

„ Biosynthese von aktiviertem Inositolphosphat“

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Monika Kincses
aus Sathmar

Düsseldorf, 2002

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. H. Reinauer

Korreferent: Prof. Dr. F. Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 17.06.2002

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	7
1.1. Allgemeines über Diabetes mellitus und Insulin	7
1.2. Second messenger und cPIP	9
1.3. Ziel der Arbeit.....	13
2. MATERIAL UND METHODEN	14
2.1. Materialien	14
2.1.1. Chemikalien.....	14
2.1.2. Geräte und Verbrauchsmaterial	16
2.1.3. Puffer und Lösungen	17
2.2. Methoden	18
2.2.1. Versuchstiere	18
2.2.2. Herstellung des Inositol-Phosphat-Precursors aus Rattenleber	18
2.2.3. Herstellung des Inositol-Phosphates (n-IP) aus Rattenleber	19
2.2.4. Gelchromatographische Reinigung des Precursors und des n-IP an Sephadex G15.....	19
2.2.5. Darstellung des Inositol-Phosphat-Precursors	19
2.2.6. cPIP Biosynthese-Test	20
2.2.7. Chromatographische Trennung von ^3H -PGE ₁ und ^3H -cPIP	21
2.2.8. Auswertung der erhaltenen Fraktionen aus der Adsorptions- chromatographie	21
2.2.9. Isolierung von Ratten-Leberplasmamembran (Modifizierte Methode nach Wasner)	22
2.2.10. Proteinbestimmung (nach Smith et al., 1985).....	23
2.2.11. Differentialzentrifugation zur Gewinnung des partikulären Enzyms für die Aktivierung des Precursors	23
2.2.12. Lokalisierung des partikulären Enzyms	25
2.2.13. Zeitkinetik der n-IP-Synthese	25

2.2.14. GTP-, Substrat- und Enzym-Abhängigkeit der n-IP Synthese	25
2.2.15. Anionenaustauscherchromatographie	25
2.2.16. pH-Stabilität des Precursors	26
2.2.17. Zur Stabilität des Precursors bzw. n-IP	26
2.2.18. Phosphodiester-Hydrolyse von entsprechenden Precursor- Inositolphosphaten	26
2.2.19. ³ H-Inositol-Einbau	27
2.2.20. Einbau vom radioaktiv-markiertem GTP	27
2.2.21. Aufarbeitung und Test der Insektenzellen <i>Chironomus tentans</i> auf n-IP	27
2.2.22. Darstellung von Inositol-cyclo-bisphosphaten	28
2.2.23. High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	28
 3. ERGEBNISSE	 30
3.1. Zur quantitativen Bestimmung von aktiviertem Inositolphosphat (n-IP)	30
3.2. Anreicherung von Precursor-Inositolphosphat	31
3.3. Reinigung des Precursors durch Gelfiltration an Sephadex G15	32
3.4. Reinigung des Prec-IP durch Anionenaustauscherchromatographie	33
3.5. Chromatographie der Prec-IP-Lösung mittels HPLC	34
3.6. Biosynthese von cPIP	40
3.7. Einfluß der Fluoridkonzentration auf die n-IP Synthese	41
3.8. Einsatz verschiedener Nucleotide	42
3.9. Charakterisierung der n-IP Synthese	43
3.9.1. Zeitabhängigkeit der n-IP-Biosynthese	43
3.9.2. Enzymabhängigkeit der n-IP-Synthese	44
3.9.3. Substratabhängigkeit der n-IP-Synthese	45
3.9.4. Abhängigkeit der n-IP Synthese von der GTP-Konzentration.....	46
3.10. Labilität des Precursors.....	46
3.10.1. Precursor-Stabilität in Abhängigkeit von der Ionenstärke	47
3.10.2. pH-Stabilität des Precursors	48
3.10.3. Zeitliche Stabilität von Precursor-Lösungen	49
3.11.1. Einbau von [³ H]-Inositol	50
3.11.2. Stabilität von [³ H]myo-Inositol markiertem Precursor und n-IP	54

3.11.3. Einbau von [³ H]-GTP in n-IP.....	55
3.11.4. Umsetzung des mit [³ H]-markierten n-IP zu cPIP	59
3.12. Chromatographie des [³ H]myo-Inositol-markierten Prec-IP mittels HPLC	62
3.13. Synthese verschiedener cyclischer Inositolphosphate.....	64
3.14. Biosynthese von n-IP in <i>Chironomus tentans</i> Insektenzellen.....	65
4. DISKUSSION.....	70
4.1. Biosynthese von cPIP	70
4.2. Anreicherung von Prec-IP.....	71
4.3. Zur Labilität des Prec-IP bzw. n-IP.....	72
4.4. [³ H]myo-Inositol-Einbau	73
4.5. [³ H]-GTP-Einbau.....	74
4.6. cPIP-Synthese in den <i>Chironomus tentans</i> Insektenzellen.....	75
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	76
6. LITERATUR.....	78
7. ANHANG	92
7.1. Verzeichnis der Abbildungen	92
7.2. Verzeichnis der Tabellen.....	95

Verzeichnis der Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
AU	UV-Profil
BSA	Rinderserum-Albumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cPIP	Prostaglandylinositolcyclophosphat
cpm	counts per minute
CTP	Cytidintriphosphat
dpm	desintegration per minute
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HPLC	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
InsP ₂	Inositolbisphosphat
InsP ₃	Inositoltrisphosphat
InsP ₄	Inositoltetraphosphat
InsP ₅	Inositolpentaphosphat
IP ₁	Inositolmonophosphat
KBr	Kaliumbromid
KOH	Kaliumhydroxid
MDD	Mettal-Indikator-Detektion (<u>metal-dye-detection</u>)
min	Minute
NaCl	Kochsalz
n-IP	aktiviertes Inositolphosphat
PAR	4-(2-Pyridylazo)-resorcinol
PGE	Prostaglandin E
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur

sec	Sekunde
Skt.	Skalenteile
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TIEA	Triethylamin
UTP	Uridintriphosphat
%(w/v)	Gewichtszprozent

1. EINLEITUNG

1.1. Allgemeines über Diabetes mellitus und Insulin

Der Diabetes mellitus ist eine als endemisch zu bezeichnende Volkskrankheit; man muß davon ausgehen, dass in Deutschland ca. 5% der Gesamtbevölkerung an dieser Erkrankung leiden (8). Diese Stoffwechselerkrankung ist gekennzeichnet durch die chronische Erhöhung des Blutglucose-Spiegels. Die Symptome wie übermäßiger Harndrang, Durst und Mattigkeit sind seit alten Zeiten bekannt; davon zeugen chinesische, hinduistische und griechische Schriften (15).

Ursächlich liegt der Hyperglykämie stets eine mangelnde Insulinwirkung zugrunde, entweder durch Insulin-Defizit als Folge einer nicht ausreichenden Sekretion des Hormons und/oder durch eine Verminderung der Wirksamkeit des verfügbaren Insulins (8).

Im Jahre 1921 gelang es Banting und Best zum ersten Mal Insulin in aktiver Form zu isolieren (5-7); vier Jahre später wurde dieses wichtige Hormon durch Abel et al. als Reinsubstanz gewonnen (1). Seit der Entdeckung des Zusammenhanges zwischen Diabetes und Insulin stellt die Erforschung des Wirkungsmechanismus dieses Hormons eine große Herausforderung an die Wissenschaft.

Insulin wird in den β -Zellen der Langerhansschen Inseln im Pankreas als Proinsulin synthetisiert und gespeichert. Seine Wirkungen sind sehr vielfältig und umfassen u.a.:

- Senkung der intrazellulären cAMP-Konzentration, Transport von Molekülen und Ionen durch die Plasmamembran (56-58)
- Aktivierung des Glucoseabbaus, Hemmung der Gluconeogenese und die Induktion von Zellwachstum und –differenzierung (18,70)
- Regulation der Proteinexpression (41)
- Steigerung der Glycogen-, Triglycerid- und Proteinsynthese (13,19,23,50)

Insulin entfaltet seine biologische Aktivität nach Bindung an den membranständigen Insulin-Rezeptor der Zielzellen, einem $\alpha_2\beta_2$ -oligomeren Glycoprotein.

Dannach wird der Rezeptor autophosphoryliert und außerdem findet eine Phosphorylierung von Zielproteinen an Tyrosin-Resten statt, so dass dieser Rezeptor als Tyrosin-Kinase angesehen werden kann (16,88).

Für die weiteren Vorgänge der intrazellulären Signalweiterleitung werden 2 Hypothesen diskutiert (17,24,28,59,65), Abb. 1.1.1)

1. Phosphorylierungskaskaden-Hypothese

Hierbei erfolgt nach der Tyrosin-Phosphorylierung des Rezeptors die Aktivierung von Serin/Threonin-Kinasen, die ihrerseits Zielproteine, vor allem das Insulin-Rezeptor-Subtrat-1(IRS-1) an bestimmten Tyrosinen phosphoryliert.

2. Second messenger-Hypothese

Hier wird die Signalweiterleitung durch die Freisetzung eines intrazellulären Botenstoffes vermittelt, der seinerseits, direkt oder indirekt, die Serin/Threonin-Phosphatase aktiviert, wodurch weitere Zielproteine dephosphoryliert werden.

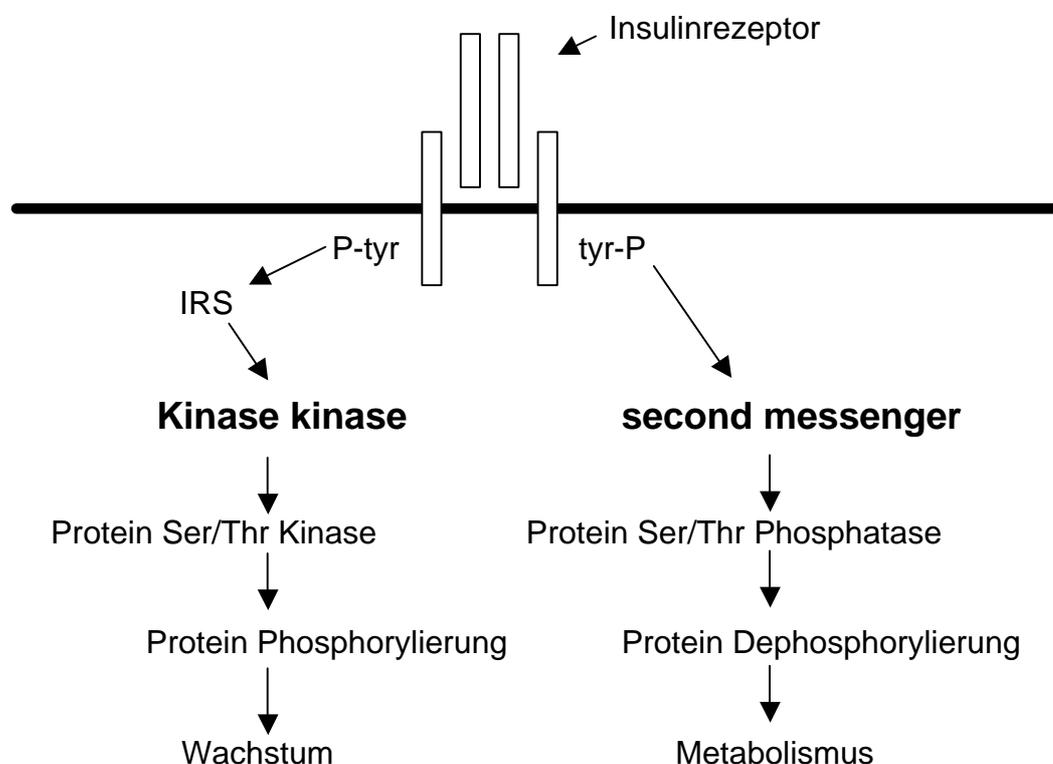


Abb. 1.1.1.: Insulinsignalkaskaden (65)

1.2. Second messenger und cPIP

Die wichtigsten intrazellulären Botenstoffe, deren Wirkung und Funktion in vielen Arbeiten gezeigt worden sind, sind vor allem cAMP, cGMP, Diacylglycerol und Inositoltrisphosphat (9-11,34). Diese werden im Zuge der Signalübertragung in spezifischen enzymatischen Reaktionen gebildet oder freigesetzt und dienen als Effektoren, mit denen die Aktivität nachgeschalteter Proteine reguliert wird (34).

Eine Schlüsselfunktion in der Bildung der intrazellulären Botenstoffe kommt der Phospholipase C zu. Es gibt mehrere Typen von Phospholipase C, die wichtigsten sind die des Typs C β und C γ (69). Die Aktivierung der Phospholipase C kann über zwei Signalwege eingeleitet werden, durch Aktivierung entweder α -adrenerg durch G-Proteine oder durch Rezeptor-Tyrosinkinasen (34,72).

Die Arbeitsgruppen von Saltiel (56-59,39,60-62), Jarett (3,21,30-32,42-43) sowie Larner (35-37,40,53,66) haben ein sogenanntes Inositolphosphoglycan als ein second messenger des Insulin vorgeschlagen. Dieses soll aus einer Phosphatidylinositol-haltigen Vorstufe, einem in der Plasmamembran befindlichen Phosphatidylinositol-glycan, entstehen, das durch eine Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C in Diacylglycerin und Inositolphosphoglycan gespalten wird (39,56-57). Nach Saltiels Ansicht besteht der so entstehende mögliche second messenger aus Inositol, Phosphat, Galactosamin, Glucosamin, Galactose und anderen Monosacchariden (40,63,64). Die Arbeiten weisen allerdings Ungereimheiten auf und werden von anderen Arbeitsgruppen (19,74), die analoge Untersuchungen durchgeführt haben, angezweifelt.

cAMP ist ein zentraler intrazellulärer Botenstoff, dem zwei wichtige Funktionen zukommen: die Aktivierung von Proteinkinasen und die Regulation des Ca²⁺-Durchtritts durch Kanäle (34). Da cAMP als Mediator für katabole Hormone gilt, zählen Substanzen mit cAMP-antagonistischer Wirkung zu den möglichen second messengern des Insulins. Hierzu gehören u.a. der von Ho beschriebene feedback Regulator (24-26) sowie diverse Peptide (12,33,35,68). Alle diese Substanzen sind bislang jedoch über das Anfangsstadium ihrer Aufklärung und Wirkung nicht hinausgekommen.

Ein weiterer möglicher Botenstoff der Insulinkaskade ist die im Jahre 1975 von Wasner aus Rattenleber isolierte Substanz. Er beschrieb ihn als cAMP-Antagonisten und konnte nachweisen, dass dessen Synthese durch Insulin und Noradrenalin stimuliert werden kann (75,77). Dieser Mediator wird von einem partikulären Enzym synthetisiert und zwar durch Verknüpfung von einem Prostaglandin E und einem aktivierten Inositolphosphat (n-IP). Nach Bindung von Noradrenalin an den α -adrenergen Rezeptor werden die Phospholipase A und C über G-Proteine aktiviert. Dadurch werden die notwendigen Substrate wie Inositol-phosphate und Arachidonsäure freigesetzt, die für die Synthese des Mediators benötigt werden. Aufgrund der chemischen Struktur, wurde die Substanz Prostaglandylinositol-cyclophosphat, kurz cPIP genannt (78). Abb. 1.2.1. zeigt die von Wasner vorgeschlagene Struktur, die aufgrund massenspektroskopischer sowie chemischer Derivatisierungsexperimente gewonnen wurde.

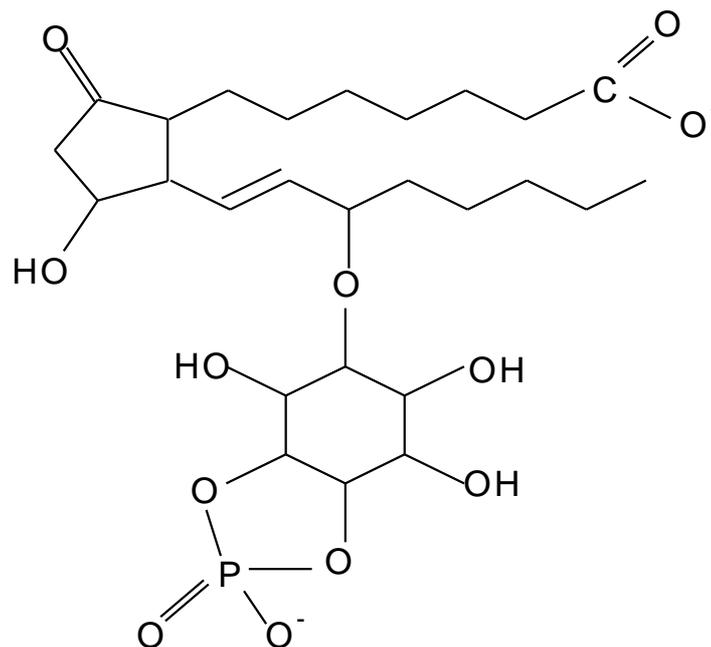


Abb. 1.2.1.: Vorgeschlagene chemische Struktur von cPIP (75,81,83)

Als Antagonist zum cAMP bewirkt cPIP eine 100%-ige Hemmung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (75) sowie eine siebenfache Aktivierung der Serin/Threonin-Phosphatase (75,78).

Dies führt zur einer Vielzahl von physiologischen Effekten (4,49,77-81) wie z.B. :

- Aktivierung des Glucose-Transportes in Adipocyten
- Hemmung der Insulin-Ausschüttung aus den β -Zellen des Pankreas
- Hemmung der Phosphorylase in Muskel als Folge der Hemmung der Proteinkinase A
- Inhibierung der Adenylat-Cyclase z.B. in Hepatocyten
- Verminderte Affinität β -adrenerger Rezeptoren zu Agonisten
- Positiver inotroper Effekt am Katzenherzen

Die Biosynthese und biologische Wirkung von cPIP wurde auch in dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* (29) und in den Insektenzellen *Chironomus tentans* (51) nachgewiesen.

Die chemische Struktur von cPIP wurde weitgehend aufgeklärt (82,83), lediglich zur Isomerie dieser Verbindung fehlen noch Aussagen. Es wurde gezeigt, dass cPIP aus einem aktivierten Inositolphosphat (n-IP) und Prostaglandin E gebildet wird. n-IP ist vermutlich ein Guanosindiphospho-Inositolcyclophosphat, das aus einem Inositolbisphosphat-Precursor und GTP gebildet wird (22). Abb. 1.2.2. zeigt die derzeit angenommene Struktur von n-IP. Als mögliches Precursor-Substrat wurde das Inositol-1,2-cyclo-4-bisphosphat zugrunde gelegt. Das n-IP-Synthese-Enzym dürfte zur Klasse der Pyrophosphorylasen gehören und wird durch Differentialzentrifugation des Rattenleberhomogenats gewonnen. Es findet sich in dem Sediment (S2), in dem vor allem Mitochondrien vorliegen.

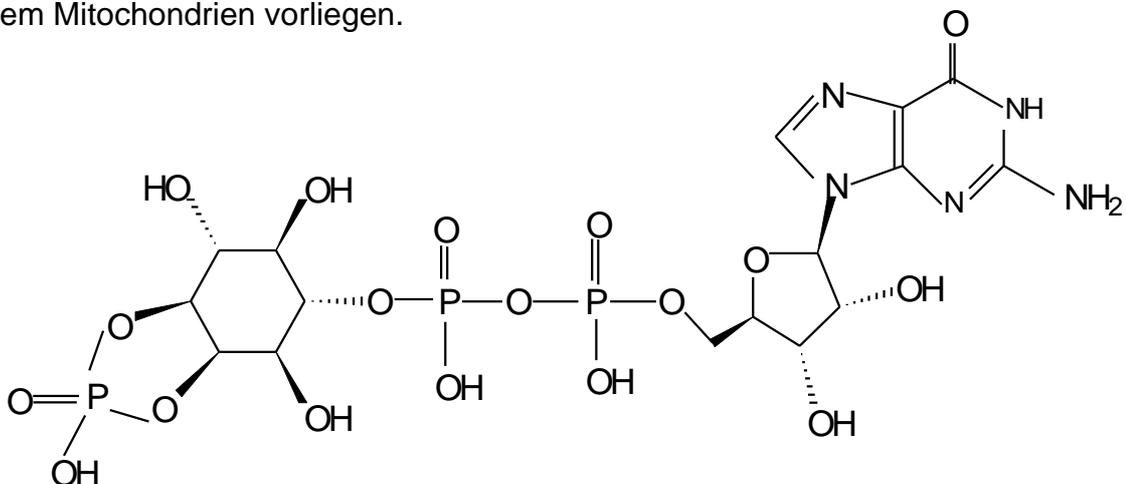
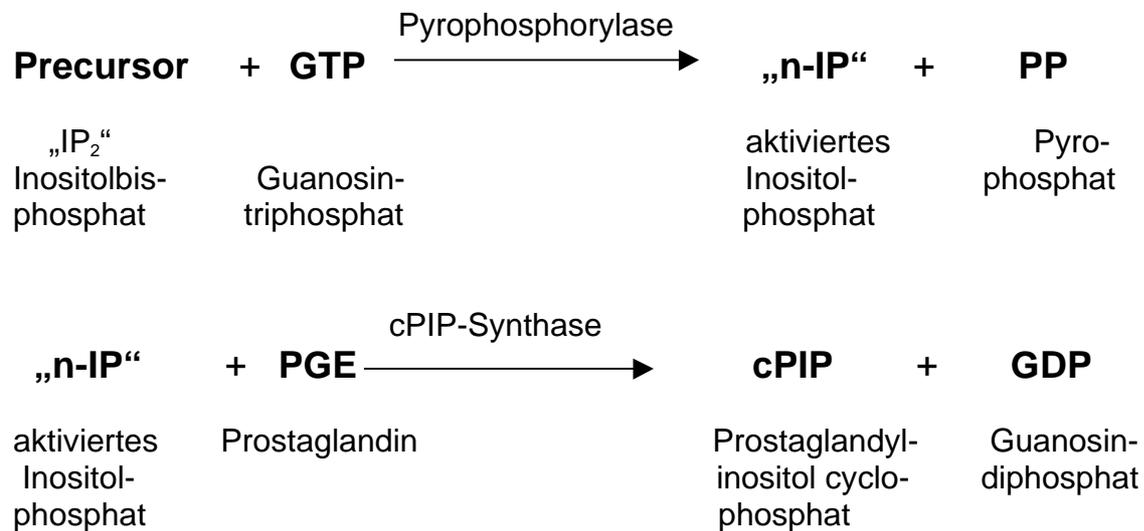


Abb. 1.2.2.: Derzeit angenommene Struktur des aktivierten Inositolphosphates
(Guanosindiphospho-inositolcyclophosphat)

Die Gelfiltration und die Anionenaustauscher-Chromatographie haben gezeigt, dass der Precursor dieses n-IP im Bereich der Inositolbisphosphate eluiert (47). n-IP konnte aber durch keinen der käuflichen Inositolphosphate ersetzt werden. Da die Inositol-phosphate verhältnismäßig stabile Substanzen sind, weist die Labilität des Precursors auf eine 5-Ring Phospho-Diesterstruktur hin (22). Der Abbau des Precursors mit Phosphodiesterase wurde gezeigt (24). Für die n-IP-Synthese benötigt man ein Nukleosidtriphosphat als Energielieferant. (38).

