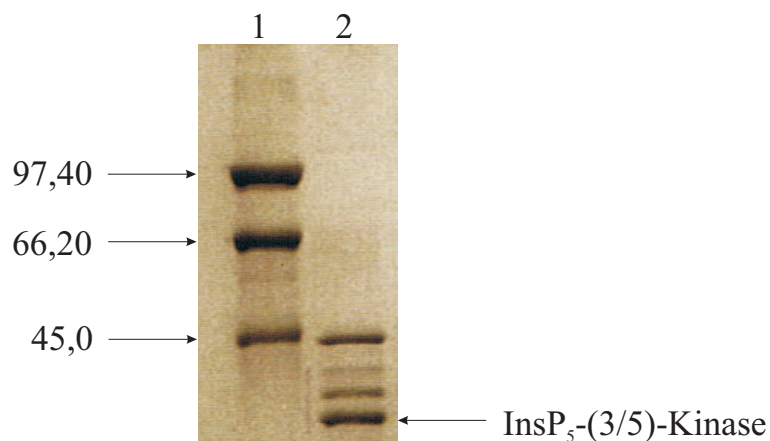


Abbildung 3.6: SDS-PAGE für die ESI/MS-Analyse (10 %; Coomassie-Färbung)

1. Molekulargewichtsmarker
2. angereicherte  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase (nach Gelfiltration)

Die Sequenzierung der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. S. Metzger (BMFZ, Universität Düsseldorf). Die Proteinbande wurde im Gel tryptisch verdaut, das entstandene Peptidgemisch extrahiert und massenpektrometrisch analysiert.

Von dem Peptidgemisch wurde zunächst das Übersichtsspektrum aufgenommen, wobei die Massen der einzelnen Peptide erfasst wurden. Charakteristisch für den ESI-Prozess ist die Bildung von mehrfach geladenen Ionen. Die Identifikation der InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase über das Peptid Mass Fingerprinting blieb erfolglos. Aus diesem Grund wurden anschließend ausgewählte Peptide der InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase im ESI-MS/MS-Modus fragmentiert. MS/MS Daten enthalten neben den Peptidmassen auch Sequenzinformationen, die eingehendere Datenbankrecherchen ermöglichen. Dies ist wichtig, wenn aus dem Verdau eines Proteins nur wenige messbare Peptide hervorgehen (z.B. kleine oder hoch glykosylierte Proteine). Ein weiterer Vorteil ist, dass die einzelnen Peptide getrennt und nicht wie im PMF in einem einzelnen Spektrum gemessen werden. So werden Überlagerungen ähnlicher Massen reduziert und dadurch eine höhere Auflösung erzielt. Mit Hilfe der Peptidfragmentierung und dem anschließenden Vergleich der MS/MS-Spektren mit Datenbanken erfolgte ebenfalls keine Proteinidentifizierung. Erst durch die vertiefte Analyse der MS/MS-Spektren nach *de novo* Sequenzierung konnten die Aminosäuresequenzen der einzelnen Peptide abgeleitet werden. Insgesamt wurden 25 MS/MS-Spektren aufgenommen aus denen 11 Aminosäuresequenzen (Tabelle 3.2) ermittelt wurden.

Tabelle 3.2: Ermittelte Aminosäuresequenzen aus der massenspektrometrischen Analyse (ESI-MS/MS) der InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase

Peptidmasse: M+H <sup>+</sup> [Da]	Ladung der Peptide	Aminosäuresequenz
2895,5	++	SSSSLKPLEDQIAGHTEEDGGSENIPR
1595,9	+++ und ++	SDEGYVFKPVPTR
1070,6	+++ und ++	GGKELEFYK
946,6	++	TLVEFLPK
993,6	++	IYEDGIKR
1004,5	++	FFWHPDR
1157,5	+++ und ++	SVKENQLIVK
1006,6	++	SFLNKLER
1791,1	+++ und ++	DTITLVSDDSNIGISLK
2734,5	+++	MIDFAHVDPLTPPTKDESYIFGLK
1538,8	++	NLISFFNQLLSEN

Mit den ermittelten Sequenzen wurden Datenbankrecherchen sowohl über die *Dictyostelium*-Datenbank [92] als auch über die des NCBI (National Center for Biotechnology Information) [93] durchgeführt, wobei das BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)-Programm angewendet wurde. Dieses ermöglicht die Suche nach Sequenz-Homologie. Die 11 Aminosäuresequenzen konnten mit einer Sequenzabdeckung von 51 % einem einzigen Protein zugeordnet werden. Aufgrund der Homologie-Suche und der Entschlüsselung des *Dictyostelium*-Genoms wird vermutet, dass dieses Protein von einem single-copy-gen kodiert wird. Das Ergebnis der Datenbankrecherchen ist in der Tabelle 3.3 und Abbildung 3.7 wiedergegeben.

Tabelle 3.3: Ergebnis der Datenbankrecherchen für die InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase.

Datenbankrecherchen wurden über die *Dictyostelium*- [92] und NCBI-Datenbank [93] durchgeführt (Stand August 2007)

Gen	JC3V2_0_01958
Chromosom	3
Position	4897459 - 4898536
DictyBaseID <sup>a)</sup>	DDB0204639
Aminosäuren	284
MG [kDa]	32,5
pI (theoretisch)	6,8
Annotation	Automatisch als hypothetisches Protein
Zuordnung <sup>b)</sup>	Inositoltrisphosphat 3-Kinase Aktivität
Homologie <sup>b)</sup>	InsP <sub>7</sub> -Kinase Inositolpolyphosphat Kinase Inositolhexakisphosphat Kinase Inositoltrisphosphat 3-Kinase

a) Identifizierungsnummer des Proteins in der *Dictyostelium*-Datenbank [92]

b) Die Zuordnung erfolgte über die *Dictyostelium*- und die Homologiesuche über die Expsy-Datenbank (BLAST-Programm) [94]



## KAPITEL 3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

```

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

```

Abbildung 3.7: Nukleotid- und Aminosäuresequenz der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase

Rot dargestellt sind die Aminosäuresequenzen, die nach dem tryptischen „In Gel-Verdau“ der 34 kDa-Bande der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase und ESI-MS/MS- Analyse ermittelt wurden. 51 % des Proteins wurden sequenziert (Sequenzdaten aus der DictyBase-Datenbank [92])

Die  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase wird bislang als hypothetisches Protein annotiert. So werden Proteine bezeichnet, deren Expression *in vivo* noch nicht nachgewiesen wurde. Auf-

grund der Homologie wurde dem Protein eine Inositoltrisphosphat 3-Kinase Aktivität zugeordnet. Basierend auf der Sequenzhomologie, werden die Inositolphosphatkinasen, wie schon unter 1.6 erwähnt, in drei Klassen unterteilt: Die Inositolphosphatkinase-Superfamilie, die wiederum in Inositol(1,4,5)trisphosphat 3-Kinasen (IP3K), Inositolphosphatmultikinasen (IPMK) und Inositolhexakisphosphatkinasen unterteilt wird. Die zwei anderen Klassen der Inositolphosphatkinasen sind die Inositol(1,3,4,5,6)pentakisphosphat 2-Kinasen und die Inositol(1,3,4)trisphosphat 5/6-Kinase/ Inositol(3,4,5,6)tetrakisphosphat 1-Kinase. Offensichtlich gehört die  $\text{InsP}_5\text{-(3/5)}$ -Kinase zu der Inositolphosphatkinase-Superfamilie. Enzyme dieser Inositolphosphatkinase-Klasse weisen charakteristische konservative Domänen auf, unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihrer Enzymaktivität und Substratspezifität. Somit besteht kein direkter Zusammenhang zwischen der Sequenzhomologie und der Substratspezifität der einzelnen Enzyme.

### **3.2.2 Vergleich der $\text{InsP}_5\text{-(3/5)}$ -Kinase mit bekannten Vertretern der Inositolphosphatkinase-Superfamilie**

Die Analyse der Aminosäuresequenz der  $\text{InsP}_5\text{-(3/5)}$ -Kinase ergab 43-54 % Homologie und 23-31 % Identität zu bekannten Enzymen der Inositolphosphatkinasen-Superfamilie anderer Organismen. Die katalytischen Domänen von drei Proteinen dieser Inositolphosphatkinasen-Klasse wurden mit den entsprechenden Sequenzen in der  $\text{InsP}_5\text{-(3/5)}$ -Kinase verglichen (Abb. 3.8). Typisch für die Inositolphosphat-Bindestelle ist die Konsensussequenz  $\text{PxxxDxKxG}$ . Bei der  $\text{InsP}_5\text{-(3/5)}$ -Kinase (Aminosäuren 96-104) ist Prolin gegen Alanin ausgetauscht worden. Diese Sequenz wurde ursprünglich für die  $\text{InsP}_3$  3- Kinasen ( $\text{InsP}_3\text{K}$ ) postuliert und später in  $\text{InsP}_3/\text{InsP}_4$  6-/3-Kinasen und  $\text{InsP}_6$ -Kinasen nachgewiesen [95]. Dieses Motiv wurde weder in den Inositolphosphat 2-Kinasen [48, 67] noch in der -5/6-Kinase [96, 97] nachgewiesen. Ein solcher Aminosäureaustausch könnte bei der Substratspezifität der  $\text{InsP}_5\text{-(3/5)}$ -Kinase eine Rolle spielen. Die katalytisch wichtige Domäne mit der Konsensussequenz "SSLL" (Amino-

säuren 213-216) und die ATP-Bindestelle (Aminosäuren 249-255) der Inositolphosphatkinasen-Superfamilie sind ebenfalls in der InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase konserviert.

### Inositolphosphat-Bindestelle

InsP3/5K <i>Dd</i>	91	YLEDFANVADIKMGTRTYDNSATE
IPMK <i>H</i>	135	HKFNKPCIMDVKIGQKSYDPFASS
InsP6K <i>Dd</i>	257	SSYNSPCIVDIKIGTRQRGVICSS
IP3KA <i>H</i>	253	DGFDGPCVLDCKMGVRTYLEEELT
		* * *

### SLL-Domäne

InsP3/5K <i>Dd</i>	211	-YSSLLFVYGPTD
InsP6K <i>Dd</i>	390	IYSSLLIIYEG-K
IP3KA <i>H</i>	395	VIGSLLFVHDH-C
IPMK <i>H</i>	248	FYASSLLFVYEG-S
		****

### ATP-Bindestelle

InsP3/5K <i>Dd</i>	245	SLKMIDFAHV-D
IPMK <i>H</i>	381	-VRMIDFAHVFP
InsP6K <i>Dd</i>	594	AVKMIDFAHA-I
IP3KA <i>H</i>	411	GVWLIDFGKT-T
		***

Abbildung 3.8: Das lokale Alignment der katalytisch wichtigen Domänen von drei Vertretern der Inositolphosphatkinasen-Superfamilie (IPMK\_*Human*: Q8NFU5, IP3KA\_*Human*: Q8TAN3 und InsP<sub>6</sub>Kinase\_*D. discoideum*: DDB0233043) mit den entsprechenden Sequenzen in der InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase (DDB0204639) erfolgte mit CLUSTALW am European Bioinformatics Institute (EBI) [98]. (\*) identische Aminosäuren

### **3.3 Identifizierung von Proteinen, die parallel mit der $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase angereichert werden**

Für die Sequenzierung der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase wurde die Proteinaufreinigung wie bereits im Abschnitt 3.1.2 erwähnt bis zur Gelfiltration durchgeführt. Da eine fehlerhafte Bestimmung des Molekulargewichts eines Proteins unter anderem zur Sequenzierung eines unerwünschten Proteins führen kann, wurden die bei der Gelfiltration parallel mit der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase angereicherten drei Proteine (Molekulargewicht von 44, 40 und 38 kDa, siehe Abb. 3.6) mitsequenziert. Die Sequenzierung und Identifikation dieser Proteine könnten dazu beitragen, ihre mögliche Rolle im Inositolphosphat-Metabolismus aufzudecken. Das methodische Vorgehen erfolgte analog zur Sequenzierung der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase. Die Proteine mit dem Molekulargewicht 40 und 38 kDa wurden ebenfalls durch *de novo*-Sequenzierung in Kombination mit Datenbankrecherchen identifiziert. Dagegen konnte das Protein mit dem Molekulargewicht von 44 kDa direkt durch den Abgleich des Peptidfragmentierungs- Musters mit der ExPASy-Proteindatenbank [94] identifiziert werden. In den Abbildungen 3.10-3.12 sind die jeweiligen Aminosäuresequenzen der drei Proteine aus der DictyBase-Datenbank [92] wiedergegeben.

a) Das Protein mit dem Molekulargewicht von 44 kDa wurde mit einer Sequenzabdeckung von 37 % der 427 Aminosäuren als Adenylosuccinat-Synthetase identifiziert. Das theoretische Molekulargewicht des Proteins liegt bei 47 kDa. Dieses Enzym spielt eine wichtige Rolle bei der Purin Nukleotid Biosynthese, in dem sie die durch die Hydrolyse von GTP angetriebene Synthese von Adenylosuccinat aus Inosinmonophosphat katalysiert (Abb. 3.9).

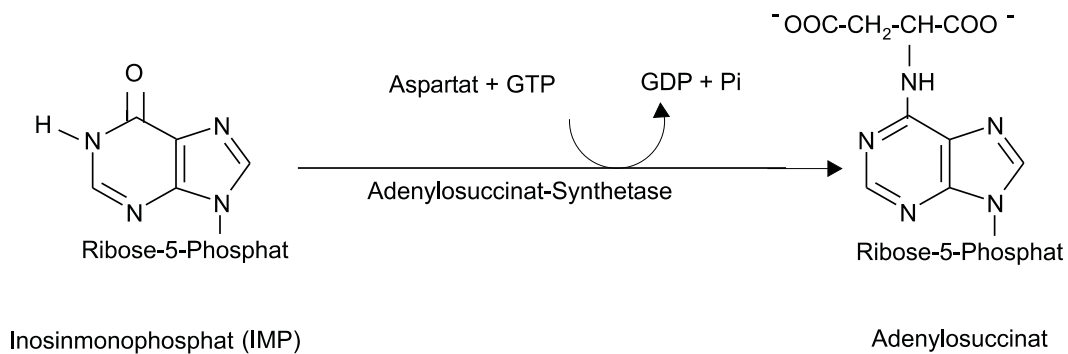


Abbildung 3.9: Die durch die Adenylosuccinat-Synthetase katalysierte Reaktion

Die Adenylosuccinat-Synthetase wurde bereits aus verschiedenen Organismen aufgereinigt und charakterisiert [99]. Aus der Rattenleber wurden zwei Isoenzyme, die sich durch ihren pI-Wert unterscheiden (5,9 und 8,9), isoliert. Das saure Isoenzym scheint überwiegend an der Biosynthese von Purinen und das basische an dem Purin Nukleotid Zyklus beteiligt zu sein [100].

Auch aus axenisch gewachsenen *Dictyostelium* Zellen wurde das Enzym bereits isoliert [101]. Das Protein wurde unter anderem durch Ionenaustausch- und Gelfiltrations-Chromatographie aufgereinigt. Das Protein ist im Zytosol lokalisiert und hat ein relatives Molekulargewicht von 44 kDa. Das Ergebnis korreliert mit den im Laufe der InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase Aufreinigung gewonnenen Erkenntnissen über dieses Protein. In *Dictyostelium* sind nur basische Isoenzyme der Adenylosuccinat-Synthetase gefunden worden. Im Gegensatz zu den Wirbeltieren sollen diese in *Dictyostelium* sowohl an der Purin Biosynthese als auch am Purin Nukleotid Zyklus beteiligt sein.