Für die Synthese von n-IP bzw. cPIP wurde folgende Biosynthese-Gleichung postuliert (22):



Über diesen Weg kann der Inositolphosphat-Precursor gemessen werden, und zwar durch Umsetzung zu cPIP und dessen quantitative Bestimmung.

1.3. Ziel der Arbeit

Wie von Conrad (14) schon gezeigt, adsorbiert n-IP an Aktivkohle, was ein Hinweis darauf ist, dass im n-IP eine unpolare Molekülgruppe vorhanden sein muß. Der Precursor des n-IP adsorbiert nicht an Aktivkohle und kann auf diese Weise von diesem getrennt werden.

Es sollte untersucht werden, ob der Precursor nach diesem Anreicherungs- und Trennungsschritt noch aktiv ist. Es stellt sich auch die Frage, ob das n-IP eine vergleichbare Labilität im Bezug auf Ionenstärke aufweist wie der Precursor.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist das Aufzeigen der cPIP-Synthese mit isoliertem Precursor, besser gesagt, der Beweis der schon postulierten Biosynthese.

Folgende Fragestellungen sollen im einzelnen bearbeitet werden:

- Wird das GTP im ersten Schritt der Synthese in n-IP eingebaut? Hier wird Tritium-markiertes GTP eingesetzt, um zeigen zu können, dass man markiertes n-IP enthält.
- Wird im Zuge der Biosynthese von cPIP das in n-IP vorliegende GDP-Molekülteil als markiertes GDP abgespalten? Dies sollte mit chromatographischen Methoden gezeigt werden.
- Ein weiterer wichtiger Versuch ist der Einbau von Tritium-markiertem Inositol in den Precursor und die weitere Reinigung mittels HPLC.

Weitere Untersuchungen dieser Arbeit haben das Ziel, die Aussagen über die Struktur des Precursors zu bestätigen und zu erweitern. Aus diesem Grund sollte versucht werden, die schon von Gypakis getesteten cyclischen Inositolbisphosphate nochmals herzustellen, um zu überprüfen, ob mit diesen unter optimierten Synthesebedingungen doch ein Umsatz zu cPIP möglich ist.

Aufgrund einer vorausgegangenen Diplomarbeit, in der cPIP-Synthase-Aktivität in Insektenzellen nachgewiesen wurde, sollte die cPIP-Synthese in den Insektenzellen *Chironomus tentans* näher charakterisiert werden. Vor allem geht es zu prüfen, ob n-IP aus den Insektenzellen mit der Rattenleber identisch ist.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien

ADP (Boehringer, Mannheim)

Aktivkohle (Roth, Karlsruhe)

AMP (Merck, Darmstadt)

Angiotensin II (Sigma, Deisenhofen)

Ascorbinsäure p.a. (Roth, Karlsruhe)

ATP (Boehringer, Mannheim)

BCA-Protein-Assay-Reagenz (Pierce, Rockford/Illinois, USA)

^{14}C -ADP (Amersham, UK)

cAMP (Merck, Darmstadt)

^{14}C -IP₁ (Amersham, UK)

Chloroform (Roth, Karlsruhe)

di-Kaliumhydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)

EDTA (Sigma, Deisenhofen)

Essigsäure (Merck, Darmstadt)

Essigsäureethylester (Roth, Karlsruhe)

Glucose

Glycin p.a. (Merck, Darmstadt)

GTP (Merck, Darmstadt)

Hepes Puffersubstanz (Serva, Heidelberg)

^3H -GTP (Amersham-Pharmacia)

^3H -IP₂ (Amersham, UK)

^3H -IP₃ (Amersham, UK)

^3H -PGE₁ (Amersham-Buchler, Braunschweig)

Kaliumbromid p.a. (Merck, Darmstadt)

Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)

Kaliumfluorid ((Merck, Darmstadt)

Kaliumhydroxid ((Merck, Darmstadt)

Kieselgel SIL-350 (Sigma, Deisenhofen)
Lithiumchlorid (Merck, Darmstadt)
Magnesiumchlorid (Merck, Darmstadt)
 β -Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt)
Methanol (Roth, Karlsruhe)
myo-Inositol-1,4-bisphosphat (Sigma Chemical USA)
myo-Inositol-2,4-bisphosphat (Sigma Chemical USA)
myo-Inositol-4,5-bisphosphat (Sigma Chemical USA)
myo-Inositol-5,6-bisphosphat (Sigma Chemical USA)
N-Cyclohexyl-N´-(2-Morpholinoethyl)-Carbodiimid Methyl-p-Toluensulfonat (Fluka ,
Buchsb)
Natriumacetat p.a., wasserfrei (Merck, Darmstadt)
Natriumfluorid (Merck, Darmstadt)
Noradrenalin (Sigma, Deisenhofen)
Pentobarbital-Natrium (Nembutal®),(Wirtschaftsgenossenschaft dtsh. Tierärzte,
Hannover)
PGE (Alexis, Grünberg)
Q-Sepharose (Pharmacia, Freiburg)
Saccharose (Merck, Darmstadt)
Serumalbumin vom Rind als Standard (Pierce, Rockford/Illinois, USA)
Sephadex G15 (Pharmacia, Freiburg)
Stickstoff, flüssig
Szintillatorflüssigkeit Rotiszint 11 und 22 (Roth, Karlsruhe)
Toluol (Roth, Karlsruhe)
Triäthylamin (Merck, Darmstadt)

2.1.2. Geräte und Verbrauchsmaterialien

β- Counter LS-6000-IC (Beckmann, München)

Durchflussphotometer 2238 Uvicord (Pharmacia, Freiburg)

Fraktionssammler 2070 Ultrorac II und 2112 Redirac (Pharmacia, Freiburg)

Gefriertrocknungsanlage WKF-L05 (Gessellschaft für elektrophys. Gerätebau,
Brandau/Odw.)

Glashomogenisator (Braun, Melsungen)

Glassäulen (Beyer, Düsseldorf)

Photometer (Zeiss)

Pipetten (Eppendorf, Hamburg)

Pumpen (Miniplus 2, Gilson-ABIMED)

Rotationsverdampfer Rotavapor R110 (Büchi, Flawil/Schweiz)

Rührer/Heizer (Gerhardt, Bonn)

Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg)

Ultrazentrifuge L5-75 mit Rotor Ti 70 (Beckmann, München)

Waagen (Sartorius)

Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q-Plus (Millipore)

Wasserbad Ter 2 (Ika Labortechnik, Staufen i. Br.)

Wasserbad (Haake, Karlsruhe)

Zählfläschchen für Flüssig-Szintillation (Zinsser Analytic, Frankfurt a.M.)

Zentrifuge Sorvall RC-5B mit Rotoren SS34 und GSA (Du Pont, Bad Nauheim)

2.1.3. Lösungen und Puffer

Anionenaustauscher-Puffer A: 10 mM Kaliumacetat, pH 5,5

Anionenaustauscher-Puffer B: 10 mM Kaliumacetat, pH 5,5
0,25 M KBr

Lösungen für die Differentialzentrifugation :

Lösung I : 0,32 M Saccharose
0,02 M Tris-Puffer, pH 7,6
2 mM Mercaptoethanol
2 mM EDTA-Lösung

Lösung II : 0,25 M Saccharose
0,02 M Tris-Puffer, pH 7,6
2 mM Mercaptoethanol
2 mM EDTA-Lösung

Phosphatpuffer (cPIP-Test): 1 M KH_2PO_4 / K_2HPO_4 , pH 7,5

Plasmamembranpuffer: 20 mM Tris/HBr-Puffer, pH 7,5
1 mM β -Mercaptoethanol
1 mM EDTA-Lösung
pH 7,3

Saccharosegradientenlösung: 1,4 M Saccharose
10 mM Tris/HBr-Puffer, pH 7,5
1 mM β -Mercaptoethanol
1 mM EDTA-Lösung

2.2. Methoden

2.2.1. Versuchstiere

Für die Plasmamembran-, Enzym- und n-IP-Herstellung wurden männliche und weibliche Spargue-Dawley-Ratten verwendet (Zucht Dr. Wasner, Deutsches Diabetes-Forschungsinstitut). Die Tiere waren ca. 3 Monate alt, wogen 200-300 g und hatten freien Zugang zu Standardfutter (Ssniff) und Trinkwasser. Vor Entnahme der Leber wurde den Tieren 80-160 mg Pentobarbital-Natrium(Nembutal®) (0,5-1 ml) intraperitoneal injiziert. Nach Eintritt der Narkose wurde der Bauchraum geöffnet und die Leber entsprechend der jeweiligen Versuchsanordnung mit dem Hormon Noradrenalin perfundiert, entnommen und verarbeitet.

2.2.2. Herstellung des Inositol-Phosphat-Precursors aus Rattenleber

Die Rattenleber wurde über die Pfortader 1 min lang mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9 %-ige NaCl- Lösung) perfundiert, welche zusätzlich 10 µM Noradrenalin, 1 mM Ascorbinsäure und 2,5 mM Glucose enthielt (pH wurde auf 7 eingestellt) und mit Carbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂) begast wurde. Danach wurde für 10 sec mit Millipore-Wasser gespült und sofort in eiskaltem Millipore-Wasser homogenisiert. Dieses Leberhomogenat wurde durch Zugabe des doppeltem Volumens an Chloroform/Methanol (2:1) denaturiert und anschließend für 10 min bei 10.000 rpm im GSA-Rotor (16.300 x g) zentrifugiert. Der Überstand wurde in einen Scheidetrichter überführt und nach Phasentrennung die untere Chloroform-Phase mit den unpolaren Bestandteilen verworfen. Nach Kontrolle des pH-Wertes bzw. dessen Einstellung mit 1M Essigsäure auf pH 6,5 werden von der Methanol-Wasser-Phase, welche die polaren Substanzen und damit den Precursor und das n-IP enthält, die restlichen organischen Lösungsmittel entfernt. Dies geschieht mit Hilfe eines Rotationsverdampfers bei 55°C und einem Druck von ca. 200 mbar. Nach wiederholter Kontrolle des pH-Wertes wird diese Lösung mit 3g Aktivkohle pro Rattenleber versetzt. Vorher wird die Aktivkohle mit Millipore-Wasser angefeuchtet und mit 1M KOH auf pH 7 gebracht. Die Aktivkohle wird für 10 min bei 15.000 rpm im GSA-Rotor abzentrifugiert und die verbleibende Lösung eingefroren und lyophilisiert. Das Lyophilisat wird durch Gelchromatographie an Sephadex G15 gereinigt und bei -80°C gelagert.

2.2.3. Herstellung von neuen Inositol-Phosphat (n-IP) aus Rattenleber

Die Gewinnung des n-IP geschieht analog der Herstellung des Precursors mit dem Unterschied, dass die Behandlung mit Aktivkohle wegfällt, da das n-IP an Aktivkohle adsorbiert. Die n-IP-Lösung, wird durch Gelchromatographie gereinigt und anschließend lyophilisiert.

2.2.4. Gelchromatographische Reinigung des Precursors und des n-IP an Sephadex G15

Das nach Methoden 2.2.1. und 2.2.2. erhaltene Lyophilisat wurde durch Gelfiltration aufgereinigt. Die Proben wurden an einer Sephadex G15-Säule (2,6 bzw. 5 cm x 90 cm mit einem Säulenvolumen von 0,5 bzw. 1,2 l je nach Auftragsmenge) aufgetrennt und mittels Leitfähigkeitsdetektion sichtbar gemacht. Der Precursor- bzw. n-IP-Gehalt der Fraktionen wurde mit dem cPIP-Test ermittelt. Die relevanten Fraktionen wurden vereinigt, die Lösung wiederum mit 1M Essigsäure auf pH 6,5 eingestellt und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in Millipore-Wasser resuspendiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.5. Darstellung von Inositol-Phosphat-Precursor

Zur Synthese von n-IP wird der über Sephadex G15-gereinigte Precursor mit GTP und mit dem durch Differentialzentrifugation erhaltenen Enzym inkubiert. Der Testansatz enthält in einem Gesamtvolumen von 500 μl folgende Substanzen:

Substanz / Menge		Endkonzentration im Test
Precursor	100 μl	-
GTP (0,1M)	20 μl	4 mM
LiCl (1M)	15 μl	30 mM
β -Mercaptoethanol (60mM)	15 μl	1,8 mM
MgCl ₂ (1M)	10 μl	20 mM
H ₂ O	190 μl	-
KF (1M)	50 μl	100 mM
Enzym (S2)	100 μl	0,2 mg Protein

Nach einer Inkubationszeit von 2 min wurden die Ansätze mit 0,5 ml CHCl₃/MeOH (2:1) denaturiert und in der Tischzentrifuge für 10 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit einer Pasteurpipette von der Chloroform-Phase abgetrennt und im Rotationsevaporator vom Methanol befreit. Die wässrige Lösung wurde lyophilisiert, in 200 µl Millipore-Wasser aufgenommen und in den cPIP-Test eingesetzt, um den Gehalt an aktiviertem Inositolphosphat (n-IP) zu messen. Die erhaltenen Mole an cPIP entsprechen den Molen an n-IP aufgrund der chemischen Struktur.

2.2.6. cPIP Biosynthese-Test

Inkubationsbedingungen für die *in vitro* –Biosynthese von cPIP

Die cPIP-Synthese setzt das aktivierte Inositolphosphat (n-IP) und ³H-PGE₁ zu ³H-cPIP um, welches nach chromatographischer Abtrennung von ³H-PGE₁ anschließend in β-Counter gemessen werden kann. Aufgrund der bekannten spezifischen Radioaktivität des ³H-PGE₁ kann die synthetisierte Menge an cPIP in Molen angegeben werden. Der cPIP-Testansatz enthält in einem Gesamtvolumen von 300 µl folgende Substanzen:

Substanz (Konz. der Stammlösung)	Endkonzentration im Test
β-Mercaptoethanol (0,036 M)	1,2 mM
NaF (0,4 M)	13,3 mM
MgCl ₂ (0,4 M)	13,3 mM
Phosphatpuffer (0,5 M), pH 7,5	22 mM
aktiviertes Inositolphosphat (n-IP)(25µM)	0,012 mM
ATP (0,4 M); pH 7,5)	13,3 mM
³ H-PGE ₁ (2,6 x 10 ⁻³ mM)	5,1 µM
H ₂ O	ad 300 µl Inkubationsvolumen

Der Test wird durch Zugabe von 10 µl Plasmamembranpräparation gestartet. Mercaptoethanol dient als Oxidationsschutz. Die Inkubationsdauer beträgt 30 min bei 30°C. Ein Ansatz ohne n-IP dient als Kontrolle. ATP wird zur Aktivierung der cPIP-Synthase benötigt (88).

2.2.7. Chromatographische Trennung von $^3\text{H-PGE}_1$ und $^3\text{H-cPIP}$

Zur Trennung von $^3\text{H-PGE}_1$ und $^3\text{H-cPIP}$ wird ein modifiziertes Verfahren nach Wasner (1985) verwendet, das seinen Ursprung in einer chromatographischen Auftrennung verschiedener Prostaglandine nach Jaffe et al. (27) hat. Die Auftrennung erfolgt an Kieselsäure, wobei durch ein Lösungsmittelgemisch von Essigsäureethylester und Toluol mit steigendem Methanolanteil aufgrund der unterschiedlichen Polarität cPIP von PGE getrennt wird. Dazu werden Glassäulen mit eingeschweißter Fritte mit je 3 ml Methanol gespült. Danach wird Kieselgel in einem Toluol/Essigsäureethylester (3:2)-Gemisch aufgenommen (0,2g/ml) und gut durchmischt. In jede Glassäule wurden 2 ml dieser Aufschlämmung gefüllt und anschließend mit 2 ml des Toluol/Essigsäureethylester (3:2)-Gemisches äquilibriert. Jeweils 100 μl des Inkubationsansatzes des cPIP-Testes wurden auf eine Kieselgelsäule aufgetragen. Dannach werden sofort jeweils zweimal 6 ml eines Toluol/Essigsäureethylester/Methanol-Gemisches (3:2:1) auf die Säulen gegeben und die Elution damit gestartet (Fraktionen A und B). Daran schließt sich eine weitere Elution mit 6 ml Toluol/Essigsäureethylester/Methanol-Gemisch (3:2:2) (Fraktion C), eine mit 6 ml Toluol/Essigsäureethylester/Methanol-Gemisch (3:2:6) (Fraktion D) und abschließend eine mit 6 ml Methanol (Fraktion E) an. In den Fraktionen A und B eluiert das PGE, so dass in Fraktion C kaum noch PGE eluiert. Das synthetisierte cPIP eluiert in den Fraktionen D und E. Nach diesem Vorgang ist in der Regel die gesamte von $^3\text{H-PGE}_1$ stammende Radioaktivität aus den Säulen ausgewaschen. Die einzelnen Eluate werden in Zählbehältern aufgefangen und mit jeweils 10 ml Rotiszint 11 versetzt. Die Radioaktivität der Proben wird im β -Counter gemessen.

2.2.8. Auswertung der erhaltenen Fraktionen aus der Adsorptionschromatographie

Nach der Radioaktivitätsmessung wurden die Zählausbeuten bestimmt, da die verschiedenen Lösungsmittelgemische einen unterschiedlich starken Quench haben. Die Messwerte der Fraktionen A und B wurden jeweils mit dem Quenchfaktor 1,34, die der Fraktion C mit dem Faktor 1,45, die der Fraktion D mit dem Faktor 1,7 und die der Fraktion E mit dem Faktor 2,1 multipliziert. Diese Quenchfaktoren wurden durch die Bestimmung der Zählausbeuten einer [^3H]-Standardlösung, die im betreffenden

Lösungsmittelgemisch gezählt wurde, bestimmt. Nach der Quenchkorrektur wurde eine Volumenkorrektur mit dem Faktor 3 durchgeführt, da von den 300 µl Testansatz nur 100 µl eingesetzt wurden. Die korrigierten Werte wurden summiert und auf die Ausgangsmenge von 30.000 cpm (50 pmol) $^3\text{H-PGE}_1$ normiert. Die Summe der so errechneten Werte der Fraktionen D und E wurden um die Kontrollinkubation (Blankwert) korrigiert. Der ermittelte Wert entspricht der Menge an synthetisiertem cPIP. Der so erhaltene Radioaktivitätswert wurde mit dem Faktor 0,051 multipliziert und ergab so den Stoffumsatz von PGE zu cPIP in pmol (5,1 µmol/l $^3\text{H-PGE}_1$ -Konzentration im Test). Durch Berücksichtigung der Inkubationszeit des Testes sowie der Proteinkonzentration lässt sich die spezifische Aktivität der cPIP-Synthase in pmol/min x mg Protein errechnen.

2.2.9. Isolierung von Ratten-Leberplasmamembran (Modifizierte Methode nach Wasner)

Die Plasmamembranen wurden nach einer modifizierten Methode nach Wasner (1976) aus Rattenleber hergestellt.

Nach Entnahme der Leber wurde diese von Bindegewebe befreit, zerkleinert und mit einem Glashomogenisator in jeweils 300 ml Plasmamembran-Puffer homogenisiert. Nach Filtration durch Verbandmull (8- und 16-lagig) wurde das Homogenat auf einen Saccharosestufengradienten (% w/v) aufgetragen. Durch die nachfolgende 90-minütige Zentrifugation bei 4°C und 27.000 rpm mit dem Beckman SW 28-Rotor (130.000 x g) wurde das Homogenat, wie in Abb. 2.2.9.1. gezeigt, aufgetrennt.

Anschließend wird die plasmamembranhaltige Bande entnommen, mit der siebenfachen Menge an Plasmamembran-Puffer verdünnt und bei 4°C 30 min bei 10.000 rpm im GSA-Rotor (16.300 x g) abzentrifugiert. Das so erhaltene Pellet bestand aus einer festen, unteren (a) und einer weicheren, oberen Schicht (b), die beide neben Mikrosomen als Verunreinigung Plasmamembran enthalten. Diese Schichten wurden getrennt, in Plasmamembran-Puffer resuspendiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dieser Zentrifugationsschritt wurde noch 2-3 mal wiederholt (c - e), bis der Überstand klar war. Die erhaltenen Pellets wurden analog in Puffer aufgenommen und eingefroren. Nach der letzten Zentrifugation wurde der verbleibende Überstand verworfen.

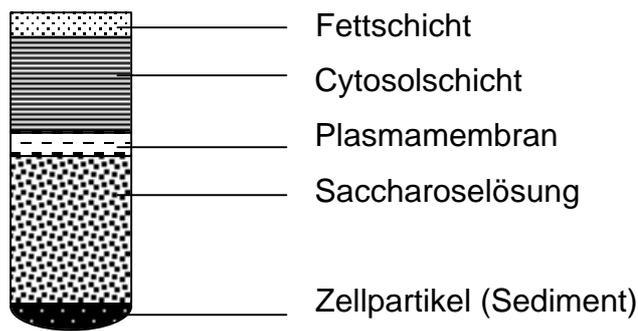


Abb.:2.2.9.1.: Schematische Darstellung der Auftrennung der verschiedenen Bestandteile des Homogenates nach Zentrifugation

2.2.10. Proteinbestimmung (nach Smith et al., 1985)

Für die Proteinbestimmung wurde der BCA-Protein-Assay der Firma Pierce verwendet. Man kann Proteine in einem Konzentrationsbereich von 20 - 2000 µg/ml messen. Die Reaktion beruht darauf, dass Cu^{2+} im alkalischen Medium durch Proteine zu Cu^+ reduziert wird und dann zwei Moleküle BCA (Bicinchoninsäure) mit Cu^+ zu einem purpurfarbenen Komplex reagieren, dessen Farbintensität der Proteinkonzentration proportional ist und bei 562 nm spektralphotometrisch gemessen werden kann. Als Standard dient Rinderserumalbumin. Zur Erstellung einer Eichkurve mischt man 50 Teile Reagenz A mit einem Teil Reagenz B. Zur Proteinbestimmung wurden 100 µl Standardlösung mit 2 ml Reagenzlösung versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen bei Raumtemperatur erfolgt die photometrische Bestimmung. Die Messungen wurden gemäß der Produktbeschreibung des Herstellers durchgeführt.

2.2.11. Differentialzentrifugation zur Gewinnung des partikulären Enzyms für die Aktivierung des Precursors

Die Synthese des n-IP erfolgt durch ein partikuläres Enzym, das aus der Rattenleber isoliert wird. Die Rattenleber (ca. 13 g) wird entnommen und mit 40 ml einer 0,32 M Saccharose-Lösung (Lösung I) homogenisiert und entsprechend dem Schema (Abb 2.2.11.1.) zentrifugiert (87).

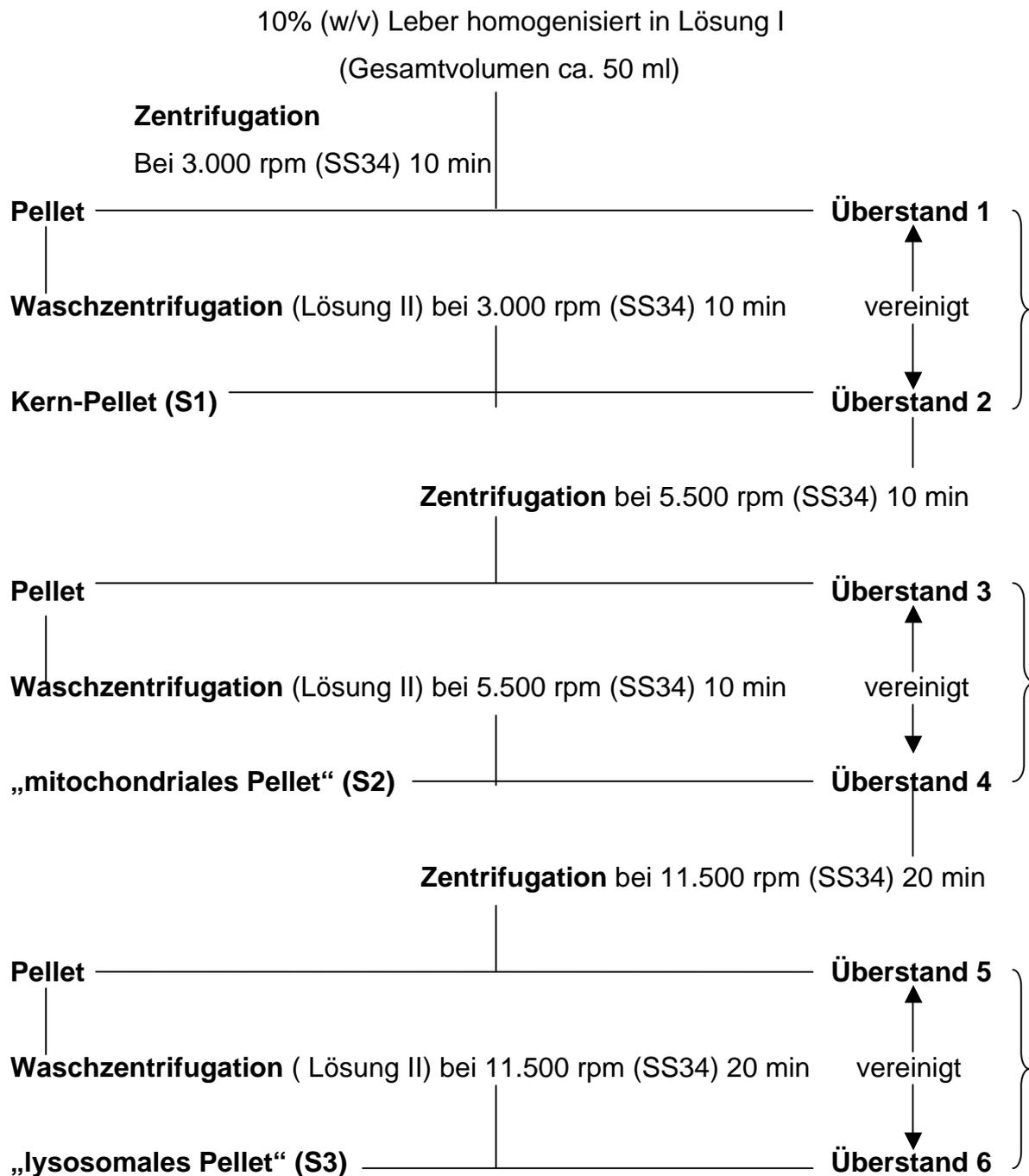


Abb.2.2.11.1.: Schema der Differentialzentrifugation eines Rattenleberhomogenats

Die einzelnen zellulären Fraktionen wurden nachfolgend auf das Vorliegen des partikulären Enzyms, welches den Precursor in das aktivierte Inositolphosphat (n-IP) überführt, hin getestet.

2.2.12. Lokalisierung des partikulären Enzyms

Die mit der Differentialzentrifugation erhaltenen Sedimentfraktionen S1, S2, S3 wurde auf die Menge an partikulärem Enzyms hin getestet. Im S2 befindet sich das meiste Enzym und so wird diese Fraktion für die weiteren Versuche verwendet.

2.2.13. Zeitkinetik der n-IP-Synthese

Reaktionsansätze wurden 0; 0,5; 1; 2; 6 und 10 min bei 37°C (Wasserbad) inkubiert (siehe Test unter 2.2.5). Die Aufarbeitung der Inkubationen erfolgte wie unter 2.2.5. und 2.2.6 beschrieben.

2.2.14. GTP-, Substrat- und Enzym-Abhängigkeit der n-IP Synthese

Für die Untersuchung der GTP-Abhängigkeit erfolgt die Inkubation mit folgenden GTP-Konzentrationen: 0; 0,2; 2; 0,4; 0,8; 1,2; 2 und 4 mM.

Bei der Substrat-Abhängigkeit werden folgende Mengen an Precursor in den Test eingesetzt: 50, 100, 150, 200 und 300 µl.

Die Inkubationsansätze bei der Enzym-Abhängigkeit erhielten folgende Mengen an partikuläres Enzym: 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500 und 600 µg.

2.2.15. Anionenaustauscherchromatographie

Die verwendete Q-Sepharose-Säule (Q-Sepharose von Pharmacia; 45 ml Säulenvolumen, von 1,5 cm Durchmesser und 30 cm Länge) wurde mit 10 mM Kaliumacetat-Puffer (A) pH 5,5 äquilibriert. Anschließend wurde 2 ml Probe aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem Puffergradienten von 0 - 0,25 M Kaliumbromid von je 200 ml Volumen, wobei 4 ml Fraktionen aufgefangen wurden. Die Absorption des Eluates wurde mit Hilfe eines Durchfluß-photometers bei 280 nm aufgezeichnet. Die aufgefangenen Fraktionen wurden anschließend auf ihren Substanzgehalt hin getestet.

2.2.16. pH-Stabilität des Precursors

Um die pH-Stabilität des Precursors zu ermitteln, wurden 100 µl Precursor-Aliquots mit 1 M KOH oder HCl vom pH 6,5 auf pH von 3, 5, 7 und 9 gebracht und 30 min auf Eis stehen lassen. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Proben neutralisiert und in den cPIP-Test eingesetzt.

2.2.17. Zur Stabilität des Precursors bzw. n-IP

Um den Einfluß von Salzkonzentrationen auf die Stabilität des Precursors bzw. des n-IP zu messen, wurden jeweils 100 µl vor dem Einsatz in den n-IP-Synthese-Test mit 3,2 µl, 8 µl, 16 µl bzw. 32 µl 4 M NaCl versetzt, auf 132 µl mit Millipore-wasser aufgefüllt (entsprechend einer Endkonzentration von 100 mM, 250 mM, 500 mM und 1 M NaCl) und für 30 min auf Eis gelagert. Durch direkte Zugabe der o.a. Volumina 4M NaCl zur Inkubation wird der hemmende Effekt des Salzes auf den cPIP-Synthese-Test ermittelt. Die resultierenden Werte an synthetisiertem cPIP werden um den Korrekturfaktor 1,1 (250mM NaCl), 1,2 (500mM NaCl) bzw. 1,4 (1M NaCl) berichtigt.

2.2.18. Phosphodiester-Hydrolyse von entsprechenden Precursor-Inositolphosphaten

Für die Hydrolyse des Precursors sowie der in den Gefäßmuskelzellen vorhandenen Inositolphosphate wurden ein Volumen von 100 µl Probe mit 5 µl HCl 2N versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben lyophilisiert, um das HCl zu entfernen und anschließend für weitere Tests bzw. Chromatographien verwendet.

2.2.19. ³H-Inositol-Einbau

RASMC kultivierte glatte Gefäßmuskelzellen (von Prof. Lemoine zur Verfügung gestellt), wurden 3 Tage mit 1µCi [³H]-Inositol markiert, dann im frischen Medium für 15 min mit LiCl vorinkubiert und für 1 min mit dem Hormon Angiotensin II (3µM)

stimuliert. Nach abpipettieren des Inkubationsmediums wurde mit kaltem destilliertem Wasser und 0,1mM EDTA gespült.

Nach dem Abschaben der Zellen in dest. Wasser (4 °C) wurden sie mit CHCl₃/CH₃OH denaturiert und zentrifugiert. Die wässrige Lösung wurde dann mit Aktivkohle versetzt und nochmals zentrifugiert. Die erhaltene klare Lösung wurde an Sephadex G15 gelfiltriert. Die Fraktionen, welche die für uns relevanten Inositolphosphate enthielten, wurden vereinigt und durch Anionen-austauscher-Chromatographie weitergereinigt. Die erhaltenen Peaks wurden auf den Gehalt an Precursor getestet. An Stelle von radioaktiv markiertem PGE wurde in diesem Fall unmarkiertes PGE in den Test eingesetzt, aufgrund der Markierung des Precursors.

2.2.20. Einbau von radioaktiv-markiertem GTP

Der n-IP-Synthese-Test wurde mit radioaktiv-markiertem GTP (Tritium markiert) durchgeführt. Statt 20 µl GTP wurden 2 µl [³H]-GTP (2 µCi) und 2 µl unmarkiertes 0,1 M GTP in den Test eingesetzt. Das erhaltene markierte n-IP wurde über Sephadex G15 gelfiltriert, und die Fraktionen auf den Gehalt an [³H]-n-IP getestet. Es wurde kaltes n-IP mitchromatographiert, um die geringe Menge an markiertem n-IP lokalisieren zu können. Die relevanten Fraktionen wurden vereinigt, rechromatographiert und anschließend lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in kaltem Millipore-Wasser resuspendiert und in den cPIP-Biosynthese-Test eingesetzt. Hierbei wurde der cPIP-Test mit unmarkiertem PGE durchgeführt.

2.2.21. Aufarbeitung und Test der Insektenzellen *Chironomus tentans* auf n-IP

Chironomus tentans –Zellen, (von Prof. Dr. Spindler zur Verfügung gestellt), wurden mit Plasmamembran-Puffer versetzt und homogenisiert. Nach dem Denaturieren mit CHCl₃/CH₃OH wurde ein Teil mit Aktivkohle versetzt, anschließend zentrifugiert und lyophilisiert. Die Lyophilisate wurden in Millipore-Wasser resuspendiert und als Substrat oder Enzym in den n-IP-Synthese-Test bzw. cPIP-Test eingesetzt. Ein Teil der Zellen wurde durch Differentialzentrifugation in Sediment und Überstand aufgetrennt. Diese wurden dann auch in den cPIP-Test eingesetzt zur besseren Charakterisierung der n-IP-Synthese in den Insektenzellen.

2.2.22. Darstellung von Inositol-cyclo-bisphosphaten

Für die Synthese von Inositol-cyclo-bisphosphaten wurden folgende myo-Inositol-bisphosphate verwendet:

myo-Inositol-1,4-bisphosphat
myo-Inositol-4,5-bisphosphat
myo-Inositol-5,6-bisphosphat.

Für die Zyklisierung wurden je 50 μ M myo-Inositolbisphosphat mit der 5-fachen Menge an N-Cyclohexyl-N'-(2-Morpholinoethyl)-carbodiimid methyl-p-toluensulfonat (in Wasser gelöst) versetzt. Der pH der Lösung wurde mit TIEA auf einem Wert von 8,5 eingestellt. Diese Mischung wurde 3 Stunden bei RT gerührt. Nach dieser Reaktionszeit wurden je 300 μ l von den neu synthetisierten Substanzen an Stelle des Precursors in den n-IP-Synthese-Test eingesetzt, und erhaltenes n-IP im cPIP-Test quantitativ ermittelt. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit dem aus Rattenleber isolierten Precursor.

2.2.23. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Sowohl der Precursor als auch die durch Anionenaustauscherchromatographie gereinigten Inositolphosphate aus den Muskelzellen wurden im biochemischen Institut der Universität Wuppertal (Arbeitsgruppe Prof. Vogel) mit einer hochauflösenden HPLC-Methode chromatographiert (2). Die markierten Proben wurden in 0,5 ml Fraktionen aufgefangen und im β -Counter gemessen.

Der Precursor wurde auch mit einer anderen HPLC-Methode, der sogenannten MDD (metal dye detection) chromatographiert. Dies ist ein von Mayr et al. entwickeltes Verfahren zur Nachsäulenderivatisierung (siehe Ergebnis-Teil).

Die vorbereitete Probe, gelöst in einem Volumen von 2 ml. bidest. Wasser, wurde über einen Probengeber (Autosampler) ausgestattet mit einer 1 ml Injektionsschleife auf eine Mono Q HR 10/10 Säule mit Vorsäule Resource Q HR 5/5 aufgetragen (Flussrate: 1,5 ml/min). Die an die Anionenaustauscher gebundenen Inositolphosphate wurden mit einem für das Trennproblem optimierten Gradienten eluiert. Das

Eluat passierte zunächst ein Photometer (Detektion bei 254 nm) zum Nachweis von Nucleotiden und anderen UV-absorbierenden Verbindungen.

Dann wurde es in einem Verhältnis von 2 Teilen Eluat auf 1 Teil Nachsäulen-derivatisierungs-Reagenz mit PAR-Indikatorlösung gemischt. Über ein weiteres Photometer wurde die Extinktion des Gemisches bei 546 nm gemessen. Beide Kanäle wurden auf dem Monitor eines angeschlossenen Computers dargestellt. Die Synchroner Aufnahme dieser Chromatogramme ermöglichte die Unterscheidung zwischen phosphorylierten Substanzen ohne UV-Aktivität (z.B. Inositolphosphate) und mit UV-Aktivität (z.B. Nucleotide).

Das Startsignal für den Lauf und die Datenaufzeichnung wurde vom Autosampler an den Controller und den Computer übermittelt. Die Pumpen, der Gradientenmischer und die Photometer wurden über den Controller gesteuert. Der Elutionsgradient wurde aus einer Lösung niedriger Ionenstärke und einer Lösung hoher Ionenstärke über den Gradientenmischer aufgebaut. Zur Auswertung der aufgezeichneten Chromatogramme diente das Programm EZChrom (V6.1, Scientific Software) (2).

3. ERGEBNISSE

3.1. Zur quantitativen Bestimmung von aktiviertem Inositolphosphat (n-IP)

Eine Voraussetzung für die Messung der Biosynthese von n-IP ist, dass das synthetisierte n-IP quantitativ meßbar ist. Um dies zu untersuchen wurde, die Abhängigkeit der cPIP-Synthese von der Menge an aktiviertem Inositolphosphat (n-IP) gemessen. Dazu mußte zuvor die n-IP-Konzentration einer n-IP-Lösung ermittelt werden. Verschiedene, geringe Mengen an n-IP wurden in 35 minütiger Inkubation quantitativ zu cPIP umgesetzt. Da über diese Inkubationszeit die cPIP-Konzentration nach maximalem Umsatz gleich bleibt, wird davon ausgegangen, dass alles n-IP zu cPIP umgesetzt wurde und die exakt meßbare cPIP-Menge der n-IP-Menge proportional ist, d.h. aufgrund der vorgeschlagenen chemischen Struktur für cPIP sollte z.B. 1 Mol cPIP 1 Mol n-IP entsprechen.

Die Abhängigkeit der cPIP-Synthese von der n-IP-Konzentration zeigt bei niedriger Konzentration einen linearen Anstieg. Maximaler Umsatz wird mit 15 µmol n-IP pro Ansatz erreicht. Der Einsatz größerer Mengen n-IP führt zu keinem höheren cPIP-Umsatz, d.h. es ist Substratsättigung erreicht. Daraus wurde ein K_M -Wert von $7,04 \times 10^{-6}$ M ermittelt.

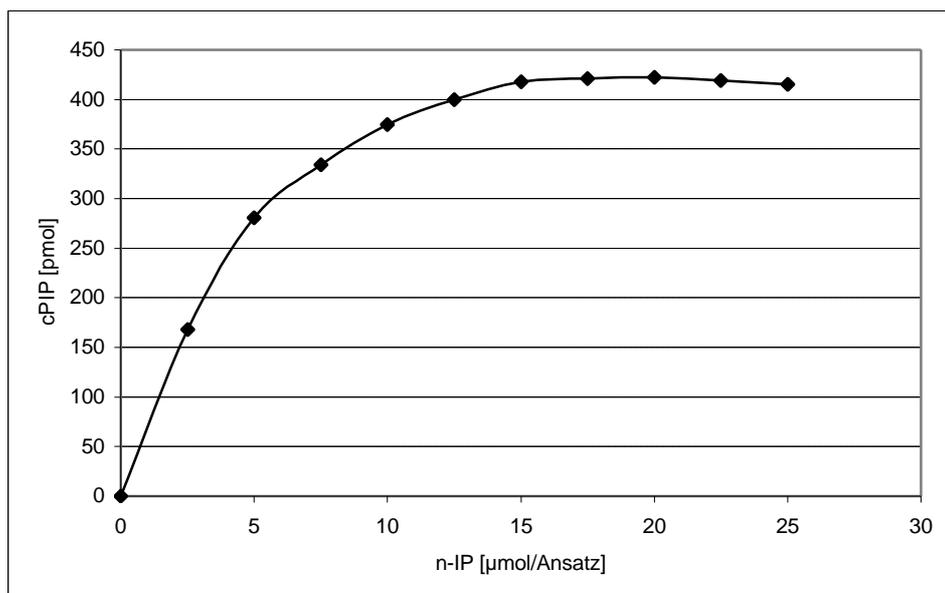


Abb. 3.1.1.: Abhängigkeit der cPIP-Biosynthese von der Menge an eingesetztem n-IP. Die Inkubation erfolgte 10 min bei 30 °C.

3.2. Anreicherung von Precursor-Inositolphosphat

Wie in der Einleitung erwähnt, konnte Gypakis zeigen, dass für die n-IP-Synthese ein Precursor genanntes Inositolphosphat und ein Nucleosidtriphosphat notwendig sind. Jedoch die Bedingungen der Präparation und Reinigung sind vor allem aufgrund der sehr geringen Mengen, die neben der n-IP-Gewinnung anfallen, nicht optimal (22). Ein vorstellbarer Grund könnte darin liegen, dass verschiedene Substanzen des Rohextraktes, wie etwa Aminogruppen-haltige Verbindungen, die Hydrolyse des Phosphodiesters begünstigen. Deshalb wurde wie folgt verfahren:

Zur Precursor-Inositolphosphat-Gewinnung wurde die Rattenleber 50 sec. mit physiologischer Kochsalzlösung, die 10^{-5} M Noradrenalin enthielt, perfundiert, dann für 10 sec. die Leber salzfrei gewaschen, homogenisiert und mit Chloroform/Methanol denaturiert. Nach Trennung der Wasserphase von der organischen Phase wurde restliches Lösungsmittel entfernt und die verbleibende Lösung mit Aktivkohle digeriert. Im Unterschied zu n-IP und den Nucleotiden adsorbiert der Precursor nicht an Aktivkohle und kann auf diese Weise von diesem getrennt werden.

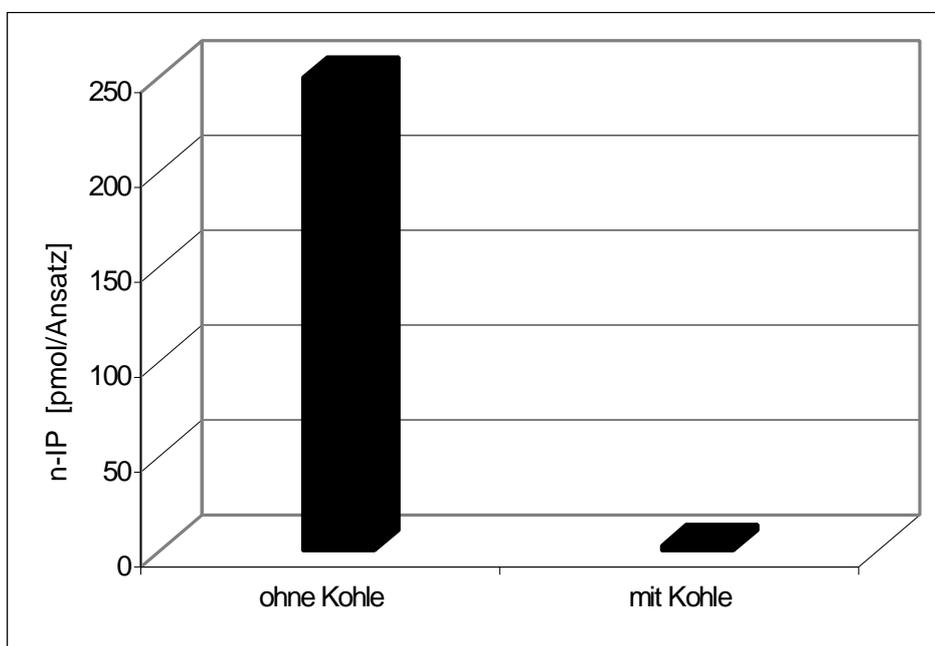


Abb. 3.2.1.: Adsorption von n-IP an Aktivkohle. Die Umsetzung erfolgte für 30 min bei 30 °C. Im Falle einer vorausgegangenen Behandlung einer n-IP-Lösung mit Aktivkohle kann nach Abzentrifugieren der Kohle kein n-IP mehr in der Lösung nachgewiesen werden.

3.3. Reinigung des Precursors durch Gelfiltration an Sephadex G15

Die über Aktivkohle filtrierte und durch Lyophilisation aufkonzentrierte Lösung wurde nach Einstellung des pH-Wertes auf 6,5 auf die Säule gegeben. Die Elution erfolgte mit dest. Wasser wobei durch Verwendung einer Schlauchpumpe eine Flußrate von 6 ml/min erzielt wurde zur schnelleren Elution des Precursors. Wie in Abb. 3.3.1 zu sehen ist, eluiert das Precursor-IP unter diesen Bedingungen in den Fraktionen 50-60, die eine relativ niedrige Leitfähigkeit aufweisen. Die ionischen Substanzen eluieren vor allem in den Fraktionen 68-80. Die Fraktionen 50-60 zeigen auch eine relativ niedrige UV-Absorption bei 254 nm. UV-aktive Substanzen eluieren vor allem in den Fraktionen 20-45. Diese nach dem Kohleschritt verbliebene UV-Absorption ist jedoch vergleichsweise gering (0,09 Skalenteile in Fraktion 32).

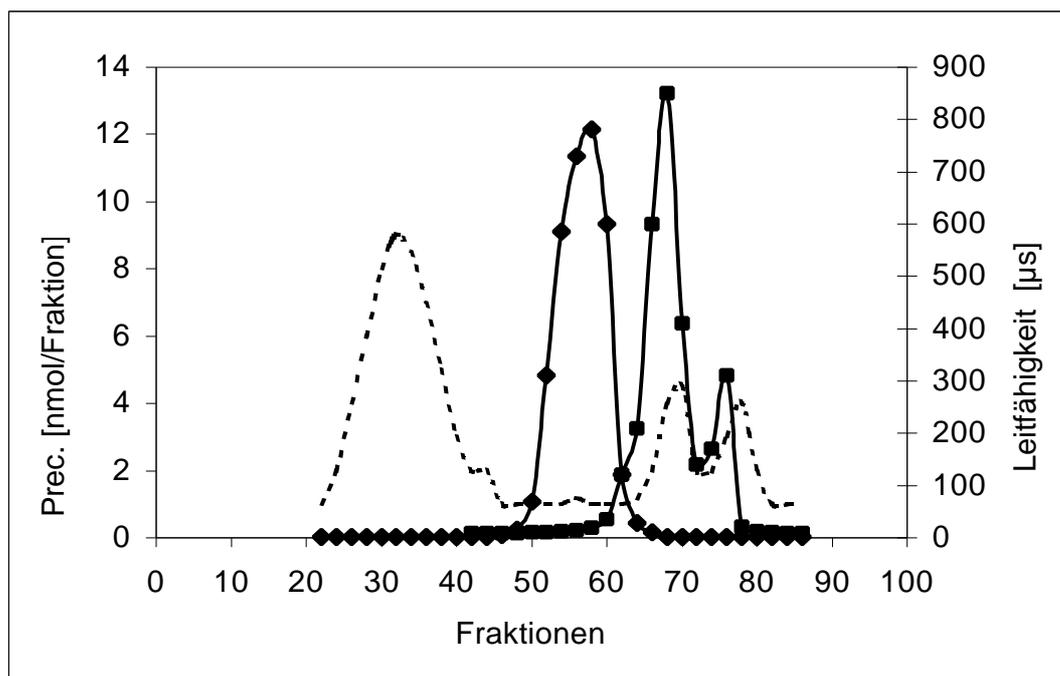


Abb. 3.3.1.: Anreicherung des Precursors durch Gelfiltration an Sephadex G15 (n=12). Die gestrichelte Kurve gibt die UV-Aktivität des Precursors an. Die Peakhöhe ist in Fraktion 32 0,09 Skt. Die zweite Kurve (Rauten) gibt die Elution des Precursors (Fraktionen 50-60) an und die dritte Kurve (Quadrate) stellt die Leitfähigkeit des Eluates in µS dar.