## KAPITEL 3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

---

```
>DDB0201565 |Protein| gene: purA on chromosome: 4 position 3358729
to 3360093
MASIIIGSQWGDEGKGLVDILSQQFDVVARCQGGANAGHTIVVDGKKIALHLIPSGILN
EKASCILGNMVIHLPTFFKEVQGLQDKGINYKGRLFVSDRAHLVFDLHQMIDAMKEAEL
SNGTSNDSIGTTKRIGIGPCYSSKASRGGLRVCDLYSPEHFRKTFTRLVENKHKRFGSFEY
DVEAELKRYQEF AEMLKPFVIDSVYYLNQAFKDGKKVLEGAQSTMLDLDFGCYPYVTSS
ASSVGGACTGLGISPNKVVTQIGVVKAYTTKVGSGFPFTEQNDHVGDSLRKAGSEFGTTT
GRPRRIGWLDVAVLRYYTSMINDFTRLNLTTKLDVLSDFEEIKIGVDYKYKGETIKSFPASL
ETLAQCEVVYESFPGWKCDLSHVTEYDQLPIQAKNYIKRIEELVGVPIVYIGVGVERKNL
IERKELI*
```

### Abbildung 3.10: Primärstruktur der Adenylosuccinat-Synthetase

Die Aminosäuresequenz wurde durch den Peptidfragmentierungs Fingerprint der tryptischen Peptide gefunden. Das Protein ist über die Zuordnungsnummer (DDB-0201565) in der DictyBase-Datenbank [92] zugänglich. Grün unterlegt sind Peptide, deren MS/MS-Spektren aufgenommen wurden.

b) Das Protein mit dem Molekulargewicht von 40 kDa wurde mit einer Sequenzabdeckung von 20 % als hypothetisches Protein, dem eine Protein-, Nukleinsäurebindungs-Funktion und Translationsfaktoraktivität zugeordnet wurde, identifiziert. Das Protein hat ein berechnetes Molekulargewicht von 37 kDa und zeigt 40 % Identität und 61 % Homologie zu der  $2\beta$ -Untereinheit des eukaryontischen Translationsinitiationsfaktors 3 (eIF32S). Protein-Initiationsfaktoren kommen in Eukaryonten- und Prokaryonten-Ribosomen vor. Sie sind essentiell für den Start der Proteinbiosynthese. Bislang wurde das Protein in *Dictyostelium* noch nicht nachgewiesen.

## KAPITEL 3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

---

```
>DDB0233910 |Protein| gene: eIF3s2 on chromosome: 4 position 3586013
to 3588128
MRPISLRLHERPITQVLFNREGDLLFVAAKDKLVSLWYTTNGERIGSYQCGGVVYSIDVS
QDSKYLITASADAKARVWDVSSGRQLDSTDFEVSARSSIEFSQGDQILVVTDQVMGCQAK
IHVDFDFKDEVKLNKSYTLPSPOCKITQATWGPLNKTIFASCEDGAVRIYCTEKRELIK
TILDHNKLVTRIEWTKHRIMFMTCSKDGTAKLYDTKTLKLLRTFDTGRPINAAGISPLKP
HVILGGGQSAESVTTTKVDASQFKVRFFHIVYGEELGGLIGHIGPVHSICFTPDGKTFAT
GGEEGLVQVNHLDSESYFEFDDDLVYNPPVQH*
```

Abbildung 3.11: Primärstruktur des eukaryontischen Translationsinitiationsfaktors 3

Die Aminosäuresequenz wurde durch *de novo*-Sequenzierung und anschließende Proteindatenbankrecherchen ermittelt. Das Protein ist über die Zuordnungsnummer (DDB-0233910) in der DictyBase-Datenbank [92] zugänglich. Grün unterlegt sind Peptide, deren MS/MS- Spektren aufgenommen wurden.

c) Das Protein mit dem Molekulargewicht von 38 kDa, das direkt über der InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase Bande im SDS-Polyacrylamidgel auftritt, wurde ebenfalls identifiziert. Das Protein besteht aus 401 Aminosäuren und hat damit eine Größe von 47 kDa. Eine starke Abweichung der experimentell ermittelten Größe von der theoretischen Größe wird relativ häufig bei Proteinen beobachtet [102]. Die sequenzierten tryptischen Peptide decken 30 % der Aminosäuresequenz ab. Dem Protein konnte bisher keine biologische Funktion zugeordnet werden (Stand Februar 2007).

## KAPITEL 3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

---

```
>DDB0187589 |Protein| gene: BC5V2_0_00249 on chromosome: 5 position
597404 to 598609
MTKTKNNSEKTTTTTTITNKTTTTDTNTNTNININKNNNSKVVEKTKTKLTQTTLIPIKKV
IQEKLKPIKKNLRKQMELDVKYNELSLNCNEPKSDWPEWRQHLYDHGWAIVPKVVAKERC
KEYLSRFWDWLEGFSGGLKRRDPSTWTSDNWPNGNIHGIFQNYALGHQQFVWDIRQETDIM
KIFEMIQTPPELLVSFDGGNLSRPTNTEPKSWAHFDQSSKFGFRCIQGFLNLDVCQEND
GGLIVYQDShLQHDKYFAESAEQSQGDWYKFEKDPHSLKWFKDCKKIKVCCEPGDVVLWD
SRTIHYACPPVKNSGNGNCRAVVYVSYPASLASEKVLAQKQAFHSKRMTSHWAAENIK
LFPRTPRTYGNEERVEKFRFDETTLPILNEFGRKLAGLDSY*
```

Abbildung 3.12: Primärstruktur eines mit der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase aufgereinigten Proteins (relative Größe 38 kDa).

Die Aminosäuresequenz wurde durch *de novo*-Sequenzierung und anschließende Proteindatenbankrecherchen ermittelt. Das Protein ist über die Zuordnungsnummer (DDB-0187589) in der DictyBase-Datenbank [92] zugänglich. Grün unterlegt sind Peptide, deren MS/MS- Spektren aufgenommen wurden.

Aufgrund der Einträge aus der DictyBase-Datenbank [92] und des Aminosäuresequenzvergleiches mit bekannten Enzymen des Inositolphosphatstoffwechsels, insbesondere mit der Inositolphosphatmultikinase, Inositol(1,4,5) $\text{P}_3$  3-Kinase und der Inositolhexakisphosphatkinase besteht für die drei Begleitproteinen keinerlei Homologien zu den Inositolphosphatkinasen. Hinweise auf eine Beteiligung am Inositolphosphatstoffwechsel wurden auch nicht gefunden. Die für die Inositolphosphat Kinase-Familie charakteristischen Domänen sind nicht vorhanden. Demzufolge kann man ausschließen, dass eins dieser drei Proteine für die  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase-Aktivität verantwortlich ist. Bei dem aufgereinigten und sequenzierten Protein mit dem Molekulargewicht von 34 kDa kann es sich nur um die  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase handeln.



### **3.4 Amplifikation des $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase-Gens mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Gen der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase identifiziert werden. Dazu wurde zunächst das Gen durch PCR amplifiziert. Aus der in Abschnitt 3.2.1 ermittelten Proteinsequenzen wurden PCR-Primer so ausgewählt, dass sie Restriktionsstellen für die Enzyme HindIII bzw. KpnI enthalten. Diese Schnittstellen ermöglichen eine direkte Klonierung in den pUC18- Vektor, da die Klonierungsstelle (multiple cloning site) dieses Vektors ebenfalls Schnittstellen für diese beiden Enzyme enthält.

Die Anwendung herkömmlicher PCR-Verfahren führte zunächst nur zu unspezifischen PCR-Produkten. Die Amplifikation des  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase Gens gelang schließlich nur mit Hilfe der Hot-Start-PCR (Abb. 3.13). Die Hot-Start-PCR unterscheidet sich von dem herkömmlichen Verfahren darin, dass die Aktivität der Taq-Polymerase erst bei erhöhter Temperatur einsetzt. Damit unterdrückt man eine Polymerisation an unspezifisch hybridisierten Primern bei niedrigen Temperaturen. So kann die Polymerisation erst beginnen wenn, die Primer spezifisch an die DNA-Sequenz gebunden haben.

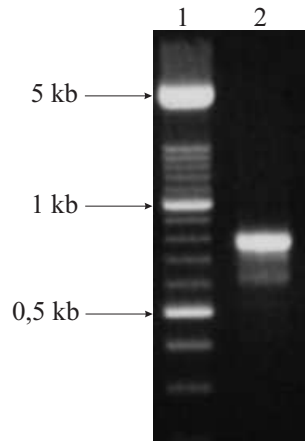


Abbildung 3.13: Amplifikation des  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase-Gens mit der Hot-Start-PCR (Elektrophorese auf 2 %-igem Agarosegel)

1. DNA-Marker (100 bp DNA-Leiter)
2. Das PCR-Produkt ist etwa 0,8 kb lang. Dies entspricht der erwarteten Größe.

Das erhaltene PCR-Produkt wurde in pUC18 kloniert. Dafür wurde sowohl der Vektor als auch das PCR-Fragment mit HindIII und KpnI geschnitten. Mit Hilfe der T4-Ligase wurden die beiden DNA-Fragmente über die entstandenen kohäsiven Enden kovalent mit einander verbunden. Der Erfolg der Klonierung des PCR-Produkts in pUC18 wurde nach Transformation des Ligationsansatzes in *E. coli*, Blau-Weiß-Selektion und Isolierung des Plasmids, durch eine Restriktionsanalyse überprüft. Wie die Abbildung 3.14 zeigt, ist der ringförmige Vektor aus der Ligation (Bahn 3) größer als der ringförmige Ausgangsvektor (Bahn 2). Das 3,5 kb große DNA-Fragment (Bahn 4) entspricht dem mit HindIII linearisierten pUC18-Vektor (2,7 kb) mit dem eingebauten Insert (0,8 kb).

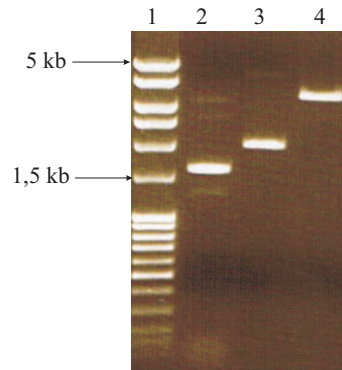


Abbildung 3.14: Analyse der Klonierung des PCR-Produkts in pUC18 (Restriktion mit

HindIII; 1 %-iges Agarosegel)

1. DNA-Marker (100 bp DNA-Leiter)
2. Ringförmiger pUC18-Vektor ohne Insert
3. Ringförmiger pUC18-Vektor mit Insert
4. Linearisierter pUC18-Vektor mit Insert (pUC18-Vektor: 2,7 kb; Insert: 0,8 kb)

Das PCR-Produkt wurde anschließend sequenziert, um die Basenabfolge der DNA-Sequenz zu verifizieren. pUC18 ermöglicht die Sequenzierung beider DNA-Stränge eines Inserts durch Verwendung von zwei verschiedenen Primern. Die Sequenzierung des InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase/pUC18-Vektors erfolgte nach dem Kettenabbruch-Verfahren von Sanger und wurde von der Firma GATC Biotech durchgeführt. Die Abbildung 3.15 zeigt den Vergleich des sequenzierten PCR-Produkts mit der aus der Proteinsequenzanalyse und Datenbankrecherchen ermittelten InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase Nukleotidsequenz. Aus dieser Abbildung geht hervor, dass die komplette sequenzierte DNA dem Bereich entspricht, der amplifiziert werden sollte.



### KAPITEL 3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

---

```

DDB0204639      AACTACAACCAAATCATTGGGTATTAGATTTTGTGGTGCAAAACTTGTGCATCCAAATAC 660
PCR- Pr odukt  AACTACAACCAAATCATTGGGTATTAGATTTTGTGGTGCAAAACTTGTGCATCCAAATAC 450
*****

DDB0204639      TGGTGAAAAAACTAAACTTTCAAAAGTTTGGGGTAAACAATTGAAACATGATAGAATCTA 720
PCR- Pr odukt  TGGTGAAAAAACTAAACTTTCAAAAGTTTGGGGTAAACAATTGAAACATGATAGAATCTA 510
*****

DDB0204639      TGAAGATGGTATTAAGATTCTTTTGGCATCCAGATAGATCGGTAAAAGAGAATCAATT 780
PCR- Pr odukt  TGAAGATGGTATTAAGATTCTTTTGGCATCCAGATAGATCGGTAAAAGAGAATCAATT 570
*****

DDB0204639      AATAGTTAAATCATTCTAAATAAATTGGAAAGATTATTAACCTTTTTTCGAAAATAATCA 840
PCR- Pr odukt  AATAGTTAAATCATTCTAAATAAATTGGAAAGATTATTAACCTTTTTTCGAAAATAATCA 630
*****

DDB0204639      ACAATTTGCATTCTATAGTAGTCTTTATTATTTGTTTATGGTCCAACCGATTCAAATAA 900
PCR- Pr odukt  ACAATTTGCATTCTATAGTAGTCTTTATTATTTGTTTATGGTCCAACCGATTCAAATAA 690
*****

DDB0204639      ATCGAAATTACGTGACACTATAACTTTGGTTTCTGATGACTCAAATATTGGTATCAGTTT 960
PCR- Pr odukt  ATCGAAATTACGTGACACTATAACTTTGGTTTCTGATGACTCAAATA- ----- 737
*****

DDB0204639      GAAAATGATTGATTTTCGCTCATGTAGATCCATTAACCCACCAACAAAAGATGAAAGTTA 1020
PCR- Pr odukt  -----

DDB0204639      TATTTTGGTTTAAAAAATTAATTTCAATTTTAAATCAATTATTATCTGAAAATTAA 1078
PCR- Pr odukt  -----

```

Abbildung 3.15: Vergleich des sequenzierten PCR- Fragments mit dem InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase-Gen aus der DictyBase-Datenbank [92].

Das Alignment erfolgte mit dem Programm CLUSTALW am European Bioinformatics Institut (EBI) [98]. (\*) identische Basen, (-) Genabschnitte der InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase die nicht amplifiziert wurden.

### **3.5 Gezielte Mutagenese des $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase-Gens**

Für die Aufklärung der *in vivo*-Funktion eines Proteins ist die Erzeugung von Mutanten eine notwendige Voraussetzung geworden. Die Mutationen werden in der Regel durch Zufall- oder gerichtete-Mutagenese eingeführt. Bei der Zufallsmutagenese werden ganze Organismen durch chemische oder physikalische Agenzien unspezifisch mutiert und die Auswirkungen der Mutationen phänotypisch oder über eine geänderte biologische Aktivität nachgewiesen. Mit Hilfe der gerichteten-Mutagenese werden dagegen Veränderungen in der Expression eines Proteins, durch zielgerichtete Mutation des kodierenden Gens, erzeugt. Mit Mutanten, die durch derartige definierte DNA-Sequenzveränderungen erzeugt wurden, ist es möglich Stoffwechselwege, die Substratspezifität und die Wechselwirkungen von Proteinen mit anderen Biomolekülen zu untersuchen.

In *D. discoideum* wurden für die Durchführung der gezielten Mutagenese in den letzten Jahren verschiedene Methoden etabliert. Dabei werden die DNA-Sequenzen *in vitro* verändert und durch Transformation in die Zelle eingeführt. Abhängig von dem verwendeten Transformationsvektor wird durch homologe Rekombination oder antisense RNA die Expression eines definierten Proteins blockiert oder vermindert.

#### **3.5.1 Versuche zur Erzeugung von Knockout-Mutanten durch homologe Rekombination**

Aufgrund seines haploiden Genoms werden bei *D. discoideum* bevorzugt Gene-Knockout Techniken angewendet, um die Funktion einzelner Gene zu untersuchen. Die klassische Vorgehensweise besteht darin, eine Antibiotika-Resistenzkassette z.B. für Blasticidin oder Geneticin, durch homologe Rekombination in das Zielgen einzubauen. Dies führt zur vollständigen Inaktivierung des Gens. Eine maßgebliche Einschränkung dieses Ansatzes ist jedoch die niedrige Frequenz der homologen Rekombination. Im Gegensatz zur Hefe sind homologe Rekombinationsereignisse bei *D. discoi-*

*deum*-Zellen genauso selten wie bei Säugerzellen. Weiterhin führt die Verwendung von Transformationsvektoren, die einige *D. discoideum*-Sequenzen enthalten, wie den Aktin-Promotor und -Terminator, möglicherweise zur homologen Insertion an andere Stellen des Genoms [103]. Für die Konstruktion des Transformationsvektors (Abb. 3.16) wurde das 1.3 kb HindIII/BamHI Fragment, das die Resistenzkassette mit dem bsr-Gen enthält, aus pUCBsr $\Delta$ Bam [83] isoliert (Abb. 3.17a). Das bsr-Gen kodiert für die Blasticidin-S-Deaminase aus *Bacillus cereus* [104, 105] und wird für die Expression in *D. discoideum* Zellen von dem Aktin15-Promotor und Aktin8-Terminator kontrolliert [106]. Nach Auffüllen der Enden mit dem Klenow Fragment wurde die Resistenzkassette in der Blunt-ended MunI Schnittstelle des InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase-Gens in pUC18 eingebaut. Der Erfolg der Ligation wurde durch eine Restriktionsanalyse überprüft. Die Abbildung 3.17(b) zeigt das Ergebnis der zweifachen Restriktion mit HindIII und EcoRI. Man kann in dieser Abbildung eindeutig ein DNA-Fragment der Größe von 2,7 kb und ein DNA-Fragment der Größe 2,1 kb erkennen. Die Restriktionsenzyme HindIII und EcoRI schneiden das pUC18 Plasmid in der „multiplen cloning site“. Das erhaltene Gen-Fragment von 2,1 kb entspricht dem bsr Gen, das von Abschnitten des InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase Gens flankiert ist. Der pUC18 Vektor ist in dem gezeigten Bild (Abb. 3.17(b)) durch das Fragment der Größe 2,7 kb dargestellt. Die dokumentierte Restriktionsanalyse ist ein Beleg für die gelungene Konstruktion des Transformationsvektors.