Aus 12 perfundierten Rattenlebern wurde in etwa 73 nMole Precursor isoliert. Wenn man davon ausgeht, dass wir bis zu diesem Schritt keinen Verlust an Precursor hatten, dann wäre bei einem mittleren Lebergewicht von 13 g die Precursor-Konzentration der Leber 0,5 μ molar. Aus den Daten von Gypakis (22) kann man ersehen, dass er im Mittel 0,11 nMole Precursor pro Ratte isolierte, während unter den verbesserten Bedingungen 6 nMole Precursor pro Ratte gewonnen werden konnte. Es wurde also eine etwa 50-fache Steigerung der Ausbeute erzielt.

3.4. Reinigung des Prec-IP durch Anionenaustauscherchromatographie

Aufgrund der wesentlich verbesserten Ausbeute bei der Gelfiltration wurde als nächster Reinigungsschritt Anionenaustauscherchromatographie ausgeführt. Der gelfiltrierte Precursor (Fraktionen 48-62 der Abb. 3.3.1.) wurde auf eine Q-Sepharose-Säule aufgetragen und mit einem linearen Salz-Gradienten eluiert, nachdem zuvor die Elutionsbedingungen durch Chromatographie von AMP, ADP und ATP, die in den Fraktionen 31, 49 und 61 eluierten, ermittelt wurde. In dem Versuch der Abb. 3.4.1. wurde eine Ausbeute von 10 % erzielt. Im Schnitt schwankten die Ausbeuten zwischen 5-22 %.

Da uns die Labilität des Precursors bewußt war, wurde zur Optimierung der Chromatographie zweierlei versucht: Erstens wurde durch Anlegen hoher Flußraten die Chromatographie-Zeit verkürzt und zweitens wurde im leicht saurem pH-Bereich chromatographiert, unter Bedingungen also, unter denen das Prec.-IP unter niedriger Salzkonzentration eluiert.

Trotz dieser neuen Bedingungen ist es nicht gelungen, höhere Ausbeuten zu erzielen.

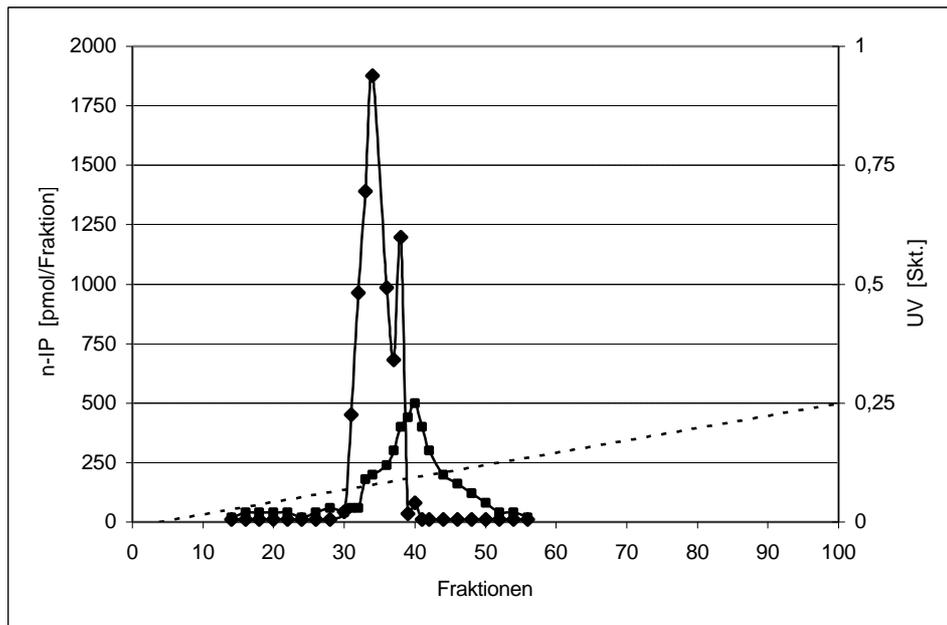


Abb. 3.4.1.: Anionenaustauscherchromatographie des Prec-IP an einer Q-Sepharose-Säule (10 mM Acetat-Puffer pH 5,5, Flußrate 2ml/min). Die Rauten-Kurve veranschaulicht die Elution von n-IP und die mit Quadraten dargestellte Kurve die UV-Absorption der Fraktionen. Das Maximum in Fraktion 40 entspricht 0,25 Skt. Die getrichelte Kurve gibt den linearen Salz-Gradienten von 0 - 0,25 M KBr an. Bei einem Gesamtvolumen des Gradienten von 400 ml wurden 100 Fraktionen von 4 ml erhalten.

3.5. Chromatographie der Prec-IP-Lösung mittels HPLC

Nachdem es nicht gelang die Ausbeute an Prec-IP nach der Anionenaustauscherchromatographie zu steigern und eine weiterführende Anreicherung und Reinigung des Prec-IP wenig aussichtsreich erschien, so galt es wenigstens den erzielten Anreicherungsgrad zu charakterisieren. Die Abreicherung von Verunreinigungen zeigt die Tabelle 3.5.1.

Ausgeführte Reinigungsschritte	Ausbeute [g]
Leber	156
wasserlöslicher Rohextrakt	4
Extrakt nach Aktivkohle	0,7
Prec-IP-Lösung nach Gelfiltration	0,08

Tabelle 3.5.1.: Abreicherung von Verunreinigungen im Laufe der Prec-IP Reinigung.

Wenn man davon ausgeht, dass über den kurzen Anreicherungswege die Ausbeute an Precursor 100 % wäre, dann wäre eine 3100-fache Anreicherung erzielt worden. Für eine weitere Charakterisierung der Prec-IP-Lösung erschien uns die HPLC-Methode günstig. Die Prec-IP-Lösung wurde unter Anwendung der von Mayr (46) und von Adelt (2) entwickelten Verfahren chromatographiert.

Da die Inositolphosphate keine chromophoren Gruppen haben, sind sie im UV- und im sichtbaren Bereich nicht direkt photometrisch nachweisbar. Um dieses Detektionsproblem zu lösen, entwickelte Mayr ein Verfahren zur Nachsäulenderivatisierung (46): Nach der chromatographischen Trennung werden dem Eluat der Farbstoff 4-(2-Pyridylazo-resorcinol (PAR) und Yttrium(III)-Ionen beigemischt. Der gelbe Farbstoff PAR bildet im alkalischen Medium mit Yttrium(III)-Ionen einen orangerot gefärbten Komplex. Die ebenfalls komplexierend wirkenden Inositolphosphate konkurrieren mit dem Farbstoff um die Yttrium(III)-Ionen. Es resultiert eine Entfärbung bzw. Farbverschiebung von orangerot nach gelb, die mit einer Extinktionsabnahme bei 546 nm verbunden ist. Die im Chromatogramm abgebildeten positiven Signale resultieren aus einer Transformation der gemessenen Extinktionen (2). Die Methode wird als HPLC-metal dye detection (MDD) bezeichnet.

Das mit der Prec-IP-Lösung erzielte Chromatogramm ist in der Abb. 3.5.2. gezeigt. Unter dem ersten Peak (1) eluieren ungeladene und unbekannte Substanzen. Im Bereich des zweiten Peaks (2) also nach 20-30 min eluieren sowohl die Inositolbis- und trisphosphate als auch Nukleotide. Unter dem dritten Peak (3) eluieren die höher phosphorylierten Verbindungen. Die UV-Absorption des Eluates zeigt die Abb. 3.5.3. Die niedrige Absorption von weniger als 0,04 Skt. veranschaulicht, dass die Prec-IP-Lösung nur relativ geringe Mengen an UV-aktiven Verbindungen enthält.

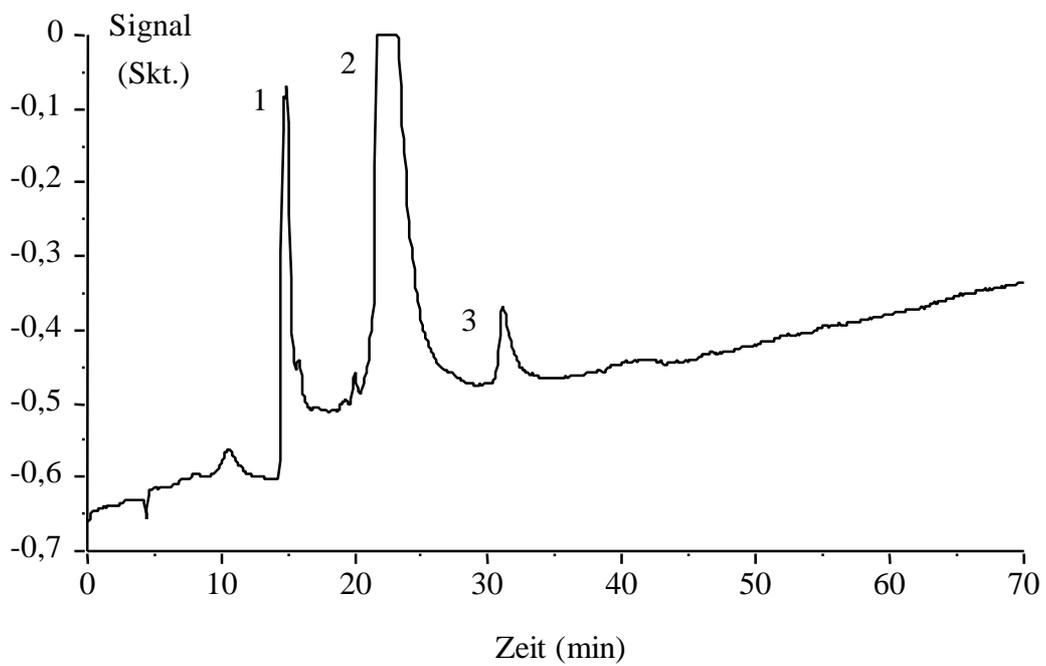


Abb. 3.5.2.: Analyse der Prec-IP-Lösung durch HPLC-MDD.

Es wurde ein linearer Gradient angelegt, von 0,2 mM HCl bis 0,5 M HCl. Die Flußrate betrug 1,5 ml/min.

Die Methode besitzt ein gutes Auflösungsvermögen im Bereich der InsP_4 - und InsP_5 -Isomere, wohingegen eine Reihe von InsP_2 - und InsP_3 -Isomeren ko-eluierten. Erklärung der Peaks 1-3 siehe Seite 35.

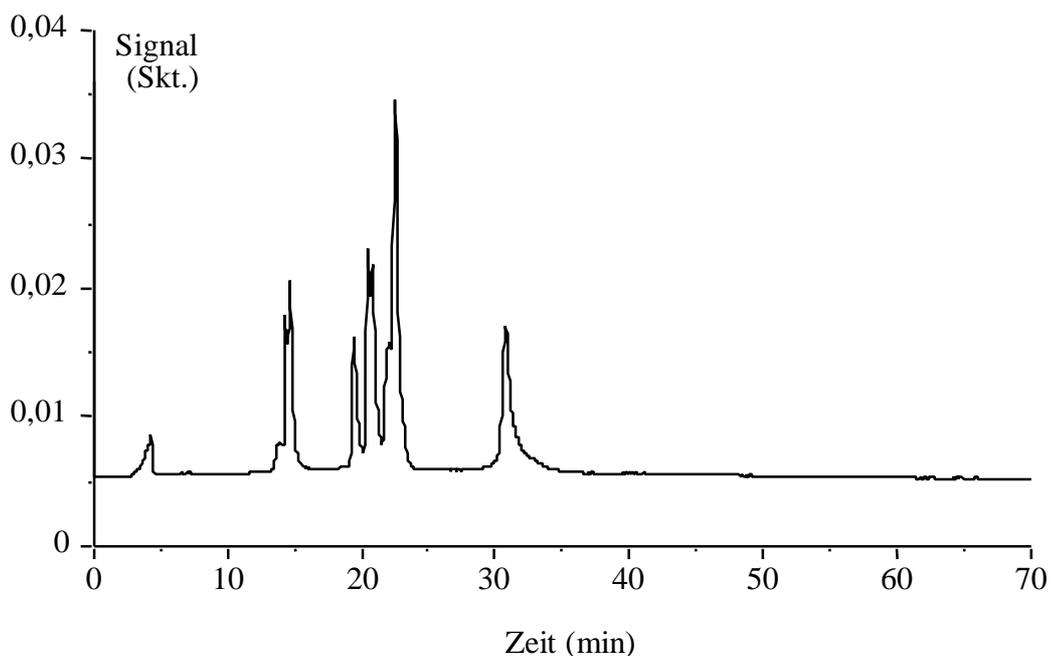


Abb. 3.5.3.: UV-Profil des mittels HPLC-MDD analysierten Prec-IP-Lösung (siehe Abb. 3.5.2.)

Von Adelt wurde die Methode der Ionenchromatographie zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Inositolphosphaten angewandt. Die Abb. 3.5.4. zeigt die Auftrennung verschiedener Inositolbisphosphate und die Tabelle 3.5.5. veranschaulicht welches InsP₂-Isomer unter welchem der drei Substanzgipfel 8-10 eluiert.

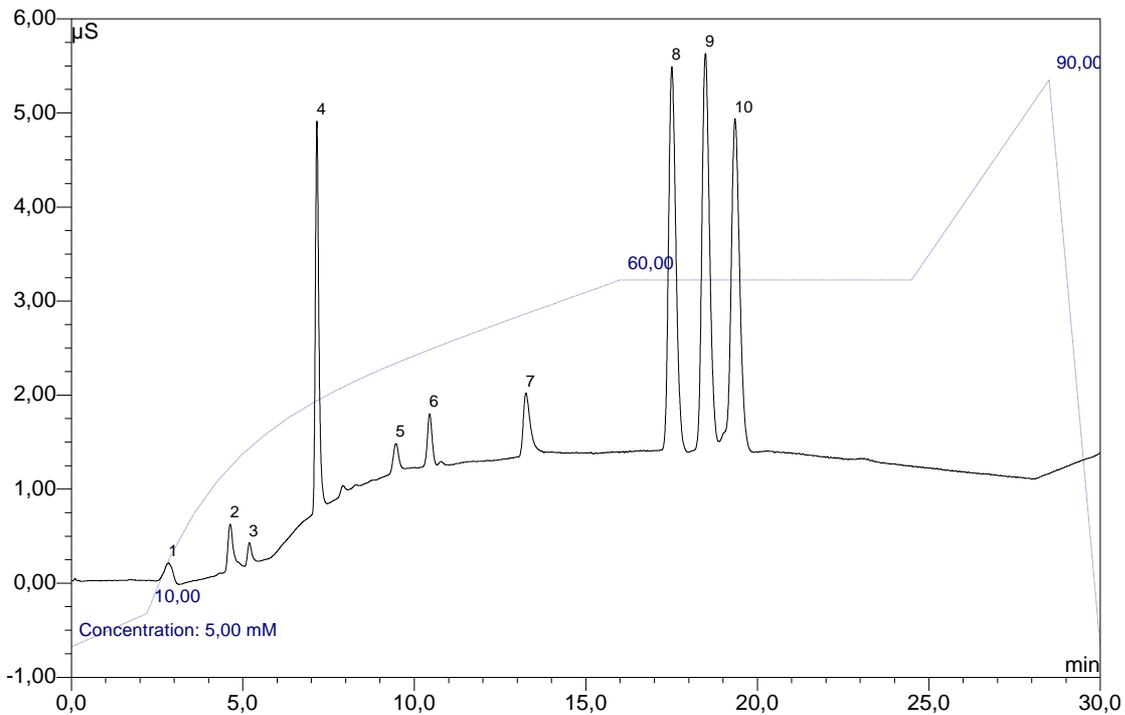


Abb. 3.5.4.: Auftrennung verschiedener Inositolbisphosphate (siehe Tabelle 3.5.5.) an eine Q-Sepharose-Säule (HPLC-Anlage). Die gestrichelte Kurve zeigt den KOH-Gradienten

Peak-Nr.	Probe	Elutionszeit [min]
4	Chlorid	7,16
1-3; 5-7	Verunreinigungen	2,5-13,5
8	Inositol 1,6- bzw. 3,4- bisphosphat	17,50
9	Inositol 4,5- bzw. 5,6-bisphosphat	18,50
10	Inositol 1,4- bzw. 3,6-bisphosphat	19,35

Tabelle 3.5.5.: Zuordnung verschiedener Inositolbisphosphat-Isomere zu den durch Leitfähigkeitsdetektion ermittelten Substanzgipfeln 8-10.

Die Abbildungen 3.5.6. und 3.5.7. zeigen die Ionenchromatographie der Prec-IP-Lösung an einer IonPac AS11-HC-Säule (von Dionex) unter Anwendung eines Leitfähigkeitsdetektors sowie eines UV-Detektors.

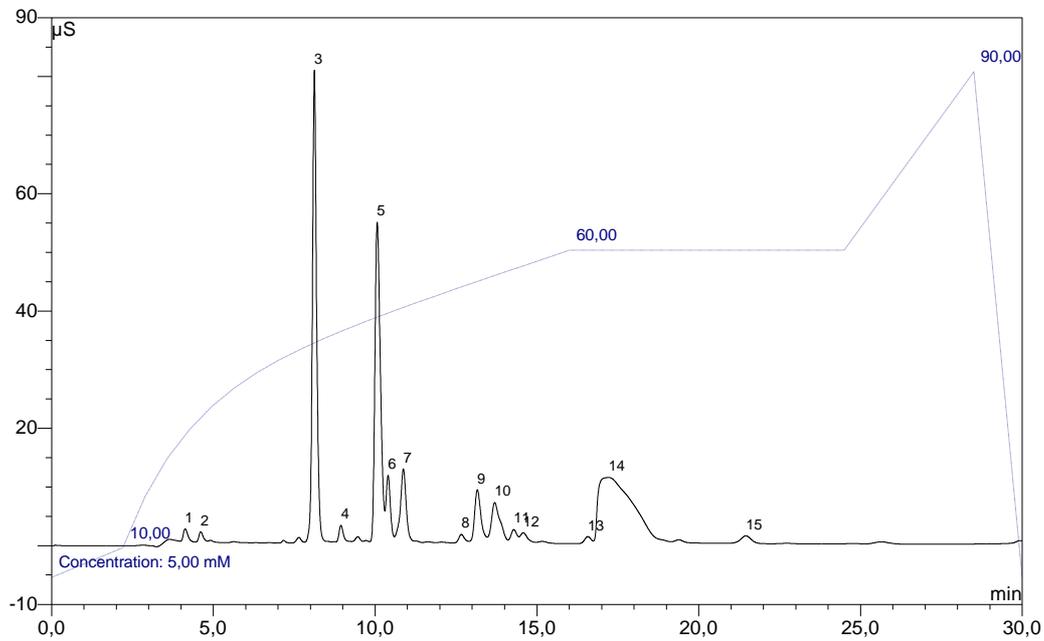


Abb. 3.5.6.: HPLC der durch Gelfiltration angereicherten Prec-IP-Lösung unter analogen Bedingungen der Abb. 3.5.4.

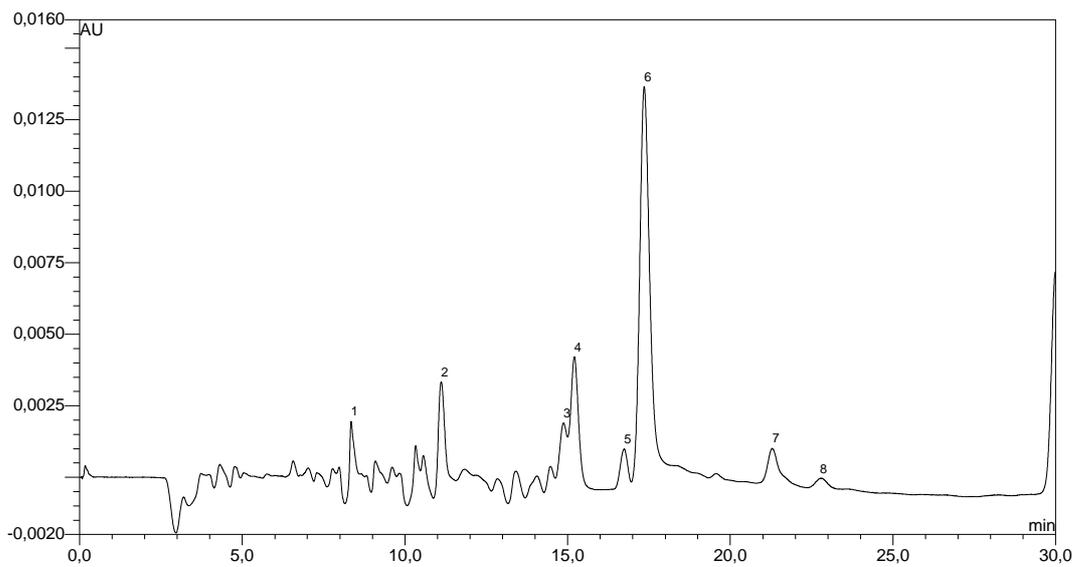


Abb. 3.5.7.: UV-Profil des an HPLC angereicherten Prec-IP-Lösung

Der Substanzgipfel Nr. 3 der Abb. 3.5.6. kann, aufgrund der Elutionszeit, anwesenden Chloridionen zugeschrieben werden. Alle anderen Substanzgipfel wurden nicht identifiziert. Besonders auffällig ist der Substanzgipfel Nr. 14 aufgrund seiner ungewöhnlich großen Elutionsbreite. Integration der Peakfläche ergab, dass auf diesem Substanzgipfel 30% der Gesamtfläche der detektierten Ionen entfallen. Aufgrund folgender Überlegung könnte es möglich sein, dass dieser Gipfel dem Prec-IP zuzuordnen ist. Das Prec-IP sollte aufgrund seines zyklischen Phosphodiesteres etwas früher als das 1,4-IP₂ eluieren, das zwischen 19-19,5 min von der Säule kommt. (Abb. 3.5.4.). Aufgrund seiner Labilität ist davon auszugehen, dass es während der Chromatographie zerfällt, d.h. der cyclische Phosphodiester hydrolysiert zum Monoester. Dieser kontinuierliche Zerfall sollte zu einer Gipfelverbreiterung führen. Da nur der Substanzgipfel Nr. 14 eine derartige Charakteristik zeigt, könnte es möglich sein, dass er dem Prec-IP zuzuordnen ist. Aus der Abb. 3.5.7. ist zu ersehen, dass im Bereich der Elution des Substanzgipfels Nr. 14 auch eine unbekannte UV-aktive Substanz ohne Verbreiterung des Substanzgipfels eluiert (Substanzgipfel Nr. 6 der Abb. 3.5.7.).