## KAPITEL 3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

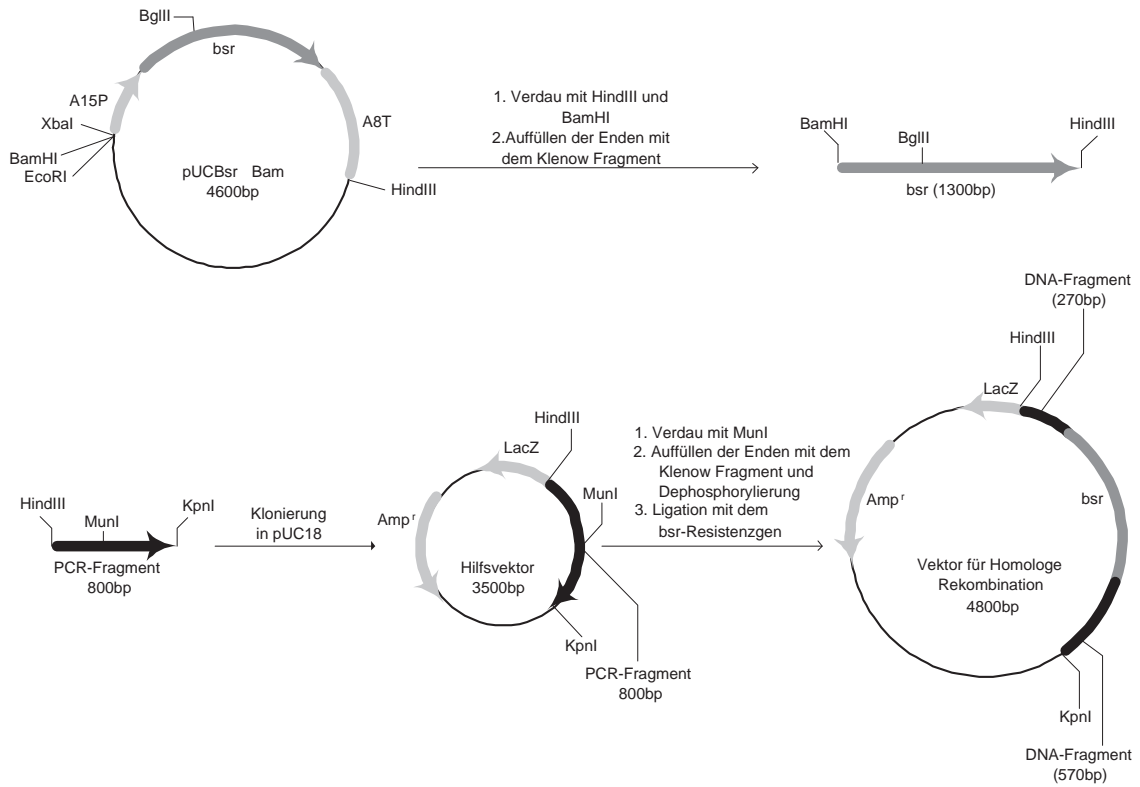


Abbildung 3.16: Schematische Darstellung der Vektorkonstruktion für die homologe Rekombination



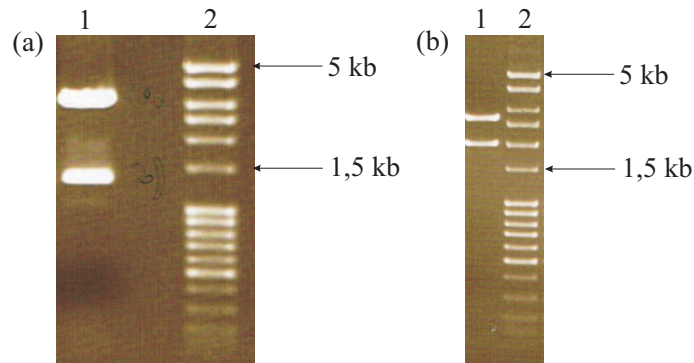


Abbildung 3.17: (a) Restriktionsanalyse zur Isolierung des *bsr* Gens aus pUCBsr $\Delta$ Bam (Restriktion mit HindIII und BamHI; 1 %-iges Agarosegel)

1. 1,3 kb *bsr*-Gen und 3,3 kb pUCBsr $\Delta$ Bam-Rückgrat
2. DNA-Marker (100 bp DNA-Leiter)

(b) Restriktionsanalyse des Transformationsvektors für die homologe Rekombination (Restriktion mit HindIII und EcoRI; 1 %-iges Agarosegel)

1. 2,1 kb-Fragment, das mit Abschnitten des InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase-Gens flankiert ist und 2,7 kb pUC18-Vektor
2. DNA-Marker (100 bp DNA-Leiter)

Der „gene targeting vector“ wurde durch Elektroporation in Zellen des *D. discoideum*-Wildtyps AX-2 eingeführt. Die Selektion der Transformanten erfolgte in Gegenwart von 10  $\mu$ g/ml Blasticidin. Es konnten etwa 200 blasticidinresistente Transformanten isoliert und analysiert werden. Die Amplifikation des für die InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase kodierenden Gens zeigte jedoch, dass das Gen nicht verändert wurde. Da bei der Kontrollprobe kein Wachstum des untransformierten Stammes in Gegenwart des Antibiotikums beobachtet wurde, kann man davon ausgehen, dass die Blasticidinresistenz der Transformanten allein auf eine ziellose Integration der Resistenzkassette ins Genom zurückzuführen ist. Diese Annahme wurde durch PCR mit Primern für das *bsr*-Gen

bestätigt.

Die Homologie der InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase zu anderen Inositolphosphatkinasen aus *D. discoideum* (siehe Abschnitt 3.2) könnte zur fehlerhaften Integration des Transformationsvektors beigetragen haben.

Aufgrund der in den letzten Jahren beschriebenen physiologischen Funktionen von InsP<sub>6</sub> (siehe Abschnitt 1.5) wurde in Betracht gezogen, dass der Gen-Knockout möglicherweise zu einer letalen Mutation geführt haben könnte. Daher wurde bei weiteren Transformationsversuchen das Selektionsmedium mit 0,6-0,8 mM InsP<sub>6</sub> versetzt. Diese Konzentration entspricht in etwa der zellulären Konzentration. Ferner wird das Wachstum von *D. discoideum* bei dieser Konzentration kaum beeinflusst [107]. Auch bei diesem Ansatz konnte bei den isolierten blasticidinresistenten Transformanten keine Mutation des Wildtypgens nachgewiesen werden.

Für *D. discoideum* wurde wie bereits erwähnt eine niedrige homologe Rekombinationsrate postuliert. Durch größere flankierende DNA-Sequenzen um die Resistenzkassette könnte die Wahrscheinlichkeit der homologen Rekombination gesteigert werden [108]. Dies war aber durch das relativ kleine Molekulargewicht der InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase und das AT-reiche Genom von *D. discoideum* nicht möglich.

Die vielfältigen Veränderungen der Elektroporationsbedingungen und Transformationsprotokolle führten leider zu keinem Erfolg.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht endgültig geklärt werden, warum der Knockout der InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase durch homologe Rekombination scheiterte.

### **3.5.2 Antisense-Mutagenese des InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase-Gens**

#### **3.5.2.1 Konstruktion des Antisense-Vektors und Transformation von *D. discoideum* Zellen**

Die durch Antisense-RNA vermittelte Mutagenese stellt eine weitere Möglichkeit zur spezifischen Verminderung oder Inhibierung der Expression eines Gens dar. Im Gegensatz zur homologen Rekombination wird üblicherweise bei der Konstruktion des

## KAPITEL 3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Antisense-Vektors das betreffende Gen oder der betreffende Genabschnitt lediglich in Antisense-Orientierung in einen Expressionsvektor kloniert. Eine Transformation dieses Vektors in *D. discoideum* kann eine vollständige oder stark reduzierte Translation der mRNA bewirken.

Zur Transformation von *D. discoideum* mit Antisense-RNA wurde der integrierende Expressionsvektor pDexRH [82] verwendet. Dieser enthält das neo-Gen vom bakteriellen Transposon Tn5, das für eine Aminoglycosid 3'-Phosphotransferase, APH3' II, kodiert und die Resistenz gegenüber Geneticin vermittelt.

Ein 520 bp Genabschnitt der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase wurde durch PCR amplifiziert und in den Vektor pDexRH in Antisense-Orientierung über die EcoRI/HindIII Schnittstelle inseriert (Abb. 3.18). Der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase Genabschnitt steht dabei unter Kontrolle des konstitutiven Aktin15-Promotors. Der Erfolg der Ligation wurde durch eine zweifache Restriktionsanalyse mit EcoRI und HindIII überprüft. Die Abbildung 3.19 zeigt in der zweiten Bahn des Agarosegels die zwei erwarteten DNA-Fragmente. Das etwa 520 bp große Fragment entspricht dem einklonierten  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase Genabschnitt. Der pDexRH Expressionsvektor ist in der Abbildung durch das etwa 5500 bp große Fragment dargestellt.

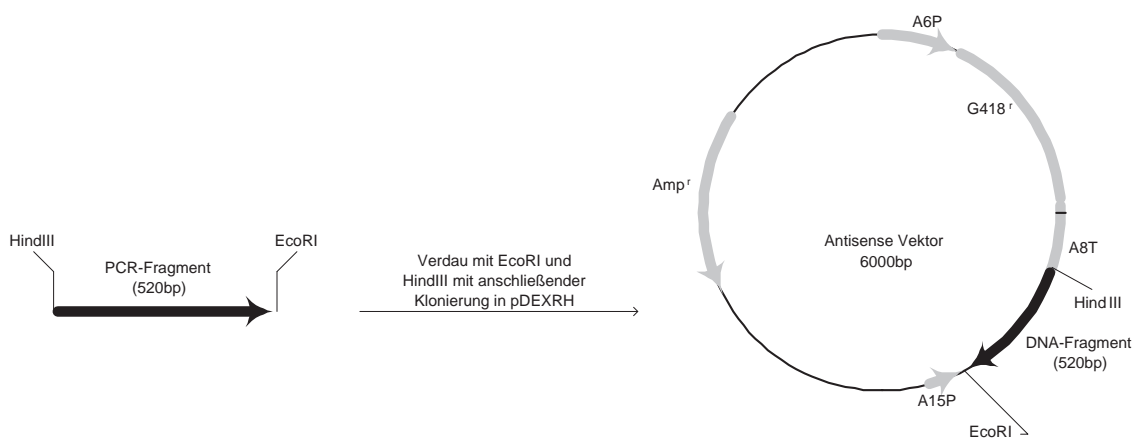


Abbildung 3.18: Schematische Darstellung der Vektorkonstruktion für die Antisense-Mutagenese

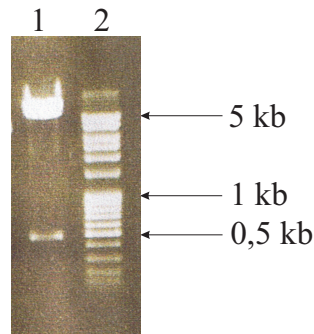


Abbildung 3.19: Restriktionsanalyse des Transformationsvektors für die Antisense-Mutagenese

(Restriktion mit EcoRI und HindIII; 1 %-iges Agarosegel)

1. 0,52 kb InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase-Genabschnitt und 5,5 kb pDexRH-Vektor

2. DNA-Marker (100 bp DNA-Leiter)

Nach Transformation des Antisense-Vektors in Zellen des *D. discoideum* Wildtyps AX-2 konnten Transformanten in Gegenwart von 12,5  $\mu\text{g/ml}$  G418 und 0,6 mM Inositolhexakisphosphat selektiert werden. Es wurden insgesamt drei unabhängige G418-resistente Klone (*DdIP3/5K1-DdIP3/5K3*) isoliert. Wie bei der homologen Rekombination diente der Zusatz von Inositolhexakisphosphat dazu, bei einer durch die Antisense-Mutagenese verursachten, möglichen vollständigen Inaktivierung der InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase, potentiell konditional letale Mutante am Leben zu halten. In *D. discoideum* ist bislang keine von den beschriebenen InsP<sub>6</sub>-Funktionen nachgewiesen worden. In anderen Zelllinien konnte jedoch gezeigt werden, dass InsP<sub>6</sub> an wichtigen zellulären Prozessen, wie dem mRNA-Export aus dem Zellkern und der Transkription involviert ist [48]. Des Weiteren haben Untersuchungen in den pankreatischen  $\beta$ -Zellen gezeigt, dass InsP<sub>6</sub>, durch die Regulation der intrazellulären Phosphoinositid-Konzentrationen und durch den Einfluss auf die Protein-Phosphorylierung, an der Regulation der Endozytose beteiligt ist [51]. Aus diesem Grund ist es denkbar, dass die Mutation des kodierenden Gens für ein an der InsP<sub>6</sub>-Biosynthese möglicherweise beteiligtes Enzym letal sein könnte.

### 3.5.2.2 Vergleich der $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase-Aktivität von Wildtypzellen und *DdIP3/5K* -Mutanten

Nach der Isolierung der drei *DdIP3/5K* -Mutanten wurde durch Bestimmung der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase-Aktivität im Zytosol des Wildtyps und der Mutanten (Abb. 3.20), mittels HPLC-MDD-Analytik der Edukte und Produkte, der Effekt der Antisense-Mutagenese untersucht. Alle drei Mutanten zeigen eine reduzierte Enzymaktivität gegenüber dem Wildtyp, wobei die Aktivitätsabnahme bei dem *DdIP3/5K1*-Stamm am ausgeprägtesten ist (Abnahme um 55 % gegenüber dem Wildtyp). Dieser Befund konnte in fünf unabhängigen Experimenten wiederholt bestätigt werden. Aus diesem Grund wurde der Klon *DdIP3/5K1* im weiteren Verlauf dieser Arbeit benutzt. Die Unterschiede in der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase-Aktivität bei den drei *DdIP3/5K*- Mutanten sind nicht ungewöhnlich, da die Expression der Antisense-RNA von der Anzahl der ins Genom integrierten Vektor-Kopien und dem Integrationsort des Antisense-Vektors abhängig ist [109].

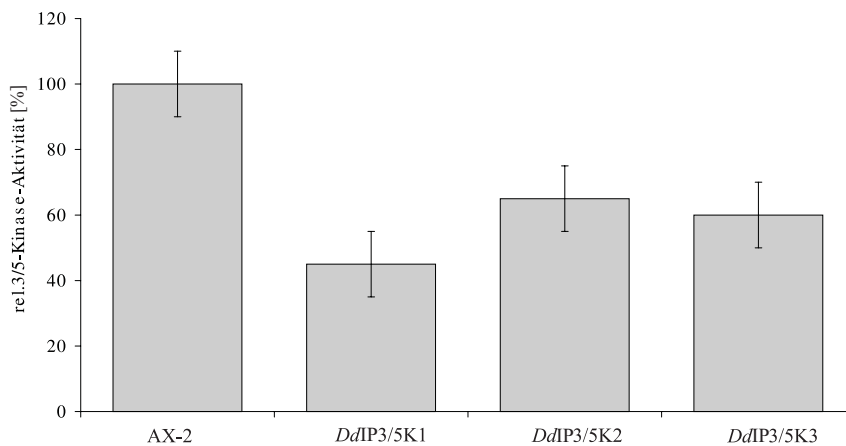


Abbildung 3.20: Vergleich der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase-Aktivität im Zytosol des Wildtyps und der mit  $\text{InsP}_6$  (0,6 mM) gewachsenen *DdIP3/5K*-Mutanten. Aktivität bestimmt mit HPLC-MDD-Analytik.

Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden bei einer Zelldichte von  $3 \cdot 10^6$  Zellen/ml geerntet. (Inkubationsbedingungen: 100 ml FM-Medium bei 22,5 °C und 120 Upm). Eingesetzt wurde ein Zellhomogenat aus  $2 \cdot 10^8$  Zellen/ml.