3.6. Biosynthese von cPIP

Gypakis hatte schon nahegelegt, dass für die Synthese von n-IP die zwei Substrate Prec-IP und Nukleosidtriphosphat notwendig sind (22). Seine Prec-IP-Lösungen enthielten jedoch meist auch noch n-IP, deshalb wiederholten wir diesen Versuch mit reinerem Prec-IP. Wie die Tabelle 3.6.1. und die Abb. 3.6.2. zeigen, erfolgt keine n-IP-Synthese, wenn eines der beiden Substrate fehlt. Die Ergebnisse dieser Tests sind in der Tabelle 3.6.1. aufgeführt.

Substrate	Umsatz [cpm]	Umsatz [pmol]
Enzym + Precursor	–	–
Enzym + GTP	–	–
Enzym + Precursor + GTP	5320	271

Tabelle 3.6.1.: Abhängigkeit der n-IP Synthese von verschiedenen Substanzkombinationen

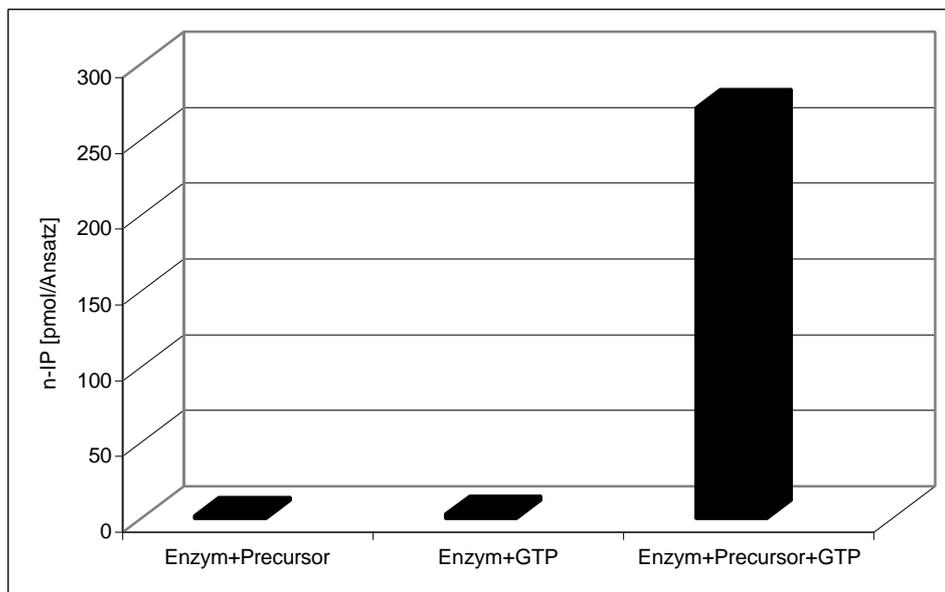


Abb. 3.6.2.: Abhängigkeit der n-IP-Synthese von den beiden Substraten, Prec-IP und GTP.

3.7. Einfluß der Fluoridkonzentration auf die n-IP Synthese

Die Substrate Prec-IP und Nukleosidtriphosphat, wie auch das Produkt n-IP sind Phosphat-haltige Substanzen. Deshalb ist vorstellbar, dass Phosphatasen die n-IP Synthese stören. Deshalb wurde der Effekt von Fluorid als Phosphatase-Hemmstoff auf die n-IP Synthese ermittelt. Es wurde die Abhängigkeit der n-IP-Synthese von der Fluoridkonzentration gemessen. Bei Einsatz einer gleichbleibenden Precursor-Menge wurde die Ausbeute an n-IP in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an Fluorid ermittelt. Abb. 3.7.1. zeigt, dass eine maximale n-IP Synthese mit einer Fluoridkonzentration von etwa 0,1 M erzielt wird. Bis zur dieser Konzentration steigt die n-IP Synthese an und fällt anschließend wieder ab, was auf einen störenden Salzeffekt auf das n-IP-synthetisierende Enzym zurückzuführen sein könnte.

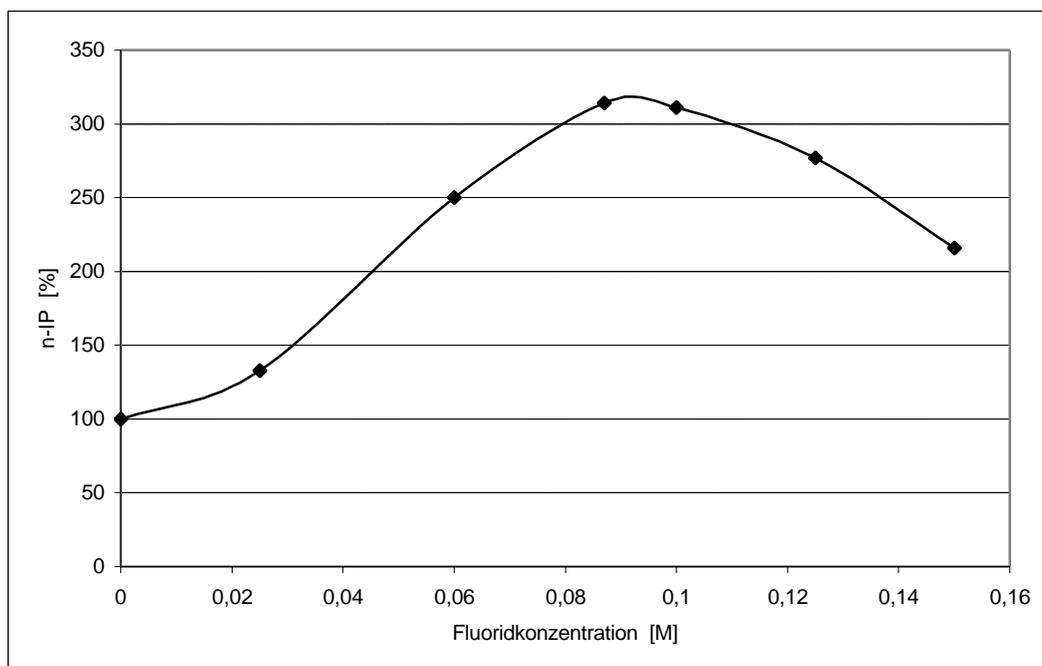


Abb. 3.7.1.: Abhängigkeit der n-IP-Synthese von der Konzentration an Fluorid, einem Phosphatase-Inhibitor. Es wurden steigende Mengen an Fluorid (siehe Abbildung) dem Synthese-Test von n-IP zugegeben.

3.8. Einsatz verschiedener Nucleotide

Wie in der Tabelle 3.6.1. gezeigt wird für die n-IP Synthese ein Nucleosidtriphosphat neben dem Prec-IP benötigt.

Um zu überprüfen mit welchem der vier möglichen Nucleotide der beste Umsatz erzielt wird, wurde die n-IP-Biosynthese mit je einem der 4 möglichen Nucleotide durchgeführt. Abb. 3.8.1. zeigt, dass der Einsatz von GTP als Substrat die größte Ausbeute an cPIP bringt, während CTP den geringsten und ATP und UTP mittlere Syntheseraten an n-IP erbringen.

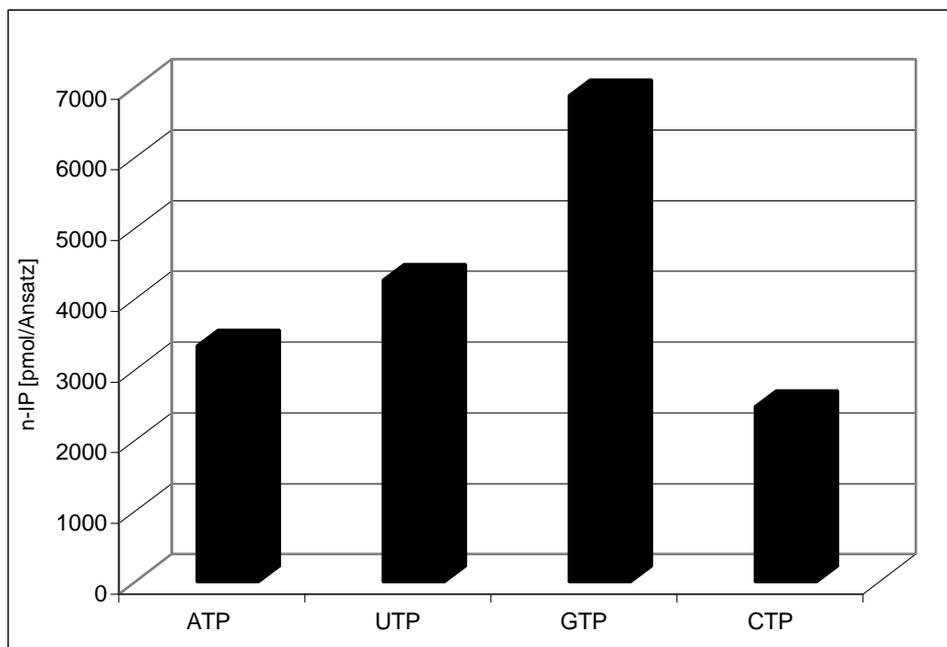


Abb. 3.8.1.: Biosynthese von n-IP unter Einsatz der vier möglichen Nucleosidtriphosphate (n=3)

Es wurde die gleiche Menge der vier Nucleosidtriphosphate in den Test der n-IP-Synthese eingesetzt und der erzielte Umsatz bestimmt.

3.9. Charakterisierung der n-IP Synthese

3.9.1. Zeitabhängigkeit der n-IP-Biosynthese

Die Abhängigkeit der n-IP-Biosynthese wurde von der Inkubationsdauer gemessen. Abb. 3.9.1.1. zeigt, dass unter den angewandten Bedingungen die Synthese von n-IP 2 min linear ansteigt, ein Plateau erreicht und dann ab 3 min abfällt.

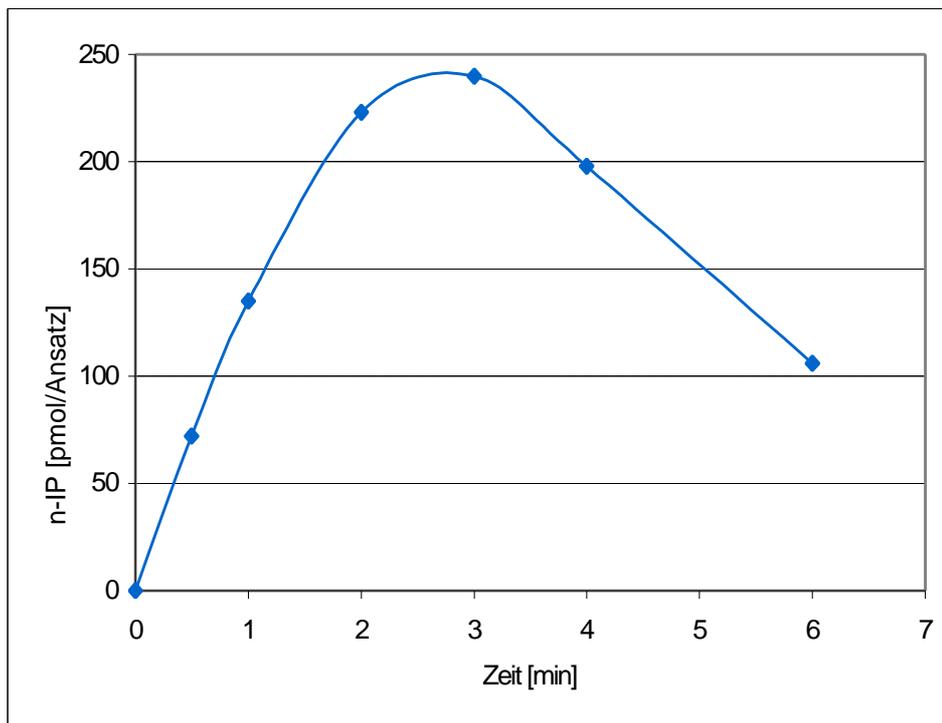


Abb. 3.9.1.1.: Zeitabhängigkeit der n-IP-Synthese (n=6)

Es wurde eine konstante Menge an Prec-IP und Enzym in den Test eingesetzt. Die Inkubationsdauer wurde von 0 min bis 6 min erhöht und der erzielte Umsatz bestimmt.

3.9.2. Enzymabhängigkeit der n-IP-Synthese

Das n-IP-Synthese Enzym wird durch Differentialzentrifugation des Rattenleberhomogenats gewonnen. Es findet sich in dem Sediment (S2), in dem vor allem Mitochondrien vorliegen, in Bestätigung der Resultate von Gypakis. Die Abb. 3.9.2.1. zeigt, dass die Abhängigkeit der n-IP Synthese von der Enzymmenge bis 200 μg Protein linear verläuft und bei höheren Proteinmengen geringfügig abfällt.

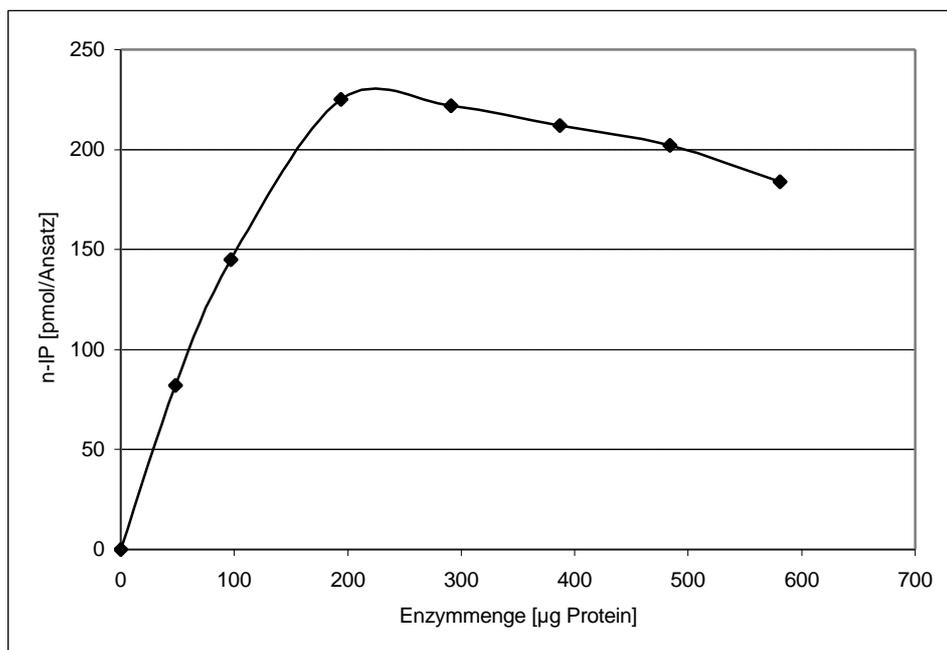


Abb. 3.9.2.1.: Abhängigkeit der n-IP-Synthese von der Enzym-Konzentration (n=5)

Es wurde eine konstante Menge an Prec-IP mit steigenden Enzymmengen umgesetzt (siehe Abbildung); die Inkubationszeit war 2 min.

In allen weiteren Untersuchungen werden 100-200 μg Enzym in den n-IP-Test eingesetzt.

3.9.3. Substratabhängigkeit der n-IP-Synthese

Es wurden steigende Mengen von Precursor bei konstanter GTP-Konzentration von 4 mM in den Test eingesetzt. Der maximale cPIP-Umsatz von 300 pmol/Inkubation wird bei einer Precursor-Menge von 100 μ l erreicht im Falle der verwendeten Lösung. Jedoch im Falle verschiedener und auch gelagerter Lösungen waren die pro μ l erzielten Umsätze verschieden.

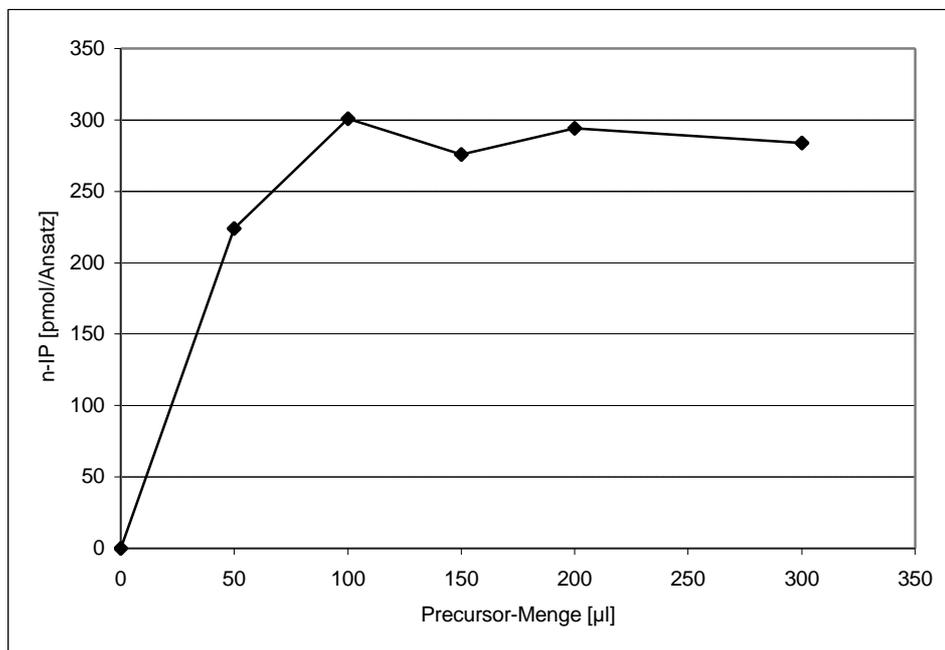


Abb. 3.9.3.1.: Abhängigkeit der n-IP-Synthese von der Precursor-Konzentration (n=4). Es wurden steigende Mengen an Prec-IP und eine konstante Menge an Enzym und GTP in den n-IP Synthese-Test eingesetzt und der erzielte Umsatz bestimmt.

3.9.4. Abhängigkeit der n-IP Synthese von der GTP-Konzentration

Die Umsetzung des Precursors zu n-IP wurde bei steigender GTP-Konzentration und einer konstanten Menge an Precursor (100 μ l) gemessen.

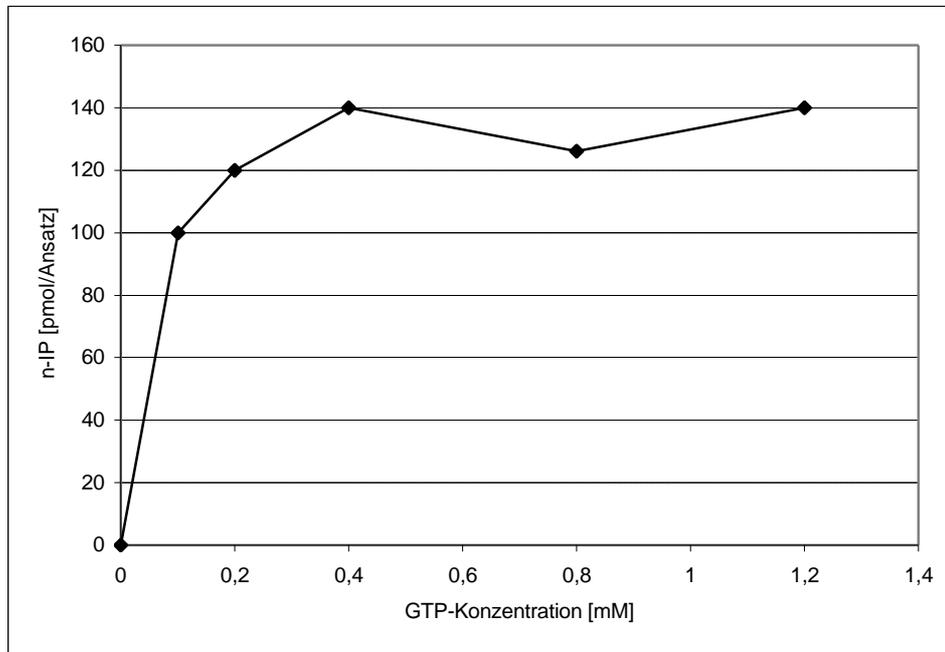


Abb. 3.9.4.1.: Abhängigkeit der n-IP Synthese von der GTP-Konzentration

Der Abbildung 3.9.4.1. ist zu entnehmen, dass die Synthese von n-IP zunächst ansteigt und bei etwa 0,4 mM GTP ein Plateau erreicht.

3.10. Labilität des Precursors

Vorversuche von Gypakis zeigten, dass der Precursor sehr labil ist. Er hat unter anderem gezeigt, dass er in 1M HCl in 1 min zersetzt ist. Die Inositolphosphate sind relativ stabile Substanzen. Nur Inositolphosphate mit cyklischer Phosphodiesterstruktur sind labil aufgrund der Spannung des Phosphodiester-5-Ringes. Abbau des Precursors mit Phosphodiesterasen hat Gypakis nachgewiesen (22). Diese Inaktivierung des Precursors durch Hydrolyse des Phosphodiesters ist ein Hinweis dafür, dass diese Diesterstruktur essentiell für die Umsetzung des Precursors zu n-IP ist.

Es wurde die Abhängigkeit des Precursors von Ionenstärke, pH und Lagerung gemessen, vor allem um Bedingungen zu finden, unter denen das Prec-IP stabil gehalten werden kann.

3.10.1. Precursor-Stabilität in Abhängigkeit von der Ionenstärke

Um die Stabilität des Precursor in Abhängigkeit von der Ionenstärke zu prüfen, wurde eine konstante Menge Precursor mit steigender Menge an NaCl für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend die verbleibende Menge an Precursor ermittelt.

Um den Einfluß der Salzkonzentrationen auf die Stabilität des Monoesters des n-IP's zu messen, wurde analog 100 µl einer n-IP-Monoester-Lösung mit steigender Menge an Kochsalz für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend die verbleibende Menge an n-IP gemessen.