## 3.6 Phänotypische Charakterisierung der *DdIP3/5K1*-Mutante

### 3.6.1 Axenisches Wachstum und Differenzierung

Das Wachstum von Wildtyp und *DdIP3/5K1* wurde zunächst verglichen (Abb. 3.21). In Abwesenheit von  $\text{InsP}_6$  verlieren die *DdIP3/5K1*-Zellen im Verlauf des Entzugs ihre Adhäsivität auf hydrophilen Polystyrol-Oberflächen, runden sich ab und wachsen nicht mehr. Dagegen wächst die Mutante in Gegenwart von  $\text{InsP}_6$ . Diese zeigt jedoch einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp. Die Verdopplungszeit in der logarithmischen Wachstumsphase beträgt beim Wildtyp 11 h und bei der Mutante 16 h. Des Weiteren zeigt *DdIP3/5K1* eine geringere Zellgröße ( $9,5 \mu\text{m}$ ) als der Wildtyp ( $10,4 \mu\text{m}$ ).

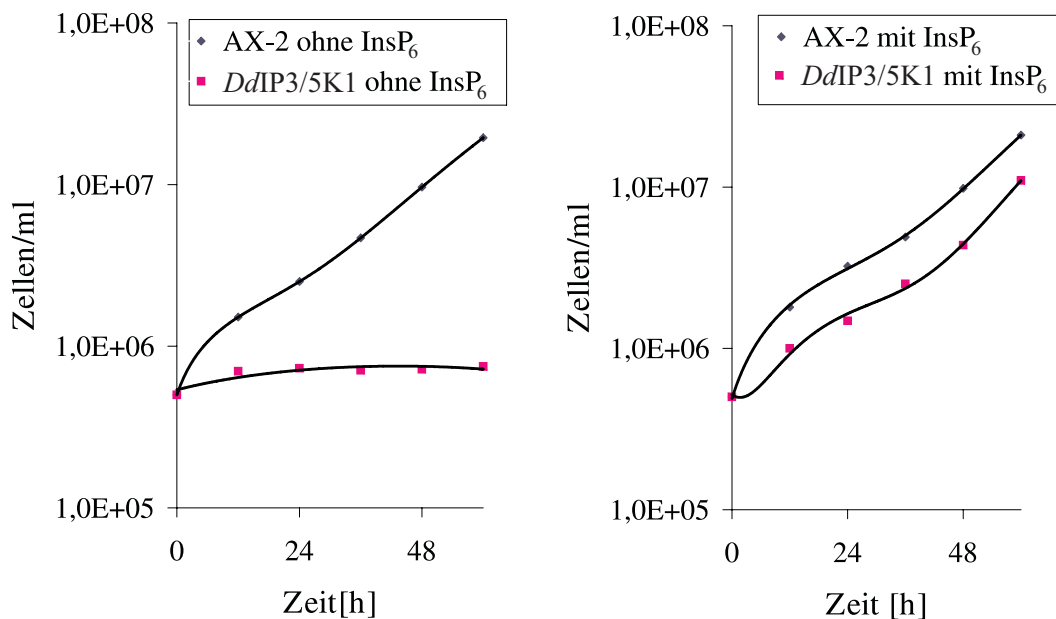


Abbildung 3.21: Wachstumsvergleich von Wildtyp und *DdIP3/5K1* ohne  $\text{InsP}_6$  (links) und mit  $0,6 \text{ mM InsP}_6$  (rechts)  
 Inkubationsbedingungen: 400 ml FM-Medium bei  $22,5 \text{ }^\circ\text{C}$  und 120 Upm

Die genomische Instabilität der *D. discoideum* Antisense-Transformanten ist dokumentiert [109]. Aus diesem Grund wurde die Mutante immer in Gegenwart von G418 kultiviert, da sie sonst ohne permanenten Selektionsdruck Kopien der integrierten Vektor-DNA verlieren könnte, mit der Folge, dass die Beobachtung eines mutationsbedingten Defekts nicht sichergestellt wäre. Die optimale G418-Konzentration für axenische Kulturen betrug 12,5  $\mu\text{g/ml}$ . Diese Konzentration hatte kaum Einfluss auf die Verdopplungszeit der Mutante, das Wachstum des Wildtyps konnte jedoch vollständig inhibiert werden.

Der Versuch, das zum Medium zugegebene  $\text{InsP}_6$  durch *myo*-Inositol zu ersetzen, führte ebenso zu keinem Wachstum von *DdIP3/5K1*. Der  $\text{InsP}_6$ -Zusatz zum Medium ist essentiell für das Wachstum von *DdIP3/5K1*. Unter Berücksichtigung der Substratspezifität der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase könnte diese Beobachtung ein Hinweis sein, auf die potentielle Beteiligung dieses Enzyms an der Synthese von  $\text{InsP}_6$  aus *myo*-Inositol. Die  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase phosphoryliert  $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$  zu  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ . Möglicherweise wird dieser entscheidende Schritt aufgrund der Verminderung der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase-Aktivität beeinflusst. Trotzdem verwundert das Einstellen des Wachstums unter  $\text{InsP}_6$ -Entzug, da die Zellen des Stammes *DdIP3/5K1* noch eine  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase Restaktivität aufweisen.

Das langsame Wachstum der Mutante könnte durch Defekte in der  $\text{InsP}_5$ - und/oder  $\text{InsP}_6$ - Synthese erklärt werden. Dies könnte zur Veränderung der intrazellulären Konzentration dieser Metabolite geführt haben. Experimente mit der Multiplen Inositolpolyphosphat Phosphatase (MIPP) der Maus haben gezeigt, dass eine Veränderung der intrazellulären Konzentration dieser Metabolite zur Verlangsamung des Wachstums führt [110]. Weiterhin wurde ein langsames Wachstum von Hefezellen bei der Erschöpfung des intrazellulären  $\text{InsP}_6$  beobachtet [48, 111].

Die postulierte Rolle der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase aus *D. discoideum* im zellulären Inositolphosphatstoffwechsel beruht auf der Beteiligung an einem „futilen“ Substratzyklus [23]. Durch Dephosphorylierung von  $\text{InsP}_6$  werden  $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$  und  $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$  im Zytosol gebildet. Die beiden  $\text{InsP}_5$ -Isomere können anschließend unter Mitwirkung

der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase wieder zu  $\text{InsP}_6$  rephosphoryliert werden. Es ist also vorstellbar, dass die  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase *in vivo* bei der homöostatischen Regulation des zellulären  $\text{InsP}_5$ - und  $\text{InsP}_6$ -Pools eine Rolle spielt.

### 3.6.2 Überlebensfähigkeit nach Inositolhexakisphosphat-Entzug

Durch die Bestimmung der Überlebensrate von *DdIP3/5K1* nach  $\text{InsP}_6$ -Entzug soll geklärt werden, ob neben dem Einstellen des Wachstums auch andere zentrale physiologische Funktionen betroffen sind.

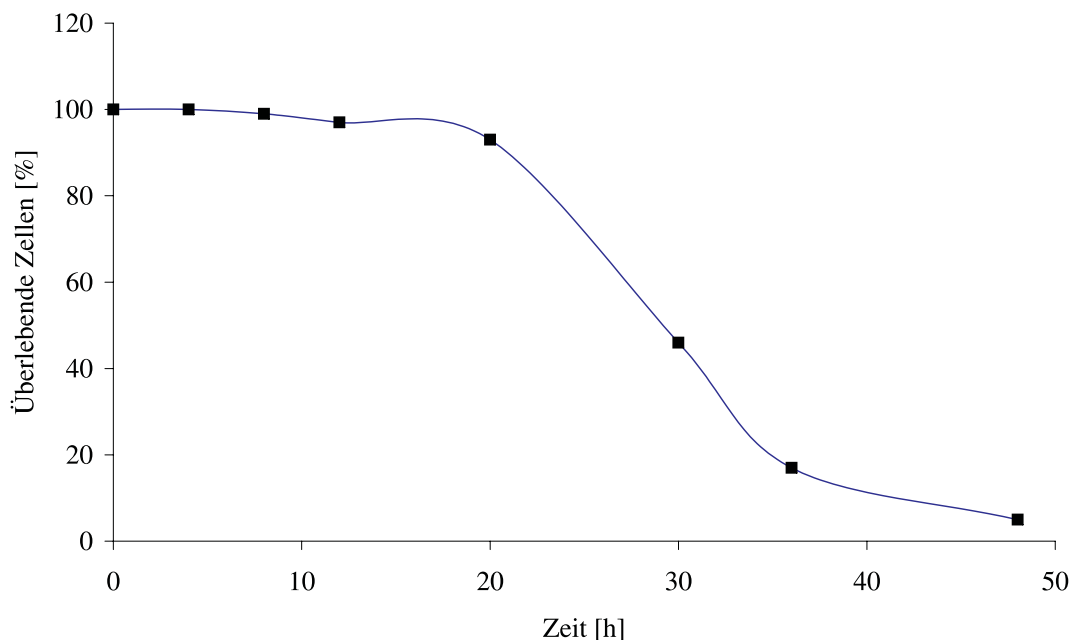


Abbildung 3.22: Überlebensrate von *DdIP3/5K1* nach  $\text{InsP}_6$ -Entzug

Zu bestimmten Zeitpunkten wurde eine definierte Zellzahl auf SM-Agarplatten in Gegenwart von *E.coli* B/r ausgestrichen und die entstehenden Plaques gezählt

Bis zu 20 h nach  $\text{InsP}_6$ -Entzug sind keine signifikanten Veränderungen bei der Überlebensrate zu beobachten (Abb. 3.22). In diesem Zeitabschnitt ist das Wachstum der



Zellen stark herabgesetzt, jedoch sterben die Zellen nicht ab. Beim  $\text{InsP}_6$ -Zusatz zum Medium beginnen die Zellen nach einer Verzögerungsphase von etwa 8 h erneut zu wachsen. Nach 20 h nimmt die Überlebensfähigkeit der Zellen rapid ab und beträgt nach 48 h nur noch circa 5 %. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass in einem Zeitabschnitt von 20 h der  $\text{InsP}_6$ -Mangel in der Zelle durch die anfangs vorhandene internalisierte  $\text{InsP}_6$ -Menge noch kompensiert werden kann. Daher wurde der Einfluss des  $\text{InsP}_6$ -Entzugs auf den Phänotyp von *DdIP3/5K1* immer nach 20 h betrachtet. Bei längeren Zeiträumen steigt die Anzahl der toten Zellen kontinuierlich an und führt zur Fehlinterpretation der Beobachtungen. Kürzere Zeitabschnitte führten zu keinem ausgeprägten Phänotyp.

Durch den  $\text{InsP}_6$ -Entzug verlieren die Zellen des Stammes *DdIP3/5K1* sehr schnell ihre Vitalität und sterben. Diese zeigen dagegen in Gegenwart von  $\text{InsP}_6$  eine zum Wildtyp vergleichbare Überlebensrate.

Bei *D. discoideum* verlaufen die Differenzierung und das Wachstum voneinander getrennt. Durch den Entzug der Nahrungsquelle wird das vegetative Wachstum eingestellt und die Differenzierung eingeleitet. Bei der Untersuchung der Differenzierung von *DdIP3/5K1* wurden mit und ohne  $\text{InsP}_6$  keine Veränderungen gegenüber dem Wildtyp festgestellt.

HPLC-MDD-Messungen haben gezeigt, dass die  $\text{InsP}_6$ -Konzentration von *D. discoideum* in der Differenzierungsphase ansteigt [31]. Leider konnte dieses Experiment aus zeitlichen Gründen mit *DdIP3/5K1* nicht mehr durchgeführt werden. Dieser Aspekt der phänotypischen Charakterisierung von *DdIP3/5K1* könnte in zukünftigen Studien geklärt werden.

### **3.6.3 Endozytische Eigenschaften**

#### **3.6.3.1 Phagozytose**

Als Phagozytose bezeichnet man die Aufnahme von extrazellulären, partikulären Substanzen. Im klassischen Sinn versteht man unter Phagozytose das Umschlingen (über die Ausbildung von Pseudopodien) von partikulären Substanzen von der Plasmamembran, wobei diese gleichzeitig die Membran des neu gebildeten Phagosoms bildet. Für Protozoen, wie z.B. Amöben, ist die Phagozytose eine Form der Nahrungsaufnahme: Große Partikel, die von Phagosomen aufgenommen wurden, gelangen schließlich in Lysosomen und die Produkte der dort stattfindenden Verdauungsvorgänge werden ins Zytosol transportiert und als Nahrung verwertet.

Die Phagozytose und der anschließende Verdau ergeben sich aus einer koordinierten Abfolge verschiedener Teilvorgänge, die durch die Bindung eines Partikels an der Zelloberfläche, das von der Aktinpolymerisation abhängige Umschlingen des Partikels und die Membran Exozytose, die Formation der Phagolysosomen einleiten.

Für die Untersuchung des Einflusses der Mutation des  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase-Gens auf die Phagozytose wurde die *DdIP3/5K1* Mutante mit carboxylierten Polystyrolpartikeln inkubiert und anschließend zeitabhängig die internalisierte Partikelanzahl pro Zelle bestimmt.

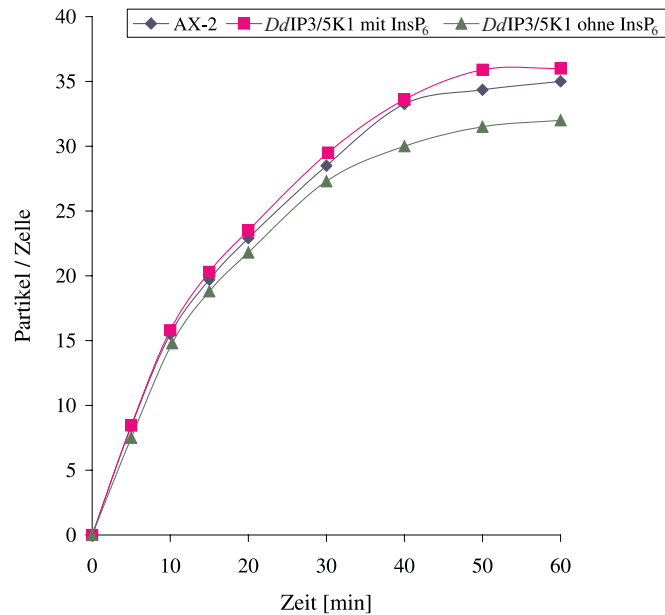


Abbildung 3.23: Vergleich der Phagozytose von carboxylierten Latexpartikeln bei AX-2 und der *DdIP3/5K1* Mutante

Zellen des Wildtyps und der *DdIP3/5K1* Mutante wurden im FM-Medium kultiviert und danach auf eine Zelldichte von  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml in Sörensens-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit hydrophilen Latexpartikeln ( $1 \mu\text{m}$ ) versetzt und mit Hilfe des Standard-Phagozytostests untersucht. Die Dauer des InsP<sub>6</sub>-Entzugs betrug 20 h

Tabelle 3.4: Parameter der Phagozytose von carboxylierten Latexpartikeln

	Partikel/Zellen/min	Partikel/Zelle
AX-2	$1,7 \pm 0,3$	$35 \pm 3$
<i>DdIP3/5K1</i> (+)	$1,7 \pm 0,2$	$36 \pm 2$
<i>DdIP3/5K1</i> (-)	$1,5 \pm 0,2$	$32 \pm 2$

Der Abbildung 3.23 ist zu entnehmen, dass die Phagozytoserate bzw. die Phagozytosekapazität der Mutante und des Wildtyps sich kaum unterscheiden. Auch nach 20 h InsP<sub>6</sub>-Entzug phagozytiert die Mutante analog zum Wildtyp.

Die Phosphoinositide und das  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  aus der Phospholipase C katalysierten Reaktion sind an der Regulation der Phagozytose beteiligt [120]. Ausgehend von der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase-Reaktion gibt es jedoch keinen Syntheseweg für die Phosphoinositide. Weiterhin haben frühere Experimente gezeigt, dass  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  kein Substrat der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase ist [29]. Demnach ist es unwahrscheinlich, dass dieses Enzym an der Synthese der Phosphoinositide und von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  bzw. Regulation deren intrazellulären Konzentrationen und somit an der Regulation der Phagozytose beteiligt sein könnte. Die Mutation des  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase-Gens dürfte keinen Einfluss auf die Phagozytose haben. Diese Vermutung konnte durch das gezeigte Ergebnis bestätigt werden.

### 3.6.3.2 Pinozytose

Als Pinozytose bezeichnet man die Aufnahme von Flüssigkeiten und löslichen Substanzen aus der Umgebung. In axenisch wachsenden *D. discoideum*-Stämmen, dient die Pinozytose der Ernährung der Zellen.