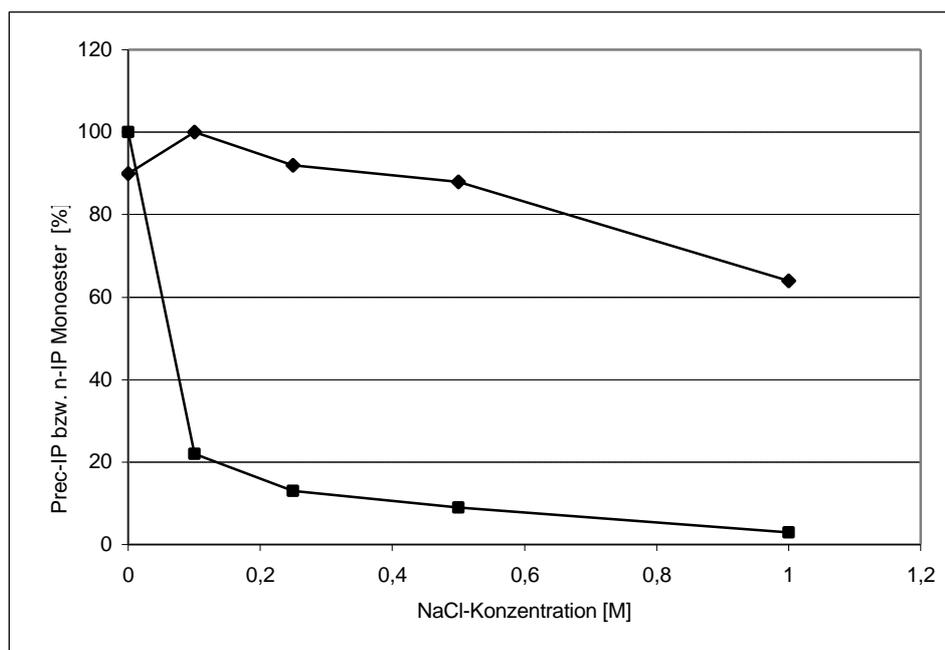


Abb. 3.10.1.1.: Stabilität des Precursors (untere Kurve) und des Monoesters des n-n-IP (obere Kurve) in Abhängigkeit von der Ionenstärke

Abb. 3.10.1.1. zeigt, dass unter diesen Bedingungen bei Berücksichtigung der entsprechenden Kontrollinkubation in Anwesenheit von 0,1 M NaCl nur noch 20% des Precursors sich zu n-IP umsetzen lassen. Bei höherer Salzkonzentration fällt der Umsatz von Prec-IP zu n-IP unter 10% (untere Kurve).

Dieser Versuch zeigt, dass steigende Salzkonzentrationen den Abbau des Precursors beschleunigen. Im Gegensatz zum Prec-IP zerfällt der Monoester des n-IP langsamer, d.h. unter den angewandten Bedingungen findet ein 40 %-iger Zerfall statt.

3.10.2. pH-Stabilität des Precursors

Es wurden jeweils 100 µl einer Prec-IP-Lösung auf pH 3, 5, 7 und 9 gebracht. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis wurden die Proben neutralisiert und die verbleibende Menge an Precursor ermittelt. Wie in der Abb. 3.10.2.1. zu ersehen ist, ist der Precursor säure- und basenlabil und nur im neutralen Bereich stabil, wie der Vergleich mit der 0 min Kontroll-Inkubation ergab.

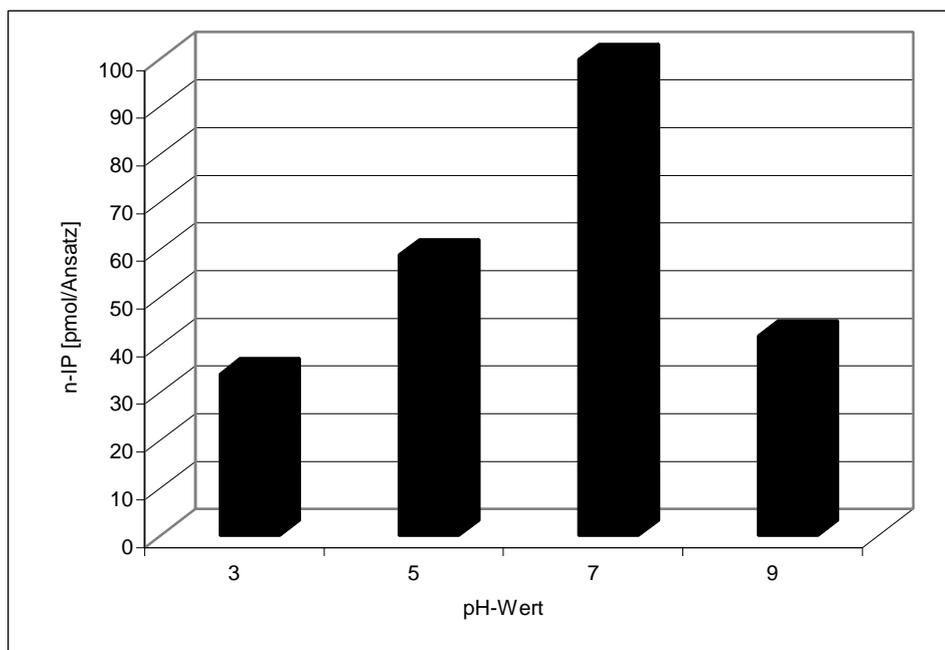


Abb. 3.10.2.1.: Stabilität des Precursors bei verschiedenen pH-Werten (n=3)

3.10.3. Zeitliche Stabilität von Precursor-Lösungen

Es wurde beobachtet, dass der Precursor beim Lagern zerfällt. Um dies genauer aufzuzeigen, wurde die Precursor-Menge nach Gelfiltration, Lyophilisieren und auch nach Lagerung bei -20°C ermittelt.

Abb. 3.10.3.1. zeigt, dass bereits durch Aufkonzentrieren der Precursor-Lösung durch Lyophilisieren ein Ausbeute-Verlust von 35 % zu messen ist.

Nach zusätzlicher einwöchiger Lagerung des Precursors bei -20°C ist mehr als die Hälfte des Precursors zersetzt und nach einem Monat ist kaum noch Precursor nachzuweisen.

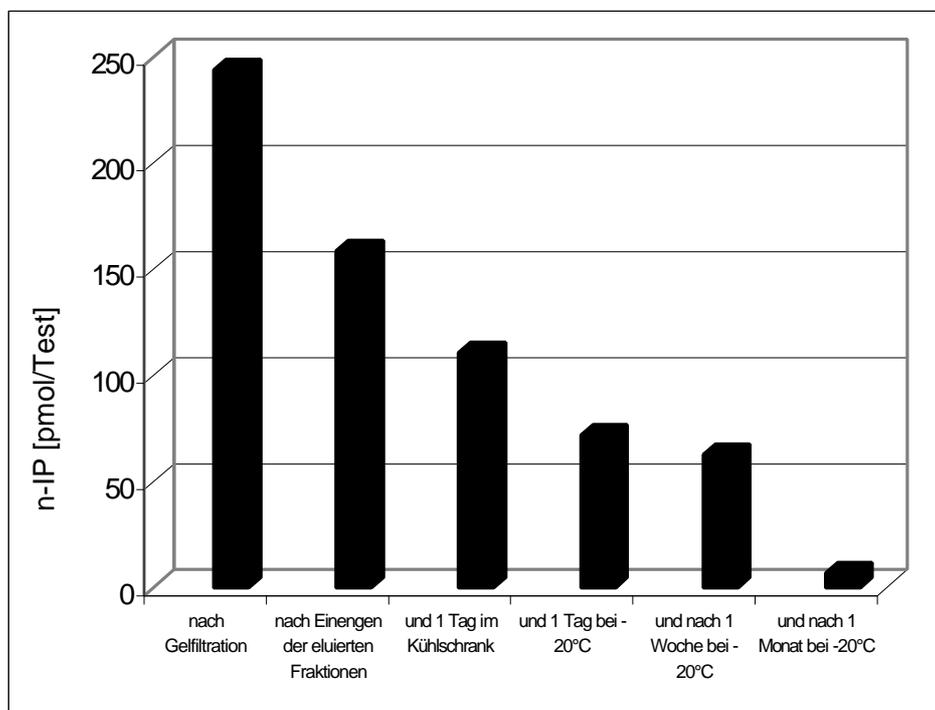


Abb. 3.10.3.1.: Labilität des Precursor in Abhängigkeit von der Lagerungszeit und den Behandlungsbedingungen

Um die Synthese von n-IP weiter zu charakterisieren, wurde Tritium-markiertes Inositol bzw. Tritium-markiertes GTP in die n-IP-Synthese eingesetzt und die Produkte sowie die Umsetzung zu cPIP untersucht.

3.11.1. Einbau von [³H]-Inositol

Zur Verfügung stehende glatte Gefäßmuskelzellen aus Ratten-Aorta wurden 3 Tage mit [³H]myo-Inositol markiert, in frischem Lithium-haltigen Medium 30 sec bzw. 1 min mit Angiotensin II stimuliert, abgeerntet, mit CHCl₃/CH₃OH denaturiert, wie im Methodenteil beschrieben und der Zellextrakt über Sephadex G15 gefiltriert. Die Elution der [³H]myo-Inositol markierten Substanzen ist in der Abb. 3.11.1.1. dargestellt. Man erhält zwei, radioaktiv-markierte Substanz-Peaks, einen kleineren, der die für uns relevanten Inositol-phosphate enthält, und einen größeren, der freiem Inositol zugeordnet werden kann.

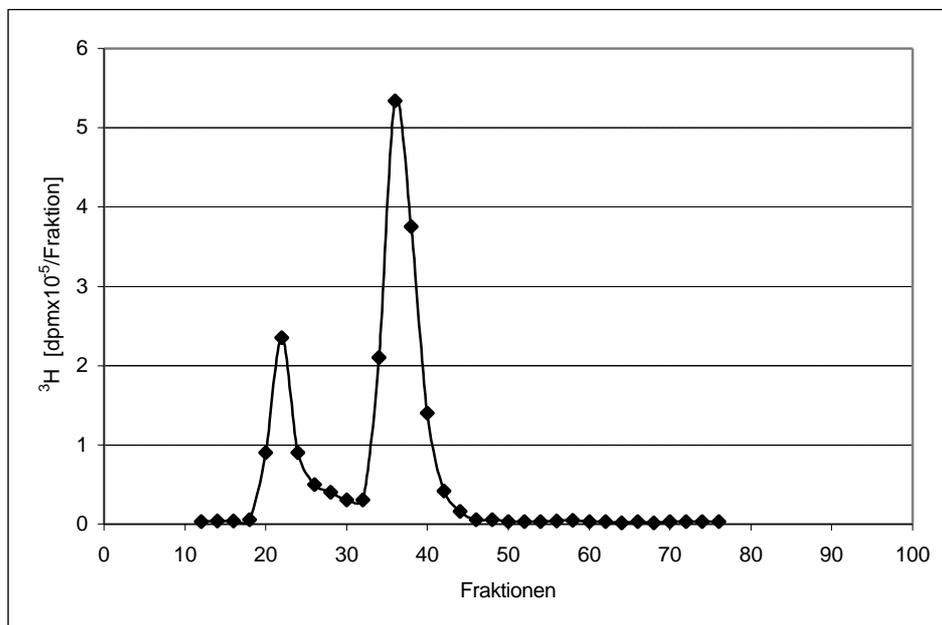


Abb. 3.11.1.1.: Gelfiltration des Extraktes von [³H]-Inositol markierten Zellen an Sephadex G15. Es wurde eine Säule von 0,15 l Volumen verwendet und 2 ml Fraktionen gesammelt. Die Elution erfolgte mit dest. Wasser. Das Ausschlussvolumen der Säule ist in Fraktion 20 und das Säulenvolumen in Fraktion 75 erreicht.

Die Fraktionen 20-30 wurden vereinigt, auf ein kleineres Volumen eingeeengt und dann der Gehalt an markiertem n-IP bestimmt durch Umsetzung zu cPIP. Die Ausbeute betrug 65 %. Dabei wurde wie folgt verfahren: Die Synthese von cPIP wurde durch Einbau von [³H]markiertem PGE in cPIP und anschließender Trennung von Substrat PGE und Produkt cPIP durch Chromatographie an Kieselgel gemessen,

wobei das PGE als unpolare Substanz mit der Lösungsmittel-Mischung Toluol/Essigsäureethylester/ Methanol (3:2:1) eluiert und cPIP als wesentlich polarere Verbindung erst mit Methanol. Im Falle des Einsatzes von Tritium-markiertem n-IP wurde unmarkiertes PGE in den Test eingesetzt, und bei der anschließenden Chromatographie zur Auftrennung von Substraten und Produkten eluiert das [³H]myo-Inositol-markierte cPIP wiederum mit Methanol und nicht umgesetztes Substrat n-IP sowie womöglich vorhandene Zerfallprodukte von n-IP erst mit Wasser.

Eine weitere Fraktionierung des [³H]myo-Inositol-markierten Precursors erfolgte durch Anionenaustauscherchromatographie. Wie in der Abb. 3.11.1.2. dargestellt ist, wurden drei verschiedene [³H]myo-Inositol-markierte Substanzen aufgetrennt.

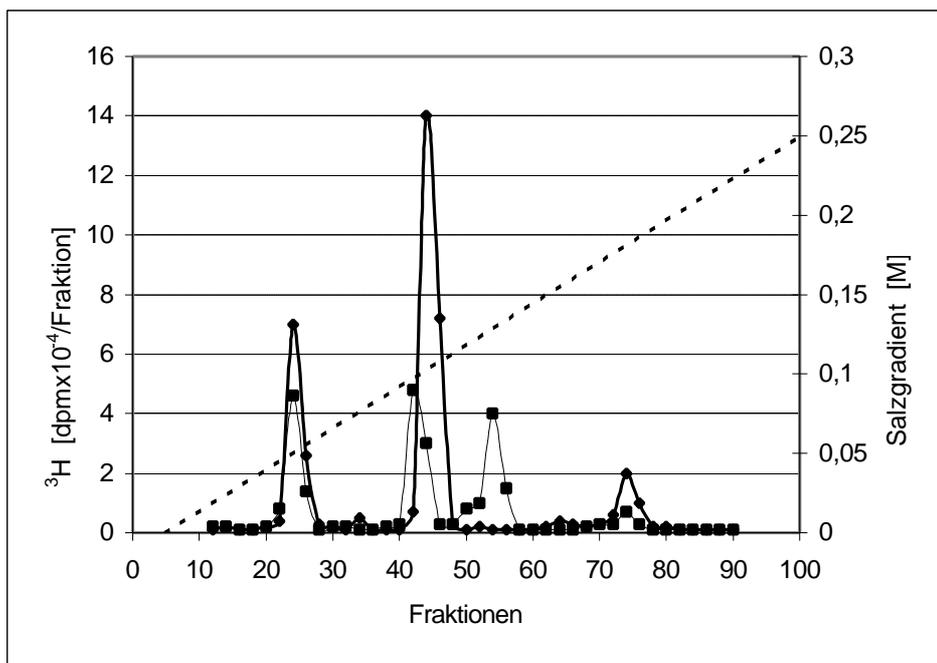


Abb. 3.11.1.2.: Auftrennung des Inositolphosphat-Gipfels der Gelfiltration

(Abb. 3.11.1.1.) durch Anionenaustauscherchromatographie und Einfluß von Angiotensin II auf die Synthese des Precursors.

Die Rauten-Kurve veranschaulicht das Elutionsprofil des mit [³H]myo-Inositol-markierten Zellen mit vorheriger hormoneller Stimulierung und die andere Kurve die ohne hormoneller Stimulierung. Es wurden die analogen Chromatographie-Bedingungen wie in der Abb. 3.4.1. beschrieben, verwendet.

Der erste Peak wurde nicht zugeordnet, er eluiert vor dem Inositolmonophosphat, das in den Fraktionen 32-36 eluiert. Der mittlere und größte Peak (Fraktion 43-47) eluiert später als IP₁ aber früher als IP₂, das in den Fraktionen 50-56 eluiert und der kleinere dritte Peak eluiert im Bereich von Inositoltriphosphaten. Für diese Zuordnung wurde die Q-Sepharose zuvor mit markierten Inositolphosphaten geeicht.

Als Kontrolle wurden diese mit [³H]myo-Inositol-markierten Gefäßmuskelzellen ohne hormonelle Stimulierung aufgearbeitet. Die mit Quadraten dargestellte Kurve der Abb. 3.11.1.2. veranschaulicht, dass dieselben Substanzpeaks erhalten wurden, jedoch mit dem Unterschied, dass vor allem der zweite Substanzpeak viel kleiner, (von der Fläche her nur ein Drittel so groß) ist wie im Falle des Versuches mit hormoneller Stimulierung. Dies zeigt an, dass die Synthese dieser Substanz durch Angiotensin II wenigstens 3-fach stimuliert wird.

Die aufgetrennten, radioaktiv-markierten Substanzen (Abb. 3.11.1.2.) wurden sofort durch Gelfiltration entsalzt, lyophilisiert und auf Gehalt an Precursor getestet. Wie der Tabelle 3.11.1.3. zu entnehmen ist, enthält nur der zweite Substanzgipfel Precursor. Für die Ausführung dieses Tests wurde an Stelle von radioaktiv markiertem PGE unmarkiertes PGE in den Test eingesetzt, um den Einbau des [³H]-markierten Precursors in cPIP zu messen (siehe Seite 49-50).

Probe	Umsatz [cpm]
Peak I Fr. (22-27)	-
Peak II Fr. (33-36)	4786
Peak III Fr. (41-47)	-

Tabelle 3.11.1.3.: Umsatz zu cPIP mit den verschiedenen Substanz-Peaks der Anionenaustauscherchromatographie

Die Werte sind noch mal in der Abb. 3.11.1.4. dargestellt; Peak II enthält den Precursor, der aufgrund der Elution zwischen IP₁ und IP₂ ein Inositolcyclobisphosphat sein sollte.

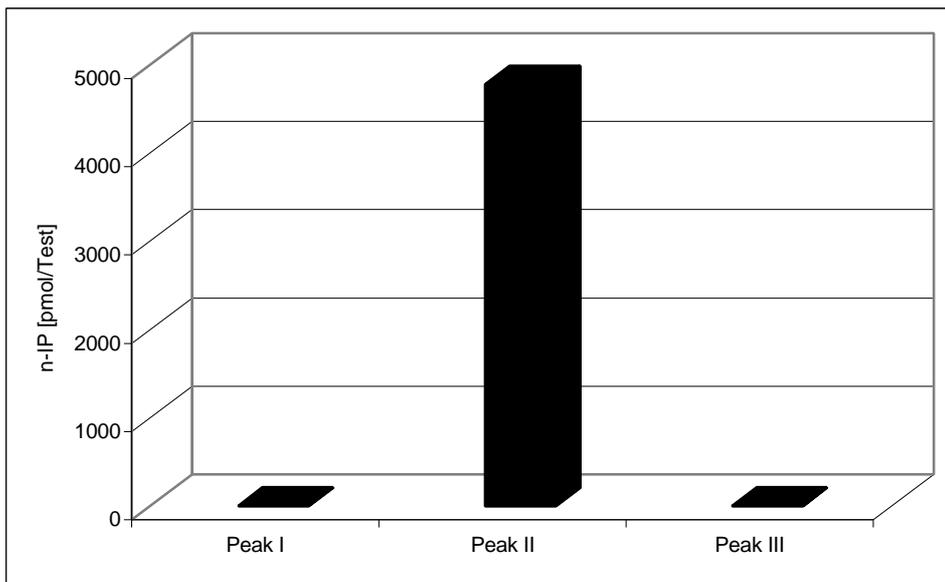


Abb. 3.11.1.4.: Erzielter Einbau des [³H]myo-Inositols bei Einsatz der Substanzen der Gipfel 1-3 der Abb. 3.11.1.2. an Stelle von n-IP in den cPIP-Test.

Um zu prüfen, ob sich die Tritium-markierten Verbindungen analog wie die unmarkierten Substanzen Precursor-IP und n-IP verhalten, wurde [³H]-Precursor-IP, das nicht an Aktivkohle adsorbiert zu [³H]-n-IP umgesetzt und die 1. Hälfte davon zu [³H]-cPIP umgesetzt, während die 2. Hälfte zuerst durch Aktivkohle filtriert wurde und die verbliebene Lösung dann in den cPIP-Test eingesetzt wurde. Wie in der Tabelle 3.11.1.5. und der Abbildung 3.11.1.6. gezeigt ist, adsorbiert auch das Tritium-markierte n-IP an Aktivkohle und so konnte bei der anschließenden Umsetzung zu cPIP keine Umsetzung gemessen werden.

Probe	Umsatz [cpm]
Keine Kohlebehandlung	1700
Kohlebehandlung	17

Tabelle 3.11.1.5.: cPIP-Umsatz vor und nach Adsorption des n-IP an Aktivkohle

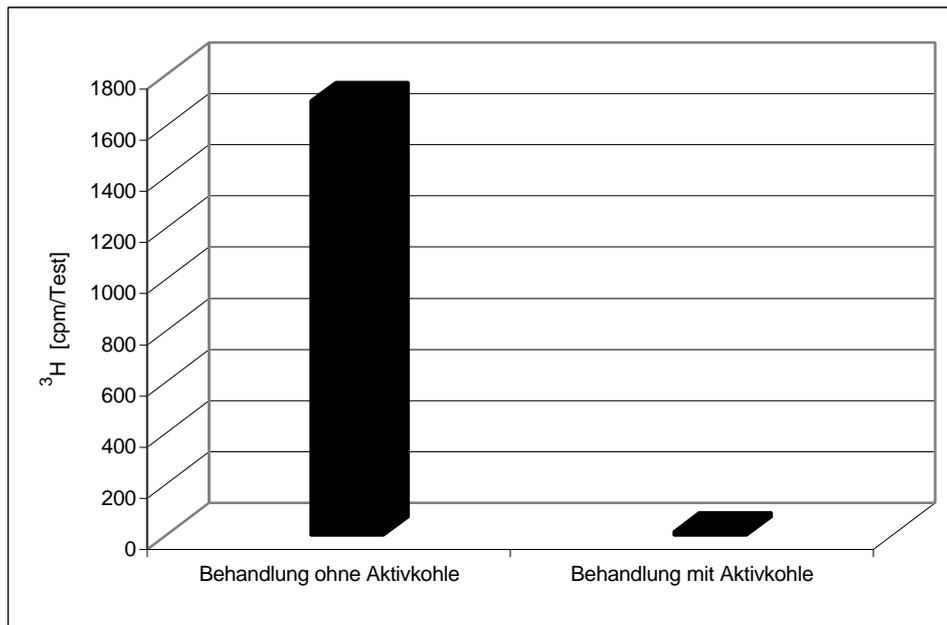


Abb. 3.11.1.6.: Umsetzung des $[^3\text{H}]$ -n-IP zu cPIP ohne und mit vorheriger Adsorption an Aktivkohle

3.11.2. Stabilität von $[^3\text{H}]$ myo-Inositol markiertem Precursor und n-IP

Die Ausbeuten an n-IP bei der Anionenaustauscherchromatographie liegen meist unter 20 %. Einsatz von Tritium-markiertem n-IP sollte Auskunft über entstandene, inaktive Zersetzungsprodukte erbringen. Deshalb wurde der $[^3\text{H}]$ -markierte Precursor zu $[^3\text{H}]$ -n-IP umgesetzt und dann zusammen mit $[^{14}\text{C}]$ -IP₁ als Marker durch Anionenaustauscherchromatographie aufgetrennt. Abb. 3.11.2.1. ist zu entnehmen, dass unter den angewandten Bedingungen aus dem $[^3\text{H}]$ -n-IP vor allem Inositolmonophosphat entstanden ist.

Wird der $[^3\text{H}]$ myo-Inositol markierte Precursor gelagert, wie im Abschnitt 3.10.3. beschrieben und nach 4 wöchiger Lagerung der Anionenaustauscherchromatographie unterzogen, so eluiert das aus Prec-IP entstandene Zerfallprodukt später als das Ausgangsprodukt (Prec-IP) als Inositolbisphosphat. Diese Chromatographie verdeutlicht, dass das Prec-IP durch Spaltung des 5-Ring-Phosphodiesters zu Inositolbisphosphat zerfällt.

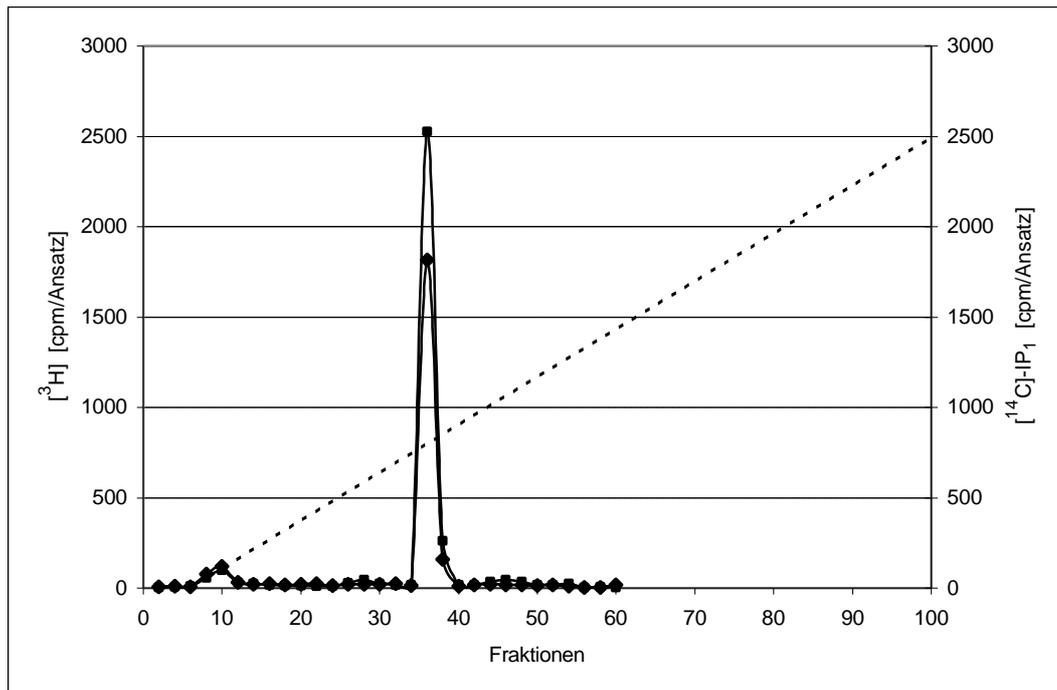


Abb. 3.11.2.1.: Anionenaustauscherchromatographie des markierten n-IP (höhere Kurve) und [¹⁴C] - IP₁ (niedrigere Kurve) als Marker (n=4). Es wurden die analogen Chromatographie-Bedingungen wie in der Abb. 3.4.1. beschrieben, verwendet.

3.11.3. Einbau von [³H]-GTP in n-IP

Um die Rolle des Nukleosidtriphosphates in der n-IP Synthese zu charakterisieren, wurden 2 n-IP Synthese-Ansätze unter Einsatz von [³H]-markiertem GTP ausgeführt, wobei der eine unmarkiertes Prec-IP und der zweite kein Prec-IP (als Kontrolle) enthielt. Nach der Umsetzung wurde unmarkiertes n-IP zugegeben um das erhaltene radioaktiv-markierte n-IP besser lokalisieren zu können. Die Abb. 3.11.3.1. zeigt das Elutionsprofil der radioaktiv-markierten Produkte (Rauten-Kurve) und des unmarkierten n-IP (linke Kurve), die beide in den Fraktionen 34-46 eluieren.

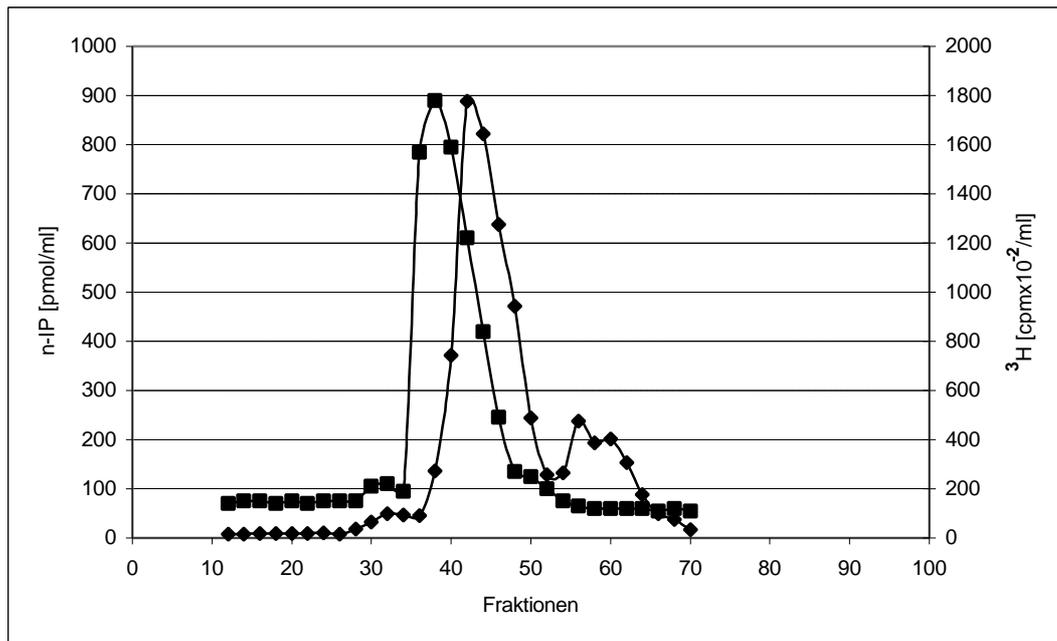


Abb. 3.11.3.1.: Gelfiltration der [³H]Guanosin-markierten Reaktionsprodukte (Rauten-Kurve) und des unmarkierten n-IP (linke Kurve) an Sephadex G15. Die Elution erfolgte mit dest. Wasser bei einer Flußrate von 2 ml/Fraktion an einer 0,15 l-Säule.

Aufgrund der ungenügenden Abtrennung des n-IP von verbliebenen [³H]-GTP wurden nur die Fraktionen 34-40 vereinigt, durch Lyophilisation eingengt und rechromatographiert. Das Elution-Profil der Rechromatographie von n-IP zeigt die Abb. 3.11.3.2.

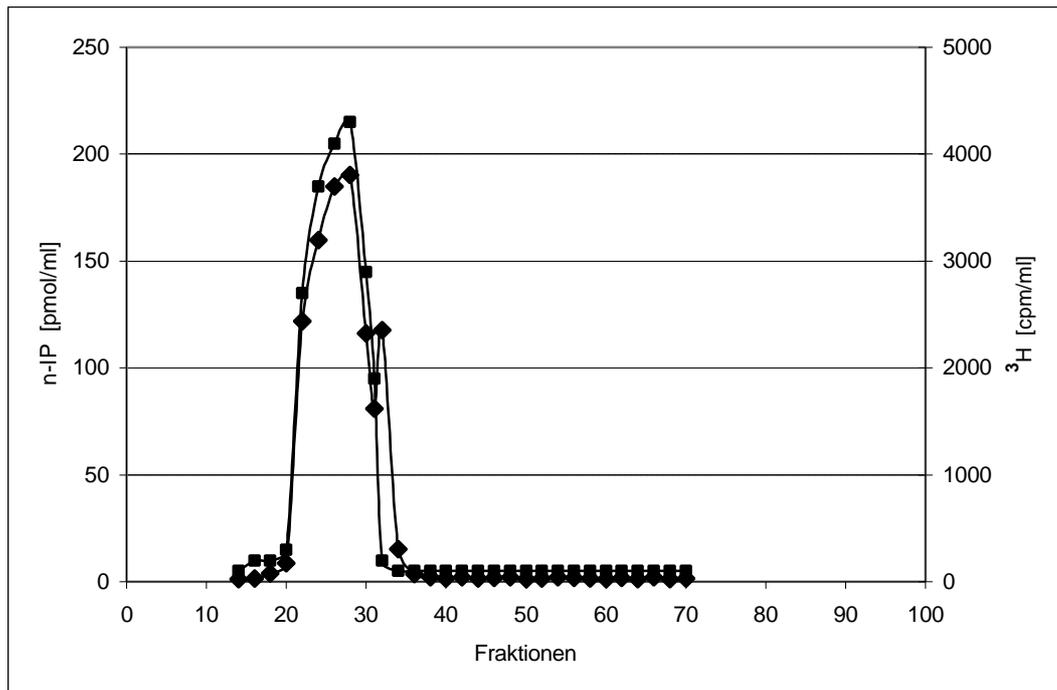


Abb. 3.11.3.2.: Rechromatographie der gepoolten Fraktionen (Rauten-Kurve) und des unmarkierten n-IP (höhere Kurve) an Sephadex G15. Die Elution erfolgte wie in der Abb. 3.11.3.1 beschrieben.

Wie der Abb. 3.11.3.1. zu entnehmen ist, eluiert das n-IP bei der ersten Gelchromatographie in den Fraktionen 35-40 und bei der Rechromatographie in den Fraktionen 22-30. (Gründe siehe Diskussion).

Abb. 3.11.3.2. zeigt, dass das markierte n-IP in den gleichen Fraktionen eluiert wie das unmarkierte. Die zur Kontrolle ausgeführte Umsetzung ohne Precursor zeigt, dass in diesem Fall kein [³H]-markiertes n-IP synthetisiert wurde. Wiederum wurde der Ansatz zusammen mit unmarkiertem n-IP gelchromatographiert. Das Chromatogramm ist in der Abb. 3.11.3.3. dargestellt.

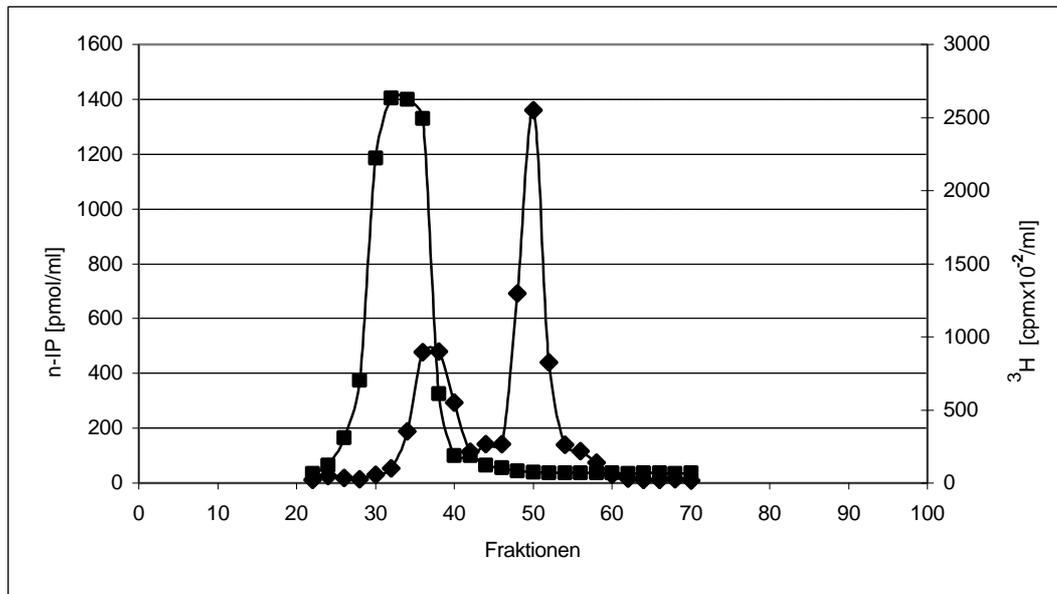


Abb.3.11.3.3.: Gelchromatographie der Umsetzung ohne Precursor (Rauten-Kurve) und des unmarkierten n-IP (Quadrat-Kurve) an Sephadex G15. Die Elution erfolgte wie in der Abb. 3.11.3.1 beschrieben.

Die n-IP-haltigen Fraktionen 24-38 wurden wiederum vereinigt, eingengt und rechromatographiert.

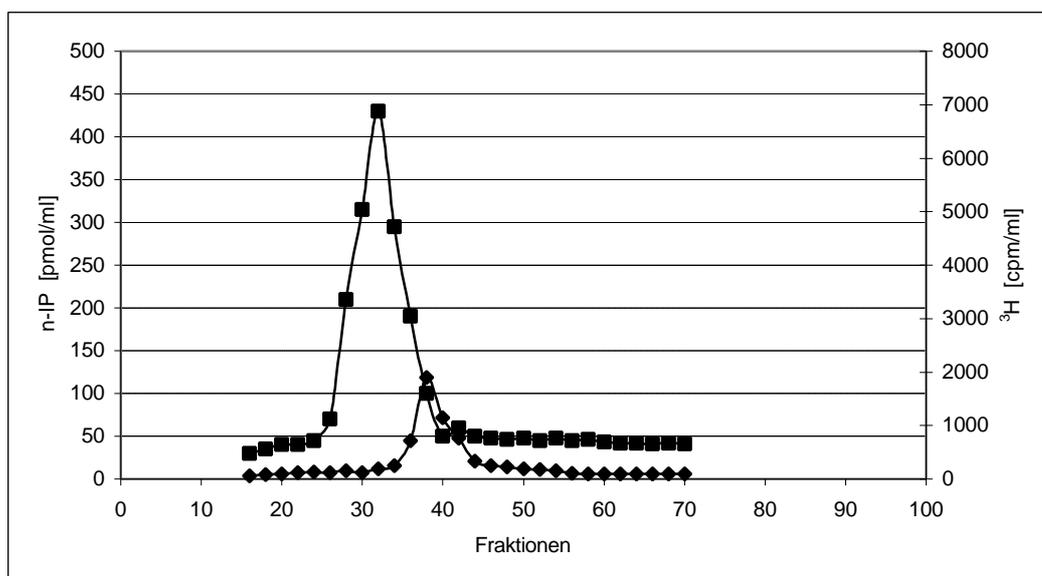


Abb. 3.11.3.4.: Rechromatographie der Kontrollinkubation ohne Precursor (Rauten-Kurve) und des unmarkierten n-IP (höhere Kurve) an Sephadex G15. Die Elution erfolgte wie in der Abb. 3.11.3.1 beschrieben.

Der Abb. 3.11.3.4. ist zu entnehmen, dass ohne Precursor das [^3H]-GTP nicht zu [^3H]-n-IP umgesetzt wurde. Die blaue Kurve zeigt das Elutionsprofil des unmarkiertem n-IP und die rote Kurve verbliebenes, nicht restlos abgetrenntes [^3H]-GTP, sowie daraus entstandene, nicht näher spezifizierte Hydrolyseprodukte. Wie zu erwarten war, findet man unter dem n-IP-Peak kein markiertes n-IP.

3.11.4. Umsetzung des [^3H]-markierten n-IP zu cPIP

Die Fraktionen 22-30 der Rechromatographie (Abb. 3.11.3.2.) wurden vereinigt und eingengt. Dieses [^3H]-n-IP wurde an Stelle von unmarkiertem n-IP zu cPIP umgesetzt, wobei dem Test nur unmarkiertes PGE zugesetzt wurde. Nach einer Inkubation von 30 min bei 30°C wurde ein Teil, wie für den cPIP-Test beschrieben, an Kieselgel chromatographiert zur Auftrennung von Substraten und Produkten, jedoch wurde noch eine zusätzliche Elution mit Wasser ausgeführt (Fraktion 6 der Abb. 3.11.4.2). Das Ergebnis der Chromatographie ist im Abb. 3.11.4.2 dargestellt. Die gesamte Radioaktivität eluiert erst mit Wasser in der Fraktion 6, während unter den angewandten Bedingungen cPIP in den Fraktionen 4 und 5 eluiert.

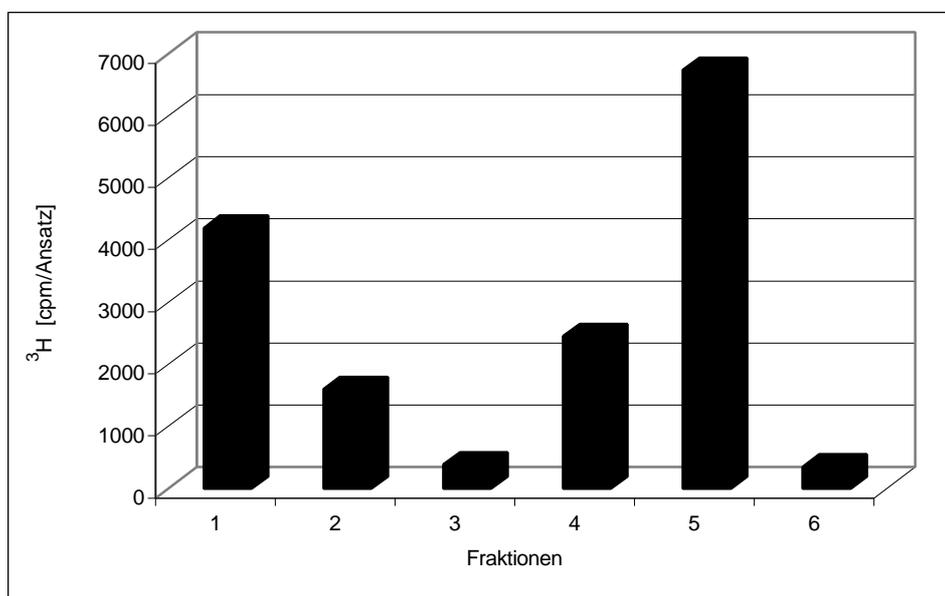


Abb. 3.11.4.1.: Auftrennung von [^3H]PGE (Fraktion 1+2) und daraus synthetisiertes cPIP (Fraktion 4+5) an Kieselgel (wie im Methodenteil beschrieben). Es wird mit Lösungsmittelgemischen steigender Polarität eluiert. PGE als unpolare Substanz eluiert zuerst, das viel polarere cPIP eluiert erst mit Methanol.

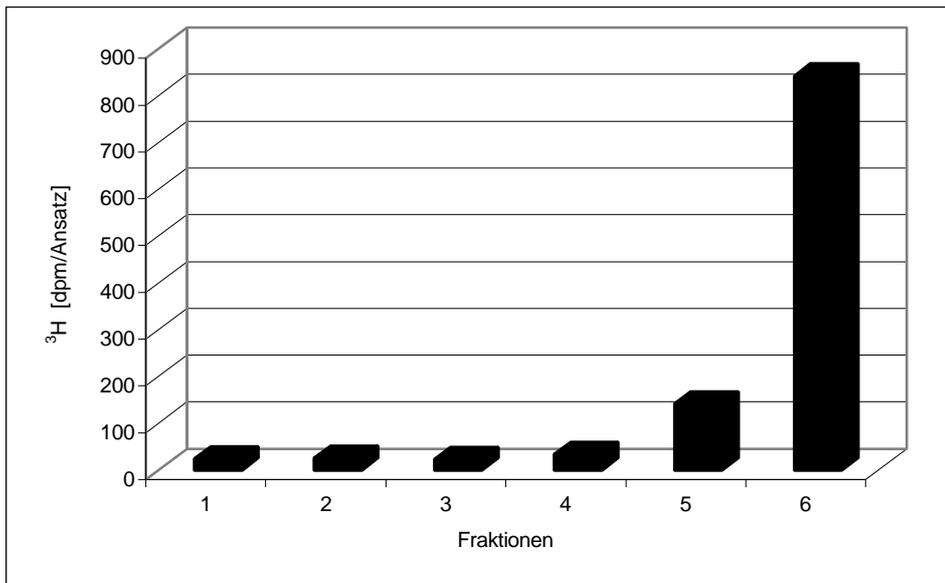


Abb. 3.11.4.2.: Auftrennung der Produkte der cPIP-Synthese bei Einsatz von [³H]-markiertem n-IP anstelle von [³H]-PGE an Kieselsäuregel.

Der Abb. 3.11.4.3. ist zu entnehmen, dass z.B. auch [¹⁴C]-GDP erst mit Wasser von der Kieselgel-Säule eluiert.

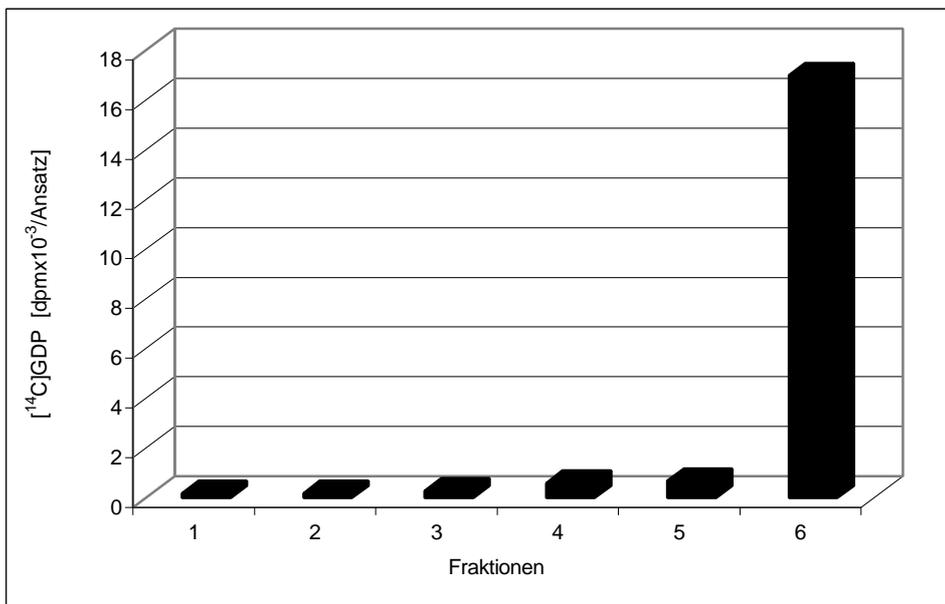


Abb. 3.11.4.3.: Chromatographie von [¹⁴C]-GDP an Kieselgel unter den Bedingungen der Auftrennung von PGE und cPIP (siehe Methodenteil).

Da die Kieselgelchromatographie nicht sehr aussagekräftig für die Charakterisierung des [^3H]Guanosin-haltigen Produktes (Fraktion 6 der Abb. 3.11.4.2.) ist, wurde der restliche Inkubationsansatz an Q-Sepharose chromatographisch aufgetrennt, wobei [^{14}C]-GDP als Marker mitchromatographiert wurde.

Wie der Abb. 3.11.4.4. zu entnehmen ist, ko-eluieren beide Substanzen. Die blaue Kurve zeigt die Elution des [^{14}C]-GDP und die rote die des [^3H]-GDP. Dieser Versuch veranschaulicht, dass im Zuge der Biosynthese von cPIP das GDP vom n-IP abgespalten worden sein muß, also im n-IP neben dem Inositol 1:2-cyclophosphat noch eine GDP-Komponente vorliegen muß, und das n-IP, wie vermutet wurde, ein Guanosindiphospho-4-inositol-1,2-cyclophosphat sein muß.