Die Abbildung 3.24 zeigt den Vergleich der Pinozytose von Wildtypzellen und der *DdIP3/5K1* Mutante.

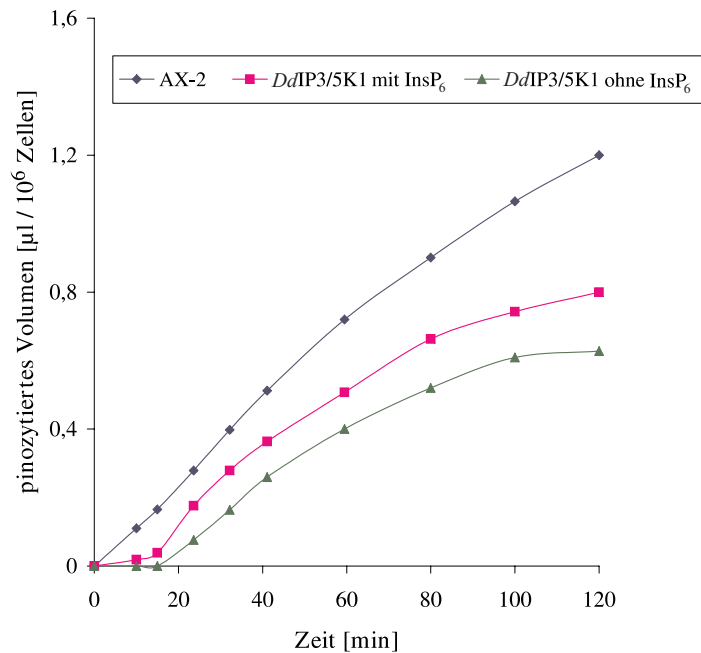


Abbildung 3.24: Vergleich des Pinozytoseverhaltens des Wildtyps und der *DdIP3/5K1* Mutante

Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden zweimal mit Sörensen-Puffer gewaschen, mit Sörensen-Puffer auf eine Zelldichte von  $2\text{-}5 \cdot 10^6$  Zellen/ml resuspendiert und das Pinozytoseverhalten untersucht. Die Dauer des InsP<sub>6</sub>-Entzugs betrug 20 h

Die in Gegenwart von 0,6 mM InsP<sub>6</sub> gewachsene Mutante zeigt zunächst eine Verzögerungsphase. Die Aufnahme von Flüssigkeit ist erst nach 10 min zu beobachten. Die Pinozytoserate der *DdIP3/5K1* Mutante ist kaum verändert. Die 20 stündige Inkubation der Mutante ohne InsP<sub>6</sub> hat ebenfalls keine signifikanten Auswirkungen auf die Pinozytoserate. Hierbei ist die Flüssigkeitsaufnahme erst nach 15 min zu beobachten. In Gegenwart von InsP<sub>6</sub> ist die gemessene Aufnahmekapazität reduziert um etwa 30 % gegenüber dem Wildtyp und beim InsP<sub>6</sub>-Entzug um etwa 40 %. Diese Abnahme kann jedoch auf die kleinere Zellgröße der *DdIP3/5K1* Mutante zurückzuführen sein.

Für die *D. discoideum* Myosin-I-Mutanten wurde eine Korrelation zwischen der herabgesetzten Fähigkeit zur Pinozytose und dem verlangsamten Wachstum auf axenischem

Medium gefunden [112]. Bei der *DdIP3/5K1* Mutante ist das Wachstum im Vergleich zum Wildtyp AX-2 in Flüssigkulturen eingeschränkt, die Pinozytosefähigkeit ist jedoch kaum verändert.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Verminderung der Expression der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase keine signifikanten Auswirkungen auf die Phagozytose und Pinozytose von *DdIP3/5K1* hat.

### 3.6.4 Inositolmetabolite

#### 3.6.4.1 Inositolphosphate

Die Abnahme der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase Aktivität der *DdIP3/5K1* Mutante und der schnelle Verlust der Vitalität beim  $\text{InsP}_6$ -Entzug führten zu der Überlegung, dass in Abwesenheit von  $\text{InsP}_6$  im Medium die intrazellulären Konzentrationen verschiedener Inositolphosphate beeinflusst werden könnten.

Die Abbildung 3.25 zeigt das Chromatogramm der AX-2 und *DdIP3/5K1* Zellextrakten im Bereich  $\text{InsP}_2$  -  $\text{InsP}_5$  in An- und Abwesenheit von  $\text{InsP}_6$ . Die Mutanten und der Wildtyp zeigen in Gegenwart von  $\text{InsP}_6$  keine signifikanten Änderungen. Im Profil beider Zelltypen ist lediglich einen Anstieg der  $\text{InsP}_3$ -Konzentration (Abb. 3.25 (a)) zu beobachten.

Überführt man *DdIP3/5K1* und AX-2 für 20 h auf ein Medium ohne  $\text{InsP}_6$ -Zusatz kommt es zu keiner Veränderung im Bereich der  $\text{InsP}_2$ -  $\text{InsP}_4$ - Isomere. Auffällig bei der Mutante ist jedoch die etwa 40 %ige Abnahme der intrazellulären Konzentration der zwei  $\text{InsP}_5$ -Isomere gegenüber dem Wildtyp (Abb. 3.25 (b)). Diese könnten aus der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase-Rückreaktion stammen. Bei der durch die  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase katalysierten Reaktion liegt das Gleichgewicht auf der Seite der  $\text{InsP}_6$ -Synthese. In Gegenwart von ADP kann es jedoch zum  $\text{InsP}_6$ -Abbau unter Bildung von  $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$  und  $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$  kommen.

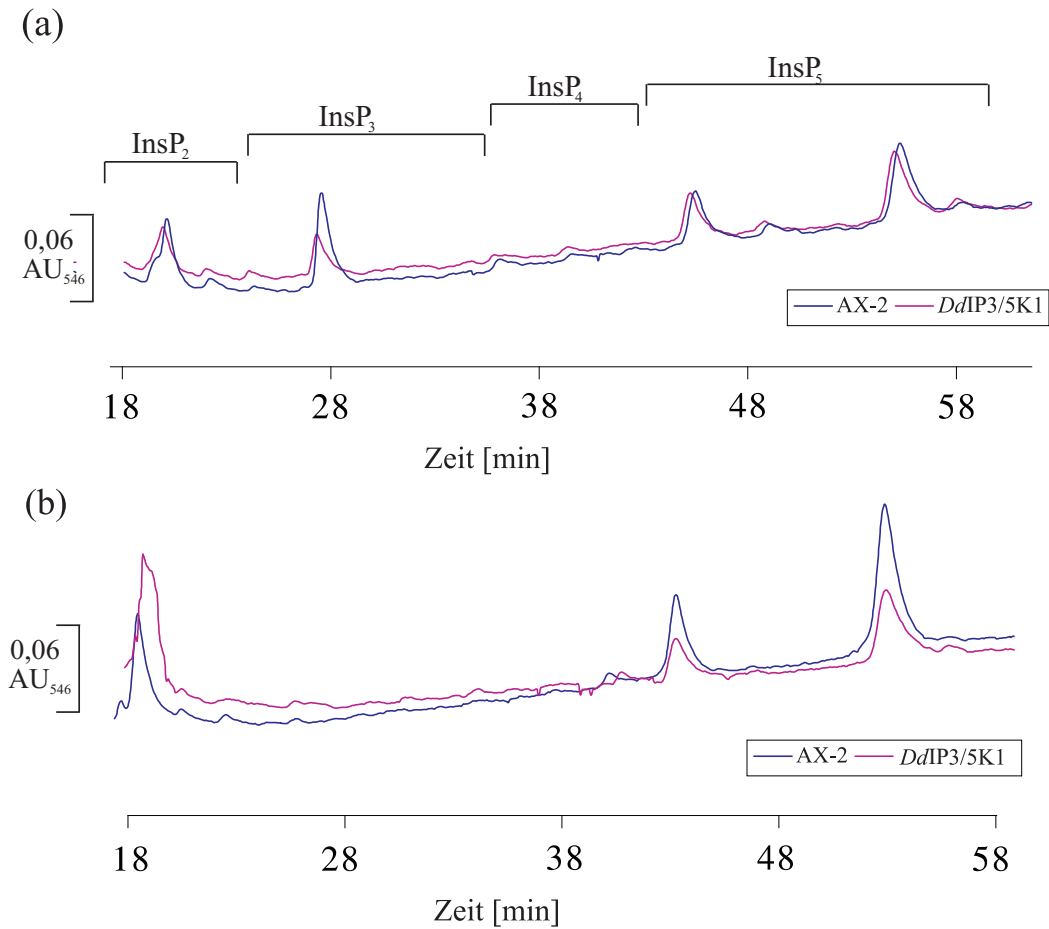


Abbildung 3.25: HPLC-MDD Analyse (saures System) von extrahierten Inositolphosphaten aus *DdIP3/5K1*

a) Inkubationsbedingungen: 400 ml FM-Medium + 0,6 mM InsP<sub>6</sub> bei 22,5 °C und 120 Upm

b) Inkubationsbedingungen: 400 ml FM-Medium ohne InsP<sub>6</sub>, 20 h, bei 22,5 °C und 120 Upm

Ein Extrakt von  $2 \cdot 10^8$  Zellen wurde jeweils eingesetzt

Der Konzentrationsabfall im InsP<sub>6</sub> freien Medium deutet darauf hin, dass die in den Mutanten noch vorhandene InsP<sub>5</sub>-(3/5)-Kinase-Aktivität nicht ausreicht, um die intrazelluläre Konzentration von Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> und Ins(1,2,3,4,6)P<sub>5</sub> aufrechtzuerhalten.

Wenn man die Gleichgewichtslage der durch die  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase katalysierten Reaktion bedenkt, bleibt dennoch verwunderlich, dass die Rückreaktion zu Veränderungen im Metabolitspektrum führt.

Die Abnahme der  $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$ - und  $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$ -Konzentration in der *DdIP3/5K1* Mutante lässt Veränderungen der intrazellulären  $\text{InsP}_6$ -Konzentration vermuten. Diese wird im nachfolgenden Abschnitt bestimmt.

### 3.6.4.2 Inositolhexakisphosphat und Diphosphoinositolphosphate

Der Vergleich der intrazellulären  $\text{InsP}_6$ -Konzentration von Wildtypzellen und *DdIP3/5K1* Mutante nach  $\text{InsP}_6$ -Entzug zeigt, im Gegensatz zu den Erwartungen (siehe Abschnitt 3.6.2.1), keine signifikanten Unterschiede (Abb. 3.26 a). Durch den Zusatz von 0,6 mM  $\text{InsP}_6$  zum Medium konnte auch keine Konzentrationsveränderungen von  $\text{InsP}_6$  festgestellt werden (Abb. 3.26 b).

Hierfür kommen verschiedene Erklärungen in Frage:

- a) Ein alternativer Weg zur Synthese von  $\text{InsP}_6$ , der die intrazelluläre  $\text{InsP}_6$ -Konzentration konstant halten würde. Die in der Literatur postulierten physiologischen Funktionen des  $\text{InsP}_6$ , wie z.B. die Beteiligung am mRNA-Export aus dem Zellkern [48], deuten darauf hin, dass die Aufrechterhaltung der  $\text{InsP}_6$ -Konzentration essentiell für lebenswichtige Funktionen in der Zelle ist. In vielen Organismen wird  $\text{InsP}_6$  durch Phosphorylierung von  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  gebildet. Eine  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase katalysiert diese Reaktion. Die  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase wurde bereits aus verschiedenen Organismen isoliert und charakterisiert [67, 68]. Aus *D. discoideum* wurde das Enzym allerdings noch nicht isoliert. In der Literatur sind jedoch Hinweise auf eine Beteiligung der  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase an der Synthese von  $\text{InsP}_6$  in *D. discoideum* zu finden [23, 113]. Drei  $\text{InsP}_5$ -Isomeren wurden als Substrate von  $\text{InsP}_5$ -Hydroxykinase(n) nachgewiesen, wobei die *de novo* Biosynthese von  $\text{InsP}_6$  exklusiv über  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  erfolgte.



b) In *D. discoideum* gibt es möglicherweise eine Kompartimentierung des  $\text{InsP}_6$ . In einem Kompartiment könnte der größte Teil des zellulären  $\text{InsP}_6$  gebunden vorliegen. Der Rest könnte z.B. im Zytosol frei vorliegen und am Stoffwechsel beteiligt sein. Im Zytosol und im Zellkern beträgt die maximale Konzentration des freivorliegenden  $\text{InsP}_6$  laut Literatur Angaben nur  $49\mu\text{M}$  [114]. Aufgrund der Zerstörung aller Organellen beim Zellaufschluss konnte nur die gesamte intrazelluläre  $\text{InsP}_6$ -Konzentration bestimmt werden. Eine Fluktuation der am Stoffwechsel beteiligten geringeren  $\text{InsP}_6$ -Menge läge im Rahmen der Fehlergrenzen und wäre nicht detektierbar. Zieht man eine Kompartierung des  $\text{InsP}_6$  in Betracht, so könnte die  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-kinase in *D. discoideum* lediglich an der Aufrechterhaltung der Konzentration aber nicht an der Biosynthese von  $\text{InsP}_6$  beteiligt sein.

Hinweise auf eine Kompartimentierung des  $\text{InsP}_6$  in *D. discoideum* sind in der Literatur zu finden. Es wird vermutet, dass  $\text{InsP}_6$  in so genannten „mass-dense granules“ oder „polyphosphate bodies“ abgelagert wird [114]. Es handelt sich um Phosphat-, Magnesium- und Calciumreiche, acidische Organellen, die den kontraktile Vakuolen ähneln [115–117]. Diese wurden im Zytosol, Zellkern und in den Mitochondrien der *D. discoideum*-Zellen nachgewiesen.

Neben der intrazellulären  $\text{InsP}_6$ -Konzentration wurde ebenfalls die seiner pyrophosphorylierten Derivate, 6-PP- $\text{InsP}_5$  ( $\text{InsP}_7$ ), 5-PP- $\text{InsP}_5$  ( $\text{InsP}_7$ ) und 5,6-bis-PP- $\text{InsP}_4$  ( $\text{InsP}_8$ ), bestimmt. Die intrazellulären Konzentrationen dieser Diphosphoinositolphosphate liegen bei *D. discoideum* zwischen 10-300  $\mu\text{M}$  und sind damit bis zu 300-fach höher als in Säugerzellen [31, 34]. Der Vergleich der Metabolitkonzentrationen von Wildtypzellen und der *DdIP3/5K1* Mutante zeigte unabhängig von einer  $\text{InsP}_6$ -Supplementierung keine relevanten Veränderungen der  $\text{InsP}_7$ - und  $\text{InsP}_8$ -Konzentrationen (Abb. 3.26).

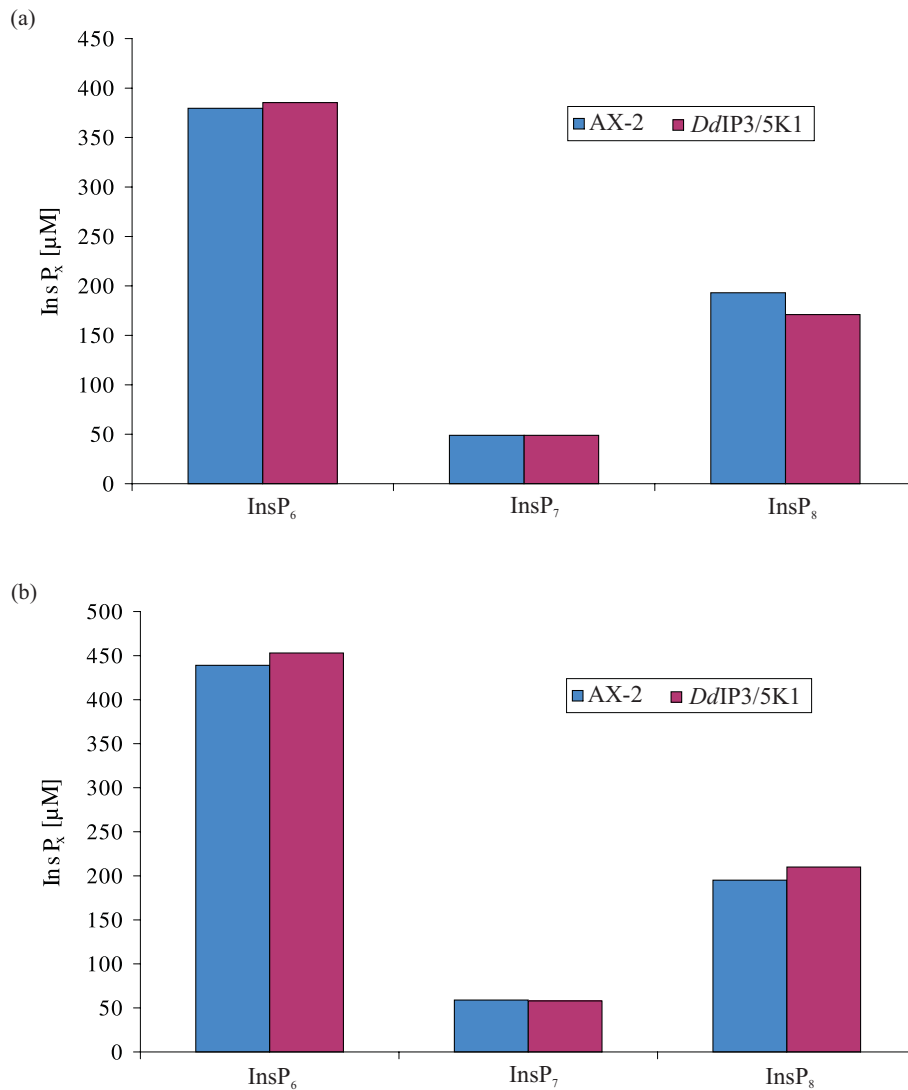


Abbildung 3.26: InsP<sub>6</sub>, InsP<sub>7</sub> und InsP<sub>8</sub> Intrazelluläre Konzentration von Wildtypzellen und *DdIP3/5K1* Mutante

a) Inkubationsbedingungen: 400 ml FM-Medium ohne InsP<sub>6</sub>, 20 h, bei 22,5 °C und 120 Upm

b) Inkubationsbedingungen: 400 ml FM-Medium + 0,6 mM InsP<sub>6</sub> bei 22,5 °C und 120 Upm

Ein Extrakt von  $1 \cdot 10^7$  Zellen wurde jeweils eingesetzt.

Über die physiologische Bedeutung der Diphosphoinositolphosphate ist nur wenig bekannt. Pyrophosphorylierte InsP<sub>6</sub>-Derivate sind „energiereiche“ Verbindungen mit ho-

hem Phosphatgruppenübertragungspotential, ähnlich dem von ATP. Als solche könnten sie, vom energetischen Standpunkt gesehen, Proteine phosphorylieren und auf diesem Weg regulatorische Aufgaben übernehmen. Die mögliche Funktion als direkter Phosphatgruppendonator für Proteine wurde bereits in der Literatur beschrieben [41, 118].

Die Deletion der  $\text{InsP}_6$ -Kinase in Hefen führte zu Defekten in der Vakuolenmorphogenese [39] und in der Endozytose [42]. Veränderte  $\text{InsP}_7/\text{InsP}_8$ -Konzentrationen beeinflussen außerdem die DNA-Hyperrekombination [119] und DNA-Endjoining-Prozesse [50] sowie den mRNA-Export aus dem Zellkern [111]. Deletionsmutanten der Inositolhexakisphosphat-Kinase bei *D. discoideum* zeigen jedoch nur wenige phänotypische Veränderungen. Es wurden keine Änderungen in der Endozytose, im Zellwachstum und in der Zellgröße festgestellt [43].

Diese Untersuchungen zu physiologischen Funktionen der pyrophosphorylierten  $\text{InsP}_6$ -Derivate geben Hinweise auf ihrer Rolle als intrazelluläre Signalmoleküle. Bisher wurde die Regulation des Diphosphoinositolphosphate-Stoffwechsels in *D. discoideum* nicht im Detail untersucht. Die Bestimmung der intrazellulären Konzentrationen der Diphosphoinositolphosphate (Abb. 3.26) liefert keinen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase und diesem Regulationsmechanismus.

### 3.6.4.3 *myo*-Inositol

*D. discoideum* besitzt einen sehr komplexen Inositolphosphatstoffwechsel. Es sind Phosphohydrolasen bekannt, die hochphosphorylierte Inositolphosphate teilweise bis zum *myo*-Inositol abbauen können. Hierbei hat sich die Mehrzahl der Inositolphosphate aus dem Phytase-Abbau als Substrate der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase erwiesen [24]. Ein weiteres Indiz für das Zusammenwirken der Phytase und der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase bei dem  $\text{InsP}_6$ -Abbau liefern die HPLC-MDD-Analyse der Inositolphosphate aus der enzymatischen Umsetzung von  $\text{InsP}_6$  durch die Phytase und die  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase und der Vergleich mit den aus Zellen extrahierten  $\text{InsP}_x$ -Metaboliten [107].

An dem Abbau von internalisiertem  $\text{InsP}_6$  ist des Weiteren die  $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphohydrolase involviert [107]. Das Enzym katalysiert nicht die Dephosphorylierung von  $\text{InsP}_6$ . Die erste Phosphatgruppe muss bereits abgespalten sein, bevor das Enzym in den Abbau eingreifen kann. Diese Einstiegsreaktion in den Stoffwechsel kann von der Phytase oder unter gewissen Bedingungen auch von der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase katalysiert werden. Im letzteren Fall bedarf es der Gegenwart von ADP, um eine Rückreaktion zu ermöglichen. Obwohl das Gleichgewicht der Reaktionen auf der Seite der  $\text{InsP}_6$ -Synthese liegt, kann es bei kontinuierlichem Entfernen der gebildeten  $\text{InsP}_5$ -Isomere zu einem  $\text{InsP}_6$ -Abbau kommen.

Die oben erwähnten Kenntnisse führten zu der Überlegung, dass die Reduzierung der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase-Aktivität in der Mutante, Auswirkungen auf die Bildung von freiem *myo*-Inositol aus  $\text{InsP}_6$  haben könnte. Um diesen Gesichtspunkt zu klären wurde die *DdIP3/5K1* Mutante in An- und Abwesenheit von 0,6 mM  $\text{InsP}_6$  kultiviert. Zum Vergleich wurden Wildtypzellen genauso behandelt. Die Bestimmung des *myo*-Inositol-Gehalts der Zellen erfolgte nach der von Fischbach et al. beschriebenen Methode [14].

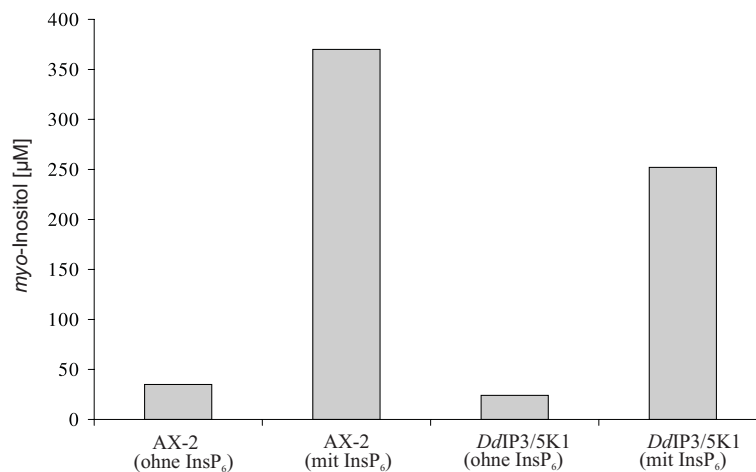


Abbildung 3.27: Intrazelluläre *myo*-Inositolkonzentration von Wildtyp und *DdIP3/5K1* Mutante

Zellen des Wildtyps und der *DdIP3/5K1* Mutante wurden in FM-Medium mit und ohne 0,6 mM  $\text{InsP}_6$  kultiviert (400 ml, 22,5 °C und 120 Upm). Die Dauer des  $\text{InsP}_6$ -Entzugs betrug 20 h

In Abwesenheit von  $\text{InsP}_6$  zeigte die Mutante eine um 30 % geringere intrazelluläre *myo*-Inositol Konzentration ( $24 \mu\text{M}$ ) verglichen mit dem Wildtyp ( $35 \mu\text{M}$ ) (Abb. 3.27). In Anwesenheit von  $\text{InsP}_6$  stieg die intrazelluläre *myo*-Inositol Konzentration sowohl beim Wildtyp als bei der Mutante. Dieses Ergebnis korreliert mit den schon zitierten Ergebnissen, nach denen die Zugabe von  $\text{InsP}_6$  zu Inositolfreien axenischen Kulturen den Inositol-Pool der Zelle beeinflusste [107]. Durch den Abbau von  $\text{InsP}_6$  reicherte sich das *myo*-Inositol in der Zelle an. Die intrazelluläre *myo*-Inositol Konzentration in Gegenwart von  $\text{InsP}_6$  im Medium ist ebenfalls in der Mutante um 30 % kleiner als beim Wildtyp.

Der  $\text{InsP}_6$ -Abbau und die Freisetzung von Inositol scheint in der *DdIP3/5K1* Mutante langsamer zu verlaufen als beim Wildtyp. Diese Beobachtung liefert einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung der  $\text{InsP}_5$ -(3/5)-Kinase an dem  $\text{InsP}_6$ -Abbau.

Ein Rückgang der intrazellulären *myo*-Inositol Konzentration wurde auch bei den Phytase Mutanten (früherer Enzymname MIPP, Multiple Inositol Polyphosphat Phosphatase) beobachtet [S. Adelt, persönliche Mitteilung]. Bei einer 24 stündigen Inkubation mit  $1 \text{ mM}$   $\text{InsP}_6$  setzte diese Mutante, gemittelt über das Zellvolumen,  $350 \mu\text{M}$  Inositol frei während der Wildtyp die 2,5-fache Menge freisetzte.

## KAPITEL 4

---

### Fazit und Ausblick

---

*Dictyostelium discoideum* zeigt einen sehr komplexen Inositolphosphatstoffwechsel, an dem ungefähr 25 verschiedene Inositolphosphate beteiligt sind. In *D. discoideum* stellt InsP<sub>6</sub> das häufigst vorkommende Inositolphosphat dar. InsP<sub>6</sub> wird in Zellhomogenaten durch die Phytase zunächst zu den beiden InsP<sub>5</sub>-Isomeren Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> und Ins(1,2,3,4,6)P<sub>5</sub> dephosphoryliert. Diese beiden Produkte können durch die Inositolpentakisphosphat-(3/5)-Kinase zurück zu InsP<sub>6</sub> phosphoryliert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Inositolpentakisphosphat-(3/5)-Kinase in *D. discoideum* bis zur Homogenität gereinigt, sequenziert und das zugehörige kodierende Gen identifiziert. Das monomere zytosolische Protein hat ein Molekulargewicht von 32,5 kDa und weist die für die Inositolphosphat Kinase-Familie charakteristische funktionsbezogenen Domänen, wie die ATP- und Inositolphosphat-Bindestelle, auf. Die Identifizierung des Inositolpentakisphosphat-(3/5)-Kinase Gens stellt einen wichtigen Schritt zur Aufklärung der zwischen InsP<sub>6</sub> und den beiden erwähnten InsP<sub>5</sub>-Isomeren bestehenden energieverbrauchenden Zyklen sowie der physiologischen Funktion des InsP<sub>6</sub> dar. Dazu sollten Mutanten der Inositolpentakisphosphat-(3/5)-Kinase generiert

werden.

Versuche zur Erzeugung von knock-out-Mutanten durch homologe Rekombination brachten keinen Erfolg. Es konnte jedoch Inositolpentakisphosphat-(3/5)-Kinase-Mutanten über Antisense-Mutagenese generiert werden. Die erzeugte Zelllinie weist eine verminderte Expression der Inositolpentakisphosphat-(3/5)-Kinase auf sowie Defekten im Wachstum auf axenischem Medium. Auffällig bei den Mutanten ist, dass das axenische Wachstum maßgeblich von einem  $\text{InsP}_6$ -Zusatz zum Medium abhängig ist. In Abwesenheit von  $\text{InsP}_6$  verlieren die Zellen im Verlauf des Entzugs ihre Adhäsivität auf hydrophilen Polystyrol-Oberflächen, runden sich ab und stellen das Wachstum ein. In den ersten 20 h ist dieser Vorgang reversibel: Beim  $\text{InsP}_6$ -Zusatz zum Medium beginnen die Zellen nach einer Verzögerungsphase erneut zu wachsen. In dem Zeitraum von 20 h nach dem  $\text{InsP}_6$ -Entzug sind die Zellen noch vital. Danach nimmt die Überlebensfähigkeit der Zellen rapide ab und beträgt nach 48 h nur noch 5 %. Offensichtlich schützt  $\text{InsP}_6$  die Zellen vor dem Absterben. Demnach ist es essentiell für das axenische Wachstum der Mutante. Der Verlust der Vitalität könnte eine Reaktion auf Veränderungen im Metabolit-Spektrum sein, denn der  $\text{InsP}_6$ -Entzug führt zu einer Abnahme der intrazellulären Konzentrationen der vermutlich aus der Inositolpentakisphosphat-(3/5)-Kinase Rückreaktion stammenden beiden  $\text{InsP}_5$ -Isomeren. Entgegen den Erwartungen zeigt die intrazelluläre Konzentration von  $\text{InsP}_6$  unabhängig von dem  $\text{InsP}_6$ -Entzug keine Veränderung. Möglicherweise liegt der größte Teil von  $\text{InsP}_6$  in einem zellulären Kompartiment gebunden vor. Der kleinere Rest könnte z.B im Zytosol frei vorliegen. Der  $\text{InsP}_5$ -Pool steht vermutlich im Gleichgewicht mit dem letzteren. Aus diesem Grund wird bei der Bestimmung der intrazellulären Konzentrationen von  $\text{InsP}_5$  und  $\text{InsP}_6$  eine Veränderung der  $\text{InsP}_5$ - aber nicht der  $\text{InsP}_6$ -Konzentration beobachtet, da hier eine Durchmischung der beiden  $\text{InsP}_6$ -Pools nicht vermieden werden kann. Die physiologische Funktion der Inositolpentakisphosphat-(3/5)-Kinase konnte nicht eindeutig geklärt werden. Jedoch ist eine Beteiligung an der Biosynthese von  $\text{InsP}_6$  in *D. discoideum* nicht auszuschließen. Die Veränderungen im  $\text{InsP}_x$ -Stoffwechsel deuten aber auf eine Beteiligung dieses Enzyms an der Aufrechterhaltung der Konzentrationen

von  $\text{InsP}_5$  und  $\text{InsP}_6$ , die vermutlich für das Wachstum erforderlich ist.

Im Vergleich zum Wildtyp zeigt die Mutante in Gegenwart von  $\text{InsP}_6$  eine geringere Wachstumsrate in axenischer Kultur. Die Pinozytose unterscheidet sich nur unerheblich vom Wildtyp. Es stellt sich die Frage, warum die in axenischer Kultur ausschlaggebende Pinozytose bei der langsam wachsenden Mutante kaum beeinträchtigt ist.

Die Untersuchung der physiologischen Funktionen verschiedener Inositolmetabolite in *D. discoideum*, insbesondere von  $\text{InsP}_6$ , sollten die Schwerpunkte weiterer Forschungsarbeiten sein.

Es sollte versucht werden, die an der Biosynthese von  $\text{InsP}_6$  beteiligten Enzyme nachzuweisen. Aufschlussreich wäre der Nachweis der  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase Aktivität in *D. discoideum*. Ausgehend von dem in verschiedenen Organismen bereits identifizierten  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase-Gen könnte durch Homologiesuche das Enzym, dessen Nachweis proteinchemisch bislang nicht gelungen ist, identifiziert werden. Dies hätte eine zentrale Bedeutung für die Aufklärung der Biosynthese sowie der Regulation von  $\text{InsP}_6$ .

Die Erzeugung von Doppelmutanten mit Defekten in der Inositolpentakisphosphat-(3/5)-Kinase und der Phytase könnte zum Verständnis des bislang kaum untersuchten Katabolismus von  $\text{InsP}_6$  beitragen. Letzteres könnte das Zusammenspiel der beiden Enzyme an der Bildung von niedrigphosphorylierten Inositolphosphaten belegen.

Von besonderem Interesse ist der Wachstumsdefekt der Inositolpentakisphosphat-(3/5)-Kinase Mutanten in axenischer Kultur beim  $\text{InsP}_6$ -Entzug. Möglicherweise ist die Zytokinese der Zellen gestört. Dies konnte aus zeitlichen Gründen nicht eingehender untersucht werden. Diese Hypothese bietet einen Ansatzpunkt für weitere Studien.



---

## Literaturverzeichnis

---

- [1] BILLINGTON, D. C. ; WEINHEIM, VCH V. (Hrsg.): *The Inositol Phosphates. Chemical Synthesis and Biological Significance*. VCH Verlagsgesellschaft Weinheim, 1993
- [2] NC-IUB: Numbering of atoms in myo-inositol. Recommendations 1988. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry. In: *Biochem J* 258 (1989), Feb, Nr. 1, S. 1–2
- [3] AGRANOFF, B. W.: Cyclitol confusion. In: *Trends Biochem. Sci.* 3 (1978), S. 283–285
- [4] BREFELD, O.: Dictyostelium mucoroides. Ein neuer Organismus aus der Verwandtschaft der Myxomyceten. In: *Abh. Senckenb. Naturforsch. Ges.* 7 (1869), S. 85–107
- [5] RAPER, K. B.: Dictyostelium discoideum, a new species of slime mold from decaying forest leaves. In: *J. Agr. Res.* 50 (1935), S. 135–147
- [6] VOGEL, G. ; THILO, L. ; SCHWARZ, H. ; STEINHART, R.: Mechanism of phagocytosis in Dictyostelium discoideum: phagocytosis is mediated by different

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- recognition sites as disclosed by mutants with altered phagocytotic properties.  
In: *J Cell Biol* 86 (1980), Aug, Nr. 2, S. 456–465
- [7] WATTS, D. J. ; ASHWORTH, J. M.: Growth of myxameobae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. In: *Biochem J* 119 (1970), Sep, Nr. 2, S. 171–174
- [8] SUSSMAN, R. ; SUSSMAN, M.: Cultivation of *Dictyostelium discoideum* in axenic medium. In: *Biochem Biophys Res Commun* 29 (1967), Oct, Nr. 1, S. 53–55
- [9] BALDAUF, S. L. ; DOOLITTLE, W. F.: Origin and evolution of the slime molds (Mycetozoa). In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997), Oct, Nr. 22, S. 12007–12012
- [10] EICHINGER ET AL., L.: The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. In: *Nature* 435 (2005), May, Nr. 7038, S. 43–57
- [11] DRAYER, A. L. ; DER KAAAY, J. V. ; MAYR, G. W. ; HAASTERT, P. J. V.: Role of phospholipase C in *Dictyostelium*: formation of inositol 1,4,5-trisphosphate and normal development in cells lacking phospholipase C activity. In: *EMBO J* 13 (1994), Apr, Nr. 7, S. 1601–1609
- [12] FRANKE, J. ; KESSIN, R.: A defined minimal medium for axenic strains of *Dictyostelium discoideum*. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (1977), May, Nr. 5, S. 2157–2161
- [13] VAN HAASTERT, P. J. ; VAN DIJKEN, P.: Biochemistry and genetics of inositol phosphate metabolism in *Dictyostelium*. In: *FEBS Lett* 410 (1997), Jun, Nr. 1, S. 39–43
- [14] FISCHBACH, Andreas ; ADEL, Stephan ; MÜLLER, Alexander ; VOGEL, Günter: Disruption of inositol biosynthesis through targeted mutagenesis in *Dictyo-*

- stelium discoideum: generation and characterization of inositol-auxotrophic mutants. In: *Biochem J* 397 (2006), Aug, Nr. 3, S. 509–518
- [15] BOMINAAR, A. A. ; VAN DER KAAJ, J. ; VAN HAASTERT, P. J.: Dynamics and function of the inositolcycle in Dictyostelium discoideum. In: *Dev Genet* 12 (1991), Nr. 1-2, S. 19–24
- [16] SYLVIA, V. ; CURTIN, G. ; NORMAN, J. ; STEC, J. ; BUSBEE, D.: Activation of a low specific activity form of DNA polymerase alpha by inositol-1,4-bisphosphate. In: *Cell* 54 (1988), Aug, Nr. 5, S. 651–658
- [17] DIJKEN, P. V. ; DE HAAS, J. R. ; CRAXTON, A. ; ERNEUX, C. ; SHEARS, S. B. ; HAASTERT, P. J. V.: A novel, phospholipase C-independent pathway of inositol 1,4,5-trisphosphate formation in Dictyostelium and rat liver. In: *J Biol Chem* 270 (1995), Dec, Nr. 50, S. 29724–29731
- [18] VERJANS, B. ; MOREAU, C. ; ERNEUX, C.: The control of intracellular signal molecules at the level of their hydrolysis: the example of inositol 1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase. In: *Mol Cell Endocrinol* 98 (1994), Jan, Nr. 2, S. 167–171
- [19] IRVINE, R. F. ; LETCHER, A. J. ; STEPHENS, L. R. ; MUSGRAVE, A.: Inositol polyphosphate metabolism and inositol lipids in a green alga, Chlamydomonas eugametos. In: *Biochem J* 281 ( Pt 1) (1992), Jan, S. 261–266
- [20] DER KAAJ, J. V. ; WESSELING, J. ; HAASTERT, P. J. V.: Nucleus-associated phosphorylation of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> to InsP<sub>6</sub> in Dictyostelium. In: *Biochem J* 312 ( Pt 3) (1995), Dec, S. 911–917
- [21] BERRIDGE, M. J. ; IRVINE, R. F.: Inositol phosphates and cell signalling. In: *Nature* 341 (1989), Sep, Nr. 6239, S. 197–205
- [22] XIA, Hui J. ; YANG, Guang: Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinases: functions and regulations. In: *Cell Res* 15 (2005), Feb, Nr. 2, S. 83–91

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- [23] STEPHENS, L. R. ; IRVINE, R. F.: Stepwise phosphorylation of myo-inositol leading to myo-inositol hexakisphosphate in *Dictyostelium*. In: *Nature* 346 (1990), Aug, Nr. 6284, S. 580–583
- [24] KNIPP, M. *Untersuchungen zum enzymatischen Abbau von Inositolphosphaten in Dictyostelium discoideum- Ein myo-Inositolhexakisphosphat hydrolysierendes Enzym und seine Produkte: Isolierung und Charakterisierung*. Diplomarbeit im Fachbereich Chemie der Bergischen Universität Wuppertal. 1996
- [25] ADELT, S. ; PLETTENBURG, O. ; STRICKER, R. ; REISER, G. ; ALTENBACH, H. J. ; VOGEL, G.: 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. In: *J Med Chem* 42 (1999), Apr, Nr. 7, S. 1262–1273
- [26] SHEARS, Stephen B.: How versatile are inositol phosphate kinases? In: *Biochem J* 377 (2004), Jan, Nr. Pt 2, S. 265–280
- [27] IRVINE, R. F. ; SCHELL, M. J.: Back in the water: the return of the inositol phosphates. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (2001), May, Nr. 5, S. 327–338
- [28] HO, M. W. ; KAETZEL, M. A. ; ARMSTRONG, D. L. ; SHEARS, S. B.: Regulation of a human chloride channel. a paradigm for integrating input from calcium, type ii calmodulin-dependent protein kinase, and inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate. In: *J Biol Chem* 276 (2001), Jun, Nr. 22, S. 18673–18680
- [29] UBEIDAT, M.: *Inositol Phosphate Metabolism in Dictyostelium discoideum Purification and Characterization of a myo-Inositol Pentakisphosphate 3/5-Kinase*, Fachbereich Chemie der Bergischen Universität Wuppertal, Diss., 1999
- [30] DOWNES, C. P. ; MACPHEE, C. H.: myo-inositol metabolites as cellular signals. In: *Eur J Biochem* 193 (1990), Oct, Nr. 1, S. 1–18

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- [31] LAUSSMANN, T. ; PIKZACK, C. ; THIEL, U. ; MAYR, G. W. ; VOGEL, G.: Diphospho-myo-inositol phosphates during the life cycle of Dictyostelium and Polysphondylium. In: *Eur J Biochem* 267 (2000), Apr, Nr. 8, S. 2447–2451
- [32] LAUSSMANN, T. ; EUJEN, R. ; WEISSHUHN, C. M. ; THIEL, U. ; VOGEL, G.: Structures of diphospho-myo-inositol pentakisphosphate and bisdiphospho-myo-inositol tetrakisphosphate from Dictyostelium resolved by NMR analysis. In: *Biochem J* 315 ( Pt 3) (1996), May, S. 715–720
- [33] LAUSSMANN, T. ; REDDY, K. M. ; REDDY, K. K. ; FALCK, J. R. ; VOGEL, G.: Diphospho-myo-inositol phosphates from Dictyostelium identified as D-6-diphospho-myo-inositol pentakisphosphate and D-5,6-bisdiphospho-myo-inositol tetrakisphosphate. In: *Biochem J* 322 ( Pt 1) (1997), Feb, S. 31–33
- [34] LAUSSMANN, T. ; DISSERTATION, Shaker V. (Hrsg.): *Diphosphoinositolphosphate in Dictyosteliden Strukturen und Stoffwechsel*. Dissertation, Shaker Verlag, 1999
- [35] ALI, N. ; DUDEN, R. ; BEMBENEK, M. E. ; SHEARS, S. B.: The interaction of coatomer with inositol polyphosphates is conserved in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Biochem J* 310 ( Pt 1) (1995), Aug, S. 279–284
- [36] BREARLEY, C. A. ; HANKE, D. E.: Inositol phosphates in barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone tissue are stereochemically similar to the products of breakdown of InsP6 in vitro by wheat-bran phytase. In: *Biochem J* 318 ( Pt 1) (1996), Aug, S. 279–286
- [37] ALBERT, C. ; SAFRANY, S. T. ; BEMBENEK, M. E. ; REDDY, K. M. ; REDDY, K. ; FALCK, J. ; BRÖCKER, M. ; SHEARS, S. B. ; MAYR, G. W.: Biological variability in the structures of diphosphoinositol polyphosphates in Dictyostelium discoideum and mammalian cells. In: *Biochem J* 327 ( Pt 2) (1997), Oct, S. 553–560

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- [38] SAIARDI, A. ; ERDJUMENT-BROMAGE, H. ; SNOWMAN, A. M. ; TEMPST, P. ; SNYDER, S. H.: Synthesis of diphosphoinositol pentakisphosphate by a newly identified family of higher inositol polyphosphate kinases. In: *Curr Biol* 9 (1999), Nov, Nr. 22, S. 1323–1326
- [39] SAIARDI, A. ; CAFFREY, J. J. ; SNYDER, S. H. ; SHEARS, S. B.: The inositol hexakisphosphate kinase family. Catalytic flexibility and function in yeast vacuole biogenesis. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Aug, Nr. 32, S. 24686–24692
- [40] SAIARDI, A. ; NAGATA, E. ; LUO, H. R. ; SAWA, A. ; LUO, X. ; SNOWMAN, A. M. ; SNYDER, S. H.: Mammalian inositol polyphosphate multikinase synthesizes inositol 1,4,5-trisphosphate and an inositol pyrophosphate. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001), Feb, Nr. 5, S. 2306–2311
- [41] VOGLMAIER, S. M. ; BEMBENEK, M. E. ; KAPLIN, A. I. ; DORMÁN, G. ; OLSZEWSKI, J. D. ; PRESTWICH, G. D. ; SNYDER, S. H.: Purified inositol hexakisphosphate kinase is an ATP synthase: diphosphoinositol pentakisphosphate as a high-energy phosphate donor. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996), Apr, Nr. 9, S. 4305–4310
- [42] SAIARDI, Adolfo ; SCIAMBI, Catherine ; MCCAFFERY, J. M. ; WENDLAND, Beverly ; SNYDER, Solomon H.: Inositol pyrophosphates regulate endocytic trafficking. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002), Oct, Nr. 22, S. 14206–14211
- [43] LUO, Hongbo R. ; HUANG, Yi E. ; CHEN, Jianmeng C. ; SAIARDI, Adolfo ; IJIMA, Miho ; YE, Keqiang ; HUANG, Yunfei ; NAGATA, Eiichiro ; DEVREOTES, Peter ; SNYDER, Solomon H.: Inositol pyrophosphates mediate chemotaxis in *Dictyostelium* via pleckstrin homology domain-PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> interactions. In: *Cell* 114 (2003), Sep, Nr. 5, S. 559–572

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- [44] RABOY, Victor: myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. In: *Phytochemistry* 64 (2003), Nov, Nr. 6, S. 1033–1043
- [45] LEMTIRI-CHLIEH, F. ; MACROBBIE, E. A. ; BREARLEY, C. A.: Inositol hexakisphosphate is a physiological signal regulating the K<sup>+</sup>-inward rectifying conductance in guard cells. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000), Jul, Nr. 15, S. 8687–8692
- [46] LEMTIRI-CHLIEH, Fouad ; MACROBBIE, Enid A C. ; WEBB, Alex A R. ; MANISON, Nick F. ; BROWNLEE, Colin ; SKEPPER, Jeremy N. ; CHEN, Jian ; PRESTWICH, Glenn D. ; BREARLEY, Charles A.: Inositol hexakisphosphate mobilizes an endomembrane store of calcium in guard cells. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003), Aug, Nr. 17, S. 10091–10095
- [47] SHEARS, S. B.: Assessing the omnipotence of inositol hexakisphosphate. In: *Cell Signal* 13 (2001), Mar, Nr. 3, S. 151–158
- [48] YORK, J. D. ; ODOM, A. R. ; MURPHY, R. ; IVES, E. B. ; WENTE, S. R.: A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export. In: *Science* 285 (1999), Jul, Nr. 5424, S. 96–100
- [49] FENG, Y. ; WENTE, S. R. ; MAJERUS, P. W.: Overexpression of the inositol phosphatase SopB in human 293 cells stimulates cellular chloride influx and inhibits nuclear mRNA export. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001), Jan, Nr. 3, S. 875–879
- [50] MA, Yunmei ; LIEBER, Michael R.: Binding of inositol hexakisphosphate (IP<sub>6</sub>) to Ku but not to DNA-PKcs. In: *J Biol Chem* 277 (2002), Mar, Nr. 13, S. 10756–10759
- [51] HØY, Marianne ; EFANOV, Alexander M. ; BERTORELLO, Alejandro M. ; ZAITSEV, Sergei V. ; OLSEN, Hervør L. ; BOKVIST, Krister ; LEIBIGER, Barba-

- ra ; LEIBIGER, Ingo B. ; ZWILLER, Jean ; BERGGREN, Per-Olof ; GROMADA, Jesper: Inositol hexakisphosphate promotes dynamin I- mediated endocytosis. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002), May, Nr. 10, S. 6773–6777
- [52] HILTON, J. M. ; PLOMANN, M. ; RITTER, B. ; MODREGGER, J. ; FREEMAN, H. N. ; FALCK, J. R. ; KRISHNA, U. M. ; TOBIN, A. B.: Phosphorylation of a synaptic vesicle-associated protein by an inositol hexakisphosphate-regulated protein kinase. In: *J Biol Chem* 276 (2001), May, Nr. 19, S. 16341–16347
- [53] OHARA-IMAIZUMI, M. ; FUKUDA, M. ; NIINOBE, M. ; MISONOU, H. ; IKEDA, K. ; MURAKAMI, T. ; KAWASAKI, M. ; MIKOSHIBA, K. ; KUMAKURA, K.: Distinct roles of C2A and C2B domains of synaptotagmin in the regulation of exocytosis in adrenal chromaffin cells. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997), Jan, Nr. 1, S. 287–291
- [54] BECK, K. A. ; KEEN, J. H.: Interaction of phosphoinositide cycle intermediates with the plasma membrane-associated clathrin assembly protein AP-2. In: *J Biol Chem* 266 (1991), Mar, Nr. 7, S. 4442–4447
- [55] NORRIS, F. A. ; UNGEWICKELL, E. ; MAJERUS, P. W.: Inositol hexakisphosphate binds to clathrin assembly protein 3 (AP-3/AP180) and inhibits clathrin cage assembly in vitro. In: *J Biol Chem* 270 (1995), Jan, Nr. 1, S. 214–217
- [56] HAWKINS, P. T. ; POYNER, D. R. ; JACKSON, T. R. ; LETCHER, A. J. ; LANDER, D. A. ; IRVINE, R. F.: Inhibition of iron-catalysed hydroxyl radical formation by inositol polyphosphates: a possible physiological function for myo-inositol hexakisphosphate. In: *Biochem J* 294 ( Pt 3) (1993), Sep, S. 929–934
- [57] SHAMSUDDIN, A. M.: Inositol phosphates have novel anticancer function. In: *J Nutr* 125 (1995), Mar, Nr. 3 Suppl, S. 725S–732S
- [58] JARIWALLA, R. J.: Inositol hexaphosphate (IP6) as an anti-neoplastic and lipid-lowering agent. In: *Anticancer Res* 19 (1999), Nr. 5A, S. 3699–3702



## LITERATURVERZEICHNIS

---

- [59] GRASES, F. ; GARCIA-GONZALEZ, R. ; TORRES, J. J. ; LLOBERA, A.: Effects of phytic acid on renal stone formation in rats. In: *Scand J Urol Nephrol* 32 (1998), Jul, Nr. 4, S. 261–265
- [60] HOLMES, William ; JOGL, Gerwald: Crystal structure of inositol phosphate multikinase 2 and implications for substrate specificity. In: *J Biol Chem* 281 (2006), Dec, Nr. 49, S. 38109–38116
- [61] BERTSCH, U. ; DESCHERMEIER, C. ; FANICK, W. ; GIRKONTAITE, I. ; HIL-LEMEIER, K. ; JOHNNEN, H. ; WEGLÖHNER, W. ; EMMRICH, F. ; MAYR, G. W.: The second messenger binding site of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase is centered in the catalytic domain and related to the inositol trisphosphate receptor site. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Jan, Nr. 3, S. 1557–1564
- [62] NALASKOWSKI, Marcus M. ; DESCHERMEIER, Christina ; FANICK, Werner ; MAYR, Georg W.: The human homologue of yeast ArgRIII protein is an inositol phosphate multikinase with predominantly nuclear localization. In: *Biochem J* 366 (2002), Sep, Nr. Pt 2, S. 549–556
- [63] NALASKOWSKI, Marcus M. ; MAYR, Georg W.: The families of kinases removing the Ca<sup>2+</sup> releasing second messenger Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>. In: *Curr Mol Med* 4 (2004), May, Nr. 3, S. 277–290
- [64] ODOM, A. R. ; STAHLBERG, A. ; WENTE, S. R. ; YORK, J. D.: A role for nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate kinase in transcriptional control. In: *Science* 287 (2000), Mar, Nr. 5460, S. 2026–2029
- [65] DUBOIS, E. ; BERCY, J. ; MESSENGUY, F.: Characterization of two genes, ARGRI and ARGRIII required for specific regulation of arginine metabolism in yeast. In: *Mol Gen Genet* 207 (1987), Apr, Nr. 1, S. 142–148
- [66] DESCHERMEIER, C.: *Molekulare Erkennung von Inositolphosphaten durch ihre Rezeptorproteine.*, Dissertation Universität Hamburg, Diss., 2002

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- [67] IVES, E. B. ; NICHOLS, J. ; WENTE, S. R. ; YORK, J. D.: Biochemical and functional characterization of inositol 1,3,4,5, 6-pentakisphosphate 2-kinases. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Nov, Nr. 47, S. 36575–36583
- [68] VERBSKY, John W. ; WILSON, Monita P. ; KISSELEVA, Marina V. ; MAJERUS, Philip W. ; WENTE, Susan R.: The synthesis of inositol hexakisphosphate. Characterization of human inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase. In: *J Biol Chem* 277 (2002), Aug, Nr. 35, S. 31857–31862
- [69] KUSPA, A. ; LOOMIS, W. F.: Tagging developmental genes in Dictyostelium by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992), Sep, Nr. 18, S. 8803–8807
- [70] NELLEN, W. ; LICHTENSTEIN, C.: What makes an mRNA anti-sense-itive? In: *Trends Biochem Sci* 18 (1993), Nov, Nr. 11, S. 419–423
- [71] MARTENS, H. ; NELLEN, W.: Epigenetisches Genesilencing: RNA Interferenz und Antisense RNA. In: *BIOspektrum* 4 (2002), S. 351–354
- [72] FIRE, A. ; XU, S. ; MONTGOMERY, M. K. ; KOSTAS, S. A. ; DRIVER, S. E. ; MELLO, C. C.: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. In: *Nature* 391 (1998), Feb, Nr. 6669, S. 806–811
- [73] ELBASHIR, S. M. ; LENDECKEL, W. ; TUSCHL, T.: RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. In: *Genes Dev* 15 (2001), Jan, Nr. 2, S. 188–200
- [74] BERNSTEIN, E. ; CAUDY, A. A. ; HAMMOND, S. M. ; HANNON, G. J.: Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. In: *Nature* 409 (2001), Jan, Nr. 6818, S. 363–366

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- [75] NOVOTNY, J. ; DIEGEL, S. ; SCHIRMACHER, H. ; MÖHRLE, A. ; HILDEBRANDT, M. ; OBERSTRASS, J. ; NELLEN, W.: Dictyostelium double-stranded ribonuclease. In: *Methods Enzymol* 342 (2001), S. 193–212
- [76] HAMMOND, S. M. ; BERNSTEIN, E. ; BEACH, D. ; HANNON, G. J.: An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. In: *Nature* 404 (2000), Mar, Nr. 6775, S. 293–296
- [77] KIYOSAWA, H. ; HUGHES, J. E. ; PODGORSKI, G. J. ; WELKER, D. L.: Small circular plasmids of the eukaryote *Dictyostelium purpureum* define two novel plasmid families. In: *Plasmid* 30 (1993), Sep, Nr. 2, S. 106–118
- [78] SHAMMAT, I. M. ; GONZALES, C. M. ; WELKER, D. L.: *Dictyostelium discoideum* nuclear plasmid Ddp6 is a new member of the Ddp2 plasmid family. In: *Curr Genet* 33 (1998), Jan, Nr. 1, S. 77–82
- [79] SHAMMAT, I. M. ; WELKER, D. L.: Mechanism of action of the Rep protein from the *Dictyostelium* Ddp2 plasmid family. In: *Plasmid* 41 (1999), May, Nr. 3, S. 248–259
- [80] OGAWA, S. ; YOSHINO, R. ; ANGATA, K. ; IWAMOTO, M. ; PI, M. ; KUROE, K. ; MATSUO, K. ; MORIO, T. ; URUSHIHARA, H. ; YANAGISAWA, K. ; TANAKA, Y.: The mitochondrial DNA of *Dictyostelium discoideum*: complete sequence, gene content and genome organization. In: *Mol Gen Genet* 263 (2000), Apr, Nr. 3, S. 514–519
- [81] LANDER ET AL., E. S.: Initial sequencing and analysis of the human genome. In: *Nature* 409 (2001), Feb, Nr. 6822, S. 860–921
- [82] FAIX, J. ; GERISCH, G. ; NOEGEL, A. A.: Overexpression of the csA cell adhesion molecule under its own cAMP-regulated promoter impairs morphogenesis in *Dictyostelium*. In: *J Cell Sci* 102 ( Pt 2) (1992), Jun, S. 203–214

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- [83] ADACHI, H. ; HASEBE, T. ; YOSHINAGA, K. ; OHTA, T. ; SUTOH, K.: Isolation of Dictyostelium discoideum cytokinesis mutants by restriction enzyme-mediated integration of the blasticidin S resistance marker. In: *Biochem Biophys Res Commun* 205 (1994), Dec, Nr. 3, S. 1808–1814
- [84] VIEIRA, J. ; MESSING, J.: The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. In: *Gene* 19 (1982), Oct, Nr. 3, S. 259–268
- [85] MAYR, G. W.: 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. In: *Biochem J* 254 (1988), Sep, Nr. 2, S. 585–591
- [86] MAYR, G. W. ; F., Irvine R. (Hrsg.): *Mass determination of inositol phosphates by High-Performance-Liquid-Chromatography with postcolumn complexometry (Metal-Dye-Detection), Methods in inositide research*. Raven Press, N. Y., 1990
- [87] PROUTSKI, V. ; HOLMES, E. C.: Primer Master: a new program for the design and analysis of PCR primers. In: *Comput Appl Biosci* 12 (1996), Jun, Nr. 3, S. 253–255
- [88] SAMBROOK, J. ; RUSSELL, D. W. ; COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, U.S.; (Hrsg.): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3 Vol.* Cold Spring Harbor Laboratory Press,U.S., 2001
- [89] HANAHAN, D.: Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. In: *J Mol Biol* 166 (1983), Jun, Nr. 4, S. 557–580
- [90] INOUE, H. ; NOJIMA, H. ; OKAYAMA, H.: High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. In: *Gene* 96 (1990), Nov, Nr. 1, S. 23–28

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- [91] BISCHOFF, K. M. ; SHI, L. ; KENNELLY, P. J.: The detection of enzyme activity following sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. In: *Anal Biochem* 260 (1998), Jun, Nr. 1, S. 1–17
- [92] DICTYBASE HOME. <http://dictybase.org/>
- [93] NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [94] EXPASY. <http://expasy.org/>
- [95] STEVENSON-PAULIK, Jill ; ODOM, Audrey R. ; YORK, John D.: Molecular and biochemical characterization of two plant inositol polyphosphate 6-/3-/5-kinases. In: *J Biol Chem* 277 (2002), Nov, Nr. 45, S. 42711–42718
- [96] WILSON, M. P. ; MAJERUS, P. W.: Characterization of a cDNA encoding *Arabidopsis thaliana* inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase. In: *Biochem Biophys Res Commun* 232 (1997), Mar, Nr. 3, S. 678–681
- [97] WILSON, M. P. ; MAJERUS, P. W.: Isolation of inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase, cDNA cloning and expression of the recombinant enzyme. In: *J Biol Chem* 271 (1996), May, Nr. 20, S. 11904–11910
- [98] EMBL-EBI. <http://www.ebi.ac.uk/>
- [99] STAYTON, M. M. ; RUDOLPH, F. B. ; FROMM, H. J.: Regulation, genetics, and properties of adenylosuccinate synthetase: a review. In: *Curr Top Cell Regul* 22 (1983), S. 103–141
- [100] MATSUDA, Y. ; OGAWA, H. ; FUKUTOME, S. ; SHIRAKI, H. ; NAKAGAWA, H.: Adenylosuccinate synthetase in rat liver: the existence of two types and their regulatory roles. In: *Biochem Biophys Res Commun* 78 (1977), Sep, Nr. 2, S. 766–771

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- [101] WIESMÜLLER, L. ; WITTBRODT, J. ; NOEGEL, A. A. ; SCHLEICHER, M.: Purification and cDNA-derived sequence of adenylosuccinate synthetase from *Dictyostelium discoideum*. In: *J Biol Chem* 266 (1991), Feb, Nr. 4, S. 2480–2485
- [102] TRAUTWEIN, C.: *Untersuchungen zum Stoffwechsel und zu Funktionen von „energiereichen“ Diphosphoinositolphosphaten in Dictyostelium discoideum*, Fachbereich Chemie der Bergischen Universität Wuppertal, Diss., 2004
- [103] KNECHT, D. A. ; KESSIN, R. H.: Recent advances in the molecular genetics of *Dictyostelium*. In: *Developmental Genetics* 11 (1990), S. 388–390
- [104] ITAYA, M. ; YAMAGUCHI, I. ; KOBAYASHI, K. ; ENDO, T. ; TANAKA, T.: The blasticidin S resistance gene (bsr) selectable in a single copy state in the *Bacillus subtilis* chromosome. In: *J Biochem (Tokyo)* 107 (1990), Jun, Nr. 6, S. 799–801
- [105] IZUMI, M. ; MIYAZAWA, H. ; KAMAKURA, T. ; YAMAGUCHI, I. ; ENDO, T. ; HANAOKA, F.: Blasticidin S-resistance gene (bsr): a novel selectable marker for mammalian cells. In: *Exp Cell Res* 197 (1991), Dec, Nr. 2, S. 229–233
- [106] SUTOH, K.: A transformation vector for *dictyostelium discoideum* with a new selectable marker bsr. In: *Plasmid* 30 (1993), Sep, Nr. 2, S. 150–154
- [107] ADELT, S. ; DISSERTATION, Shaker V. (Hrsg.): *Untersuchungen zum Stoffwechsel von myo-Inositolphosphaten in Dictyostelium discoideum Anreicherung und Charakterisierung von Phosphohydrolasen-Thesen zur physiologischen Funktion und Anwendungen bei der Enzym-unterstützten Synthese biologisch aktiver Inositolphosphate*. Dissertation, Shaker Verlag, 1999
- [108] TORIJA, Patricia ; ROBLES, Alicia ; ESCALANTE, Ricardo: Optimization of a large-scale gene disruption protocol in *Dictyostelium* and analysis of conserved genes of unknown function. In: *BMC Microbiol* 6 (2006), S. 75

- [109] LICHTENSTEIN, C. ; NELLEN, W.: *Antisense Technology A Practical Approach*. Oxford University Press, 1997
- [110] CHI, H. ; YANG, X. ; KINGSLEY, P. D. ; O'KEEFE, R. J. ; PUZAS, J. E. ; ROSSIER, R. N. ; SHEARS, S. B. ; REYNOLDS, P. R.: Targeted deletion of Minpp1 provides new insight into the activity of multiple inositol polyphosphate phosphatase in vivo. In: *Mol Cell Biol* 20 (2000), Sep, Nr. 17, S. 6496–6507
- [111] SAIARDI, A. ; CAFFREY, J. J. ; SNYDER, S. H. ; SHEARS, S. B.: Inositol polyphosphate multikinase (ArgRIII) determines nuclear mRNA export in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *FEBS Lett* 468 (2000), Feb, Nr. 1, S. 28–32
- [112] NOVAK, K. D. ; PETERSON, M. D. ; REEDY, M. C. ; TITUS, M. A.: Dictyostelium myosin I double mutants exhibit conditional defects in pinocytosis. In: *J Cell Biol* 131 (1995), Dec, Nr. 5, S. 1205–1221
- [113] STEPHENS, L. R. ; HAWKINS, P. T. ; STANLEY, A. F. ; MOORE, T. ; POYNER, D. R. ; MORRIS, P. J. ; HANLEY, M. R. ; KAY, R. R. ; IRVINE, R. F.: myo-inositol pentakisphosphates. Structure, biological occurrence and phosphorylation to myo-inositol hexakisphosphate. In: *Biochem J* 275 ( Pt 2) (1991), Apr, S. 485–499
- [114] VEIGA, Nicolás ; TORRES, Julia ; DOMÍNGUEZ, Sixto ; MEDEROS, Alfredo ; IRVINE, Robin F. ; DÍAZ, Alvaro ; KREMER, Carlos: The behaviour of myo-inositol hexakisphosphate in the presence of magnesium(II) and calcium(II): protein-free soluble InsP6 is limited to 49 microM under cytosolic/nuclear conditions. In: *J Inorg Biochem* 100 (2006), Nov, Nr. 11, S. 1800–1810
- [115] GEZELIUS, K. ; FELTER, S. ; STAHL, A.: Polyphosphates during multicellular development of Dictyostelium discoideum. In: *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 276 (1973), Jan, Nr. 1, S. 117–119

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- [116] SCHLATTERER, C. ; BURAVKOV, S. ; ZIEROLD, K. ; KNOLL, G.: Calcium-sequestering organelles of *Dictyostelium discoideum*: changes in element content during early development as measured by electron probe X-ray microanalysis. In: *Cell Calcium* 16 (1994), Aug, Nr. 2, S. 101–111
- [117] MARCHESINI, Norma ; RUIZ, Felix A. ; VIEIRA, Mauricio ; DOCAMPO, Roberto: Acidocalcisomes are functionally linked to the contractile vacuole of *Dictyostelium discoideum*. In: *J Biol Chem* 277 (2002), Mar, Nr. 10, S. 8146–8153
- [118] BHANDARI, Rashna ; SAIARDI, Adolfo ; AHMADIBENI, Yousef ; SNOWMAN, Adele M. ; RESNICK, Adam C. ; KRISTIANSEN, Troels Z. ; MOLINA, Henrik ; PANDEY, Akhilesh ; WERNER, J. K. ; JULURI, Krishna R. ; XU, Yong ; PRESTWICH, Glenn D. ; PARANG, Keykavous ; SNYDER, Solomon H.: Protein pyrophosphorylation by inositol pyrophosphates is a posttranslational event. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007), Sep, Nr. 39, S. 15305–15310
- [119] LUO, Hongbo R. ; SAIARDI, Adolfo ; YU, Hongbo ; NAGATA, Eiichiro ; YE, Keqiang ; SNYDER, Solomon H.: Inositol pyrophosphates are required for DNA hyperrecombination in protein kinase c1 mutant yeast. In: *Biochemistry* 41 (2002), Feb, Nr. 8, S. 2509–2515
- [120] CARDELLI, James: Phagocytosis and macropinocytosis in *Dictyostelium*: phosphoinositide-based processes, biochemically distinct. In: *Traffic* 2 (2001), Feb, Nr. 5, S. 311–320