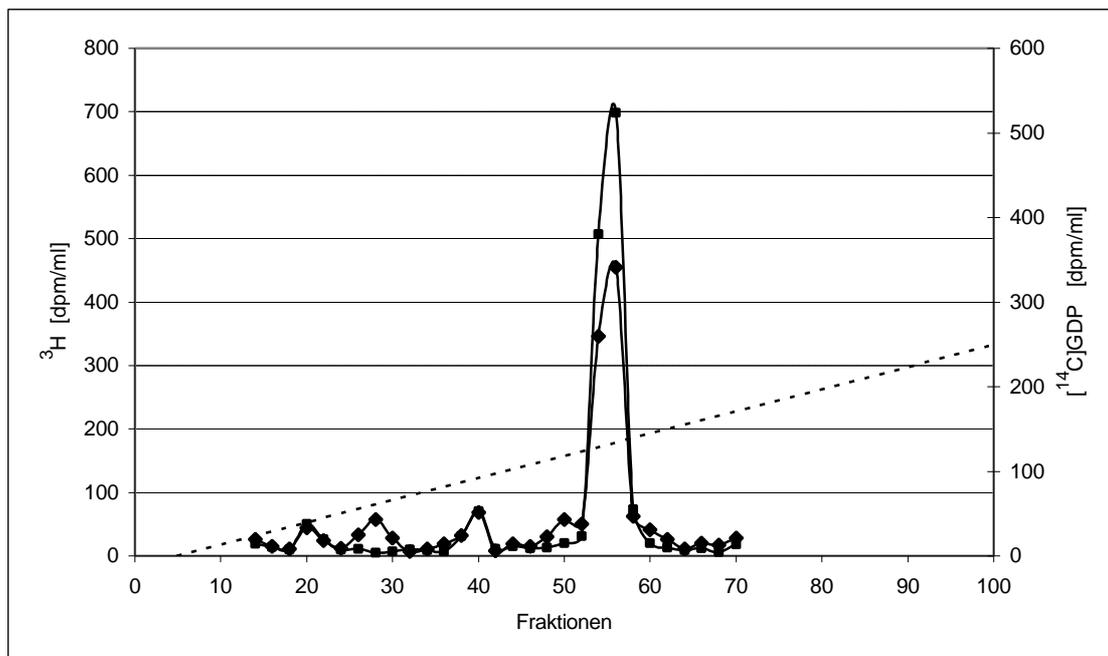


Abb. 3.11.3.4.: Chromatographie des [^3H]Guanosin-markierten Substanz der Fraktion 6 (Abb. 3.11.4.2.) (niedrigere Kurve) sowie Elution des [^{14}C]-GDP (höhere Kurve) an Q-Sepharose. Es wurden die analogen Chromatographie-Bedingungen wie in der Abb. 3.4.1. beschrieben, verwendet.

3.12. Chromatographie des [³H]myo-Inositol-markierten Prec-IP mittels HPLC

Peak II der Abb. 3.11.1.2., der das markierte Precursor-Inositolphosphat enthält, wurde in 0,1 M HCl hydrolysiert und anschließend lyophilisiert.

Abb. 3.12.1. zeigt schematisch die Reaktionsgleichung der Hydrolyse des cyclischen Phosphodiesters.

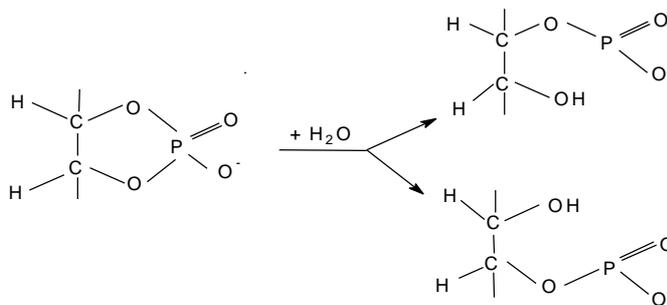


Abb. 3.12.1.: Hydrolyse von cyclischem Phosphatdiester (schematisch) (52).

Nach diesem Schema erhält man theoretisch 2 Isomere Inositolphosphate. Im Falle der Hydrolyse von cyclischem Inositol-1,2-phosphodiester ist bekannt, dass zu mehr als 80 % das Inositol-1-monophosphat gebildet wird.

Die hydrolysierte Probe wurde der im Kapitel 3.5. beschriebenen Hoch-Druck-Flüssigkeits-Chromatographie unterzogen. Den wesentlichen Teil des mittels Leitfähigkeitsdetektion erhaltenen Ionen-Chromatogramms zeigt Abb. 3.12.2.

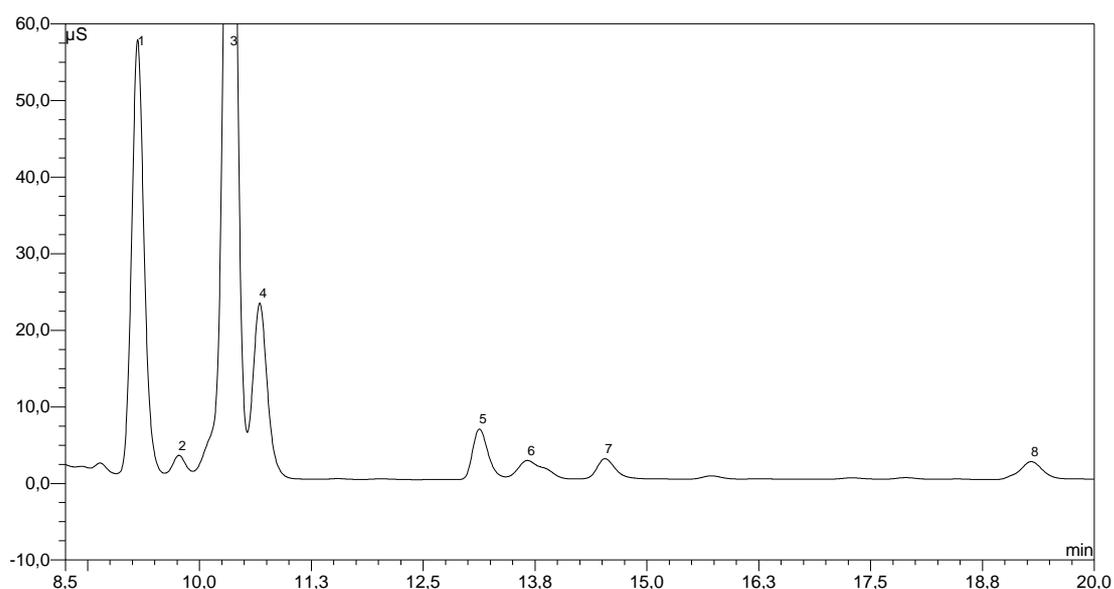


Abb. 3.12.2.: HPLC des mit [³H]myo-Inositol-markierten Prec-IP nach Hydrolyse in 0,1N HCl.

Im Bereich des ersten Peaks (1) eluieren Chloridionen und im Bereich des Peak 8 die für uns relevante Inositolbisphosphate. Die anderen Peaks wurden nicht zugeordnet.

Das Eluat wurde am Ausgang des Leitfähigkeitsdetektors mit einem angeschlossenen Fraktionssammler fraktioniert aufgefangen und der Radioaktivitätsgehalt der Fraktionen bestimmt. Die Elution Tritium-markierter Substanzen zeigt die Abb. 3.12.3. Der überwiegende Teil (84%) der aufgetragenen Radioaktivität eluiert zwischen 19-19,5 min. Die Eichung dieser Chromatographie mit verschiedenen bekannten Inositolbisphosphaten ist in Abb. 3.5.4. gezeigt. Daraus ist zu ersehen, dass der Tritium-markierte Precursor mit dem 1,4- Inositolbisphosphat ko-eluiert.

Standard 1,4-Inositolbisphosphat : Elutionszeit 19,35 min

Chromatographierte Probe : Elutionszeit 19-19,5 min

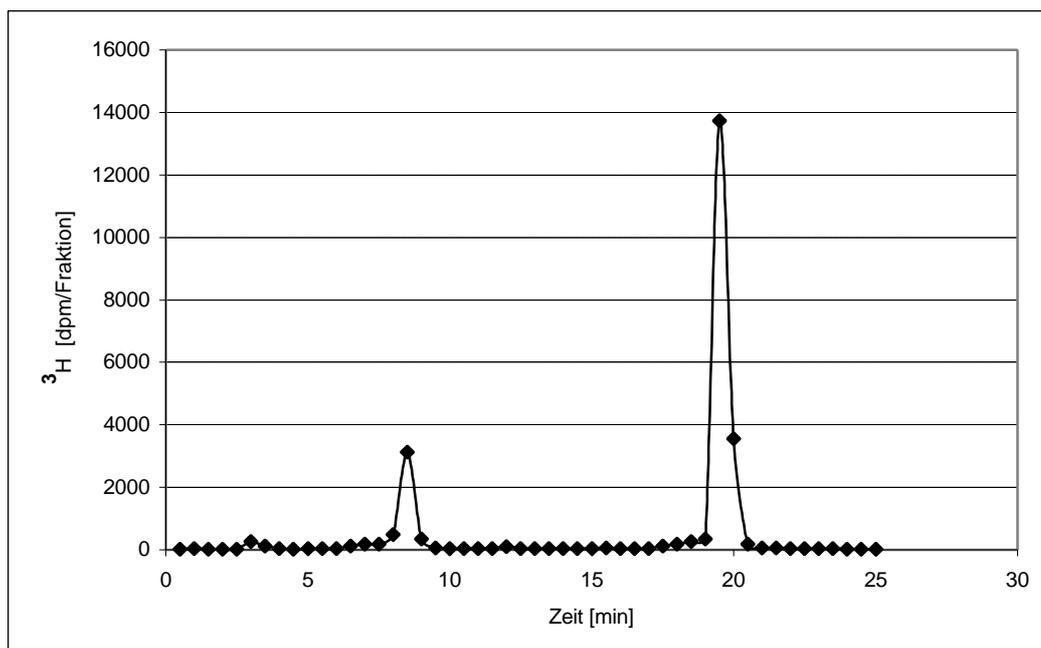


Abb. 3.12.3.: Radioaktivitätsgehalt der Fraktionen nach der HPLC

3.13. Synthese verschiedener cyclischer Inositolphosphate

Um die Aussage von Gypakis (22) und die bisher erhaltenen Befunde, die dafür sprechen, dass der Precursor ein Inositol-1,2-cyclo-4-bisphosphat ist, weiter zu untermauern, wurden die unten aufgeführten Inositolbisphosphate mit dem wasserlöslichen Carbodiimid (N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid methyl-p-toluen-sulfonat) in cyclische Diester überführt (66).

myo-Inositol-1,4-bisphosphat
 myo-Inositol-4,5-bisphosphat
 myo-Inositol-5,6-bisphosphat.

Die Reaktionsgleichung dieser Cyclisierung ist in der Abb. 3.13.1. dargestellt.

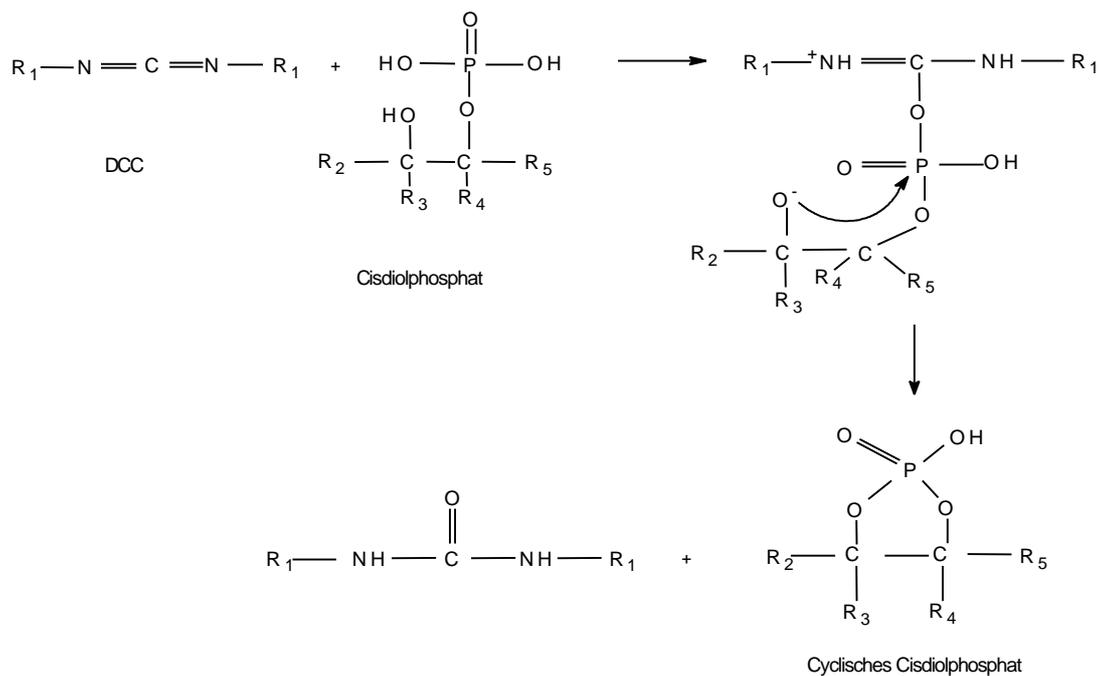


Abb. 3.13.1.: Cyclisierung von Inositolphosphat mit Carbodiimid (schematisch) (52)

Die drei isomeren Inositolbisphosphate und deren chromatographisch nicht aufgetrennte Cyclisierungsprodukte wurden an Stelle des Precursors in den Ansatz zur Synthese von n-IP eingesetzt.

Wie Abb. 3.13.2. veranschaulicht, ist nur das Zyklisierungsprodukt des Inositol 1,4-bisphosphates zu n-IP umgesetzt worden.

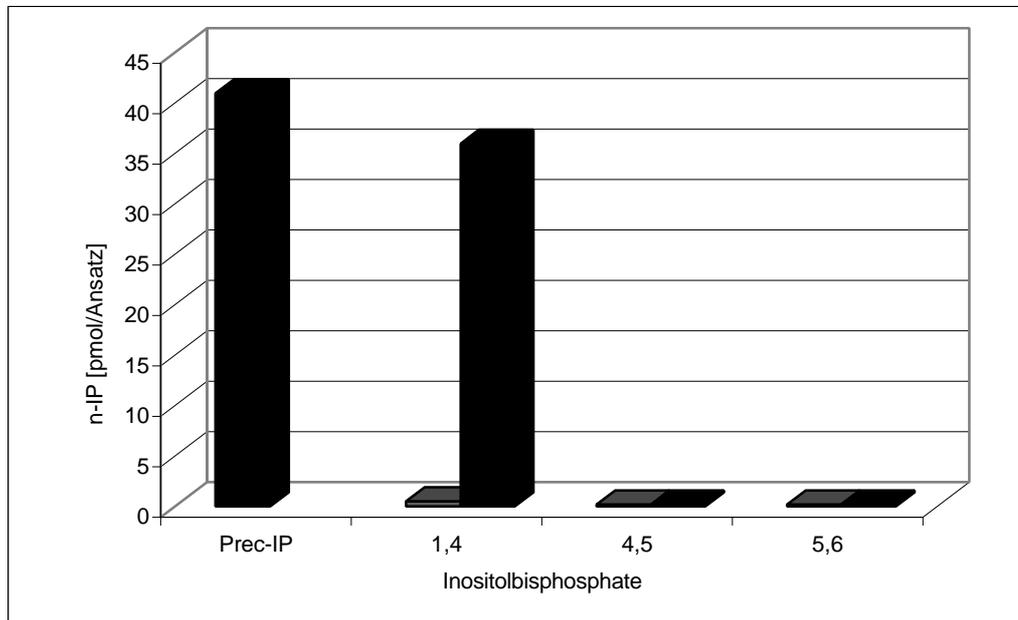


Abb. 3.13.2.: Aktivität des Precursors sowie der synthetisierten Inositolbis-Phosphate nach dem Einsetzen in den n-IP-Synthese-Test

3.14. Biosynthese von n-IP in *Chironomus tentans* Insektenzellen

Es war gezeigt worden, dass die *Chironomus tentans* Insektenzellen, die im Insulinhaltigen Medium wachsen, eine beachtlich aktive cPIP-Synthase aufweisen (51). Jedoch irritierte es, dass die cPIP-Synthase dieser Zellen vor allem cytosolisch vorliegt und so eine schnelle Abtrennung vom Syntheseenzym und reichlich vorhandenen Substraten sich schwierig gestaltet. Uns interessierte zu ermitteln, ob das n-IP in diesen Zellen identisch zu der der Rattenleber ist.

Ein n-IP-Rohextrakt der Insektenzellen wurde folgendermaßen hergestellt:

Insektenzellenhomogenat wurde mit Chloroform/Methanol (2:1) denaturiert und die nach dem Zentrifugieren erhaltene wässrige Lösung wurde nach dem Entfernen restlicher Lösungsmittelmengen als n-IP-haltiger Rohextrakt verwendet. Setzt man diesen Extrakt anstelle von Ratten n-IP einem Test auf cPIP-Synthese zu, so wird keine cPIP-Synthese gemessen, im Gegensatz zu einer Kontrollinkubation mit n-IP aus Rattenleber.

In einer weiteren Kontrollinkubation, der sowohl aus Insektenzellen wie aus Rattenleber isoliertes n-IP zugesetzt war, konnte keinerlei Effekt des aus der Insektenzellen isolierten n-IP auf die cPIP-Synthese beobachtet werden (Abb. 3.14.1.).

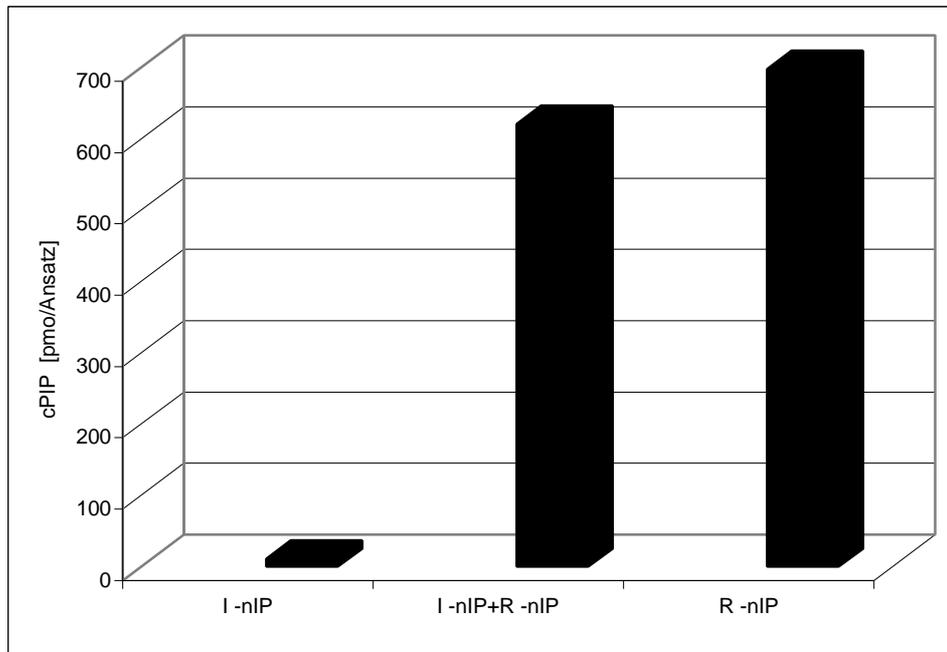


Abb. 3.14.1.: cPIP-Aktivität des Insekten-Precursor mit und ohne Ratten-n-IP

Es gibt zwei Erläuterungen: entweder ist das n-IP aus der Insektenzellen von dem aus Rattenleber isolierten strukturell verschieden, oder der Extrakt aus Insektenzellen enthält kein n-IP.

In einem zweiten Versuch wurde das Insektenzellenhomogenat folgendermaßen fraktioniert: Nach Zentrifugation wurde ein 1 Überstand und ein 1 Sediment erhalten. Dieses 1 Sediment, von dem ein Aliquot asserviert wurde, wurde mit Homogenisationspuffer auf das Ausgangsvolumen verdünnt und erneut abzentrifugiert, der erhaltene 2 Überstand wurde abpipetiert und das 2 Sediment in gleichem Puffer volumen aufgenommen. In allen erhaltenen Fraktionen wurde die Aktivität der cPIP Synthese bestimmt.

Die Abb. 3.14.2. zeigt folgendes:

- Sediment 1 und 2 zeigen sehr geringe Aktivität, wobei im Sediment 2 50 % der Aktivität des 1 Sedimentes gemessen wurde.
- Die cPIP Synthase-Aktivität des 1 Überstandes ist knapp 20-fach höher, wobei nur ATP und PGE zugegeben werden musste und kein n-IP. Im 1 Überstand kann eine beachtlich hohe cPIP Synthase gemessen werden im Gegensatz zum Cytosol der Rattenleber, in der keine Aktivität nachweisbar ist (persönliche Mitteilung von Wasner,H.)
- Auch in dem 2 Überstand, dem Waschwasser des 1 Sedimentes, kann eine überraschend hohe cPIP Synthase-Aktivität (dreimal so hoch als im 1 Sediment) gemessen werden.

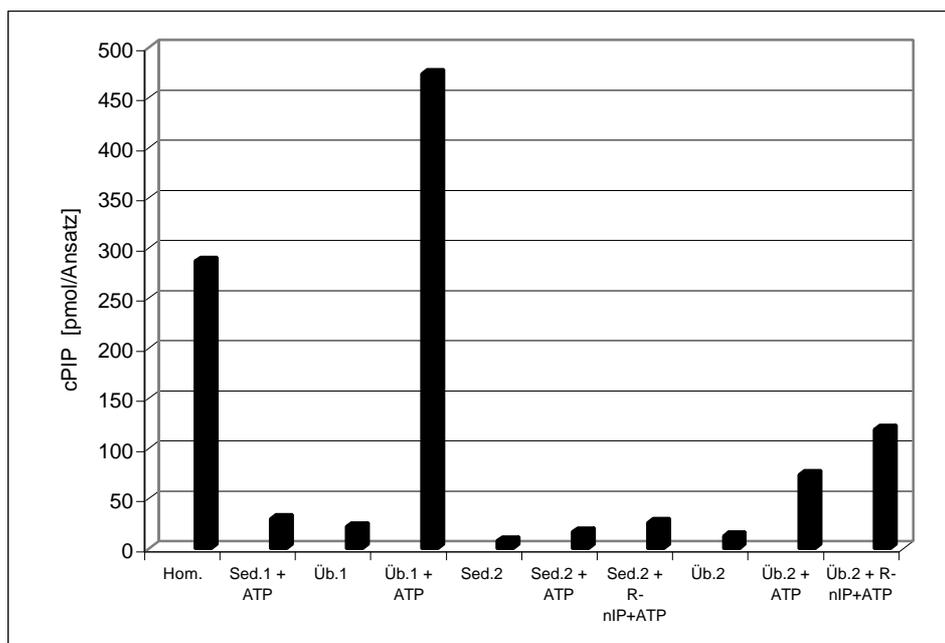


Abb. 3.14.2.: cPIP-Aktivität im Insekten-Sediment bzw. – Überstand getestet mit und ohne ATP

Irritierend ist, dass diese hohe cPIP Synthase ganz ohne Zusatz von externem n-IP abläuft. Man muß annehmen, dass in diesem Cytosol bereits hinreichende Mengen an n-IP vorliegen. Ein gewaschenes 2 Sediment sowie ein 2 Überstand wurde gewonnen aufgrund der Annahme, dass sowohl ein 2 Sediment wie auch ein 2 Überstand allenfalls nur geringe Mengen an n-IP enthalten sollte.

Tatsächlich zeigen beide Fraktionen in Gegenwart von ATP ohne n-IP ein Umsatzplus, so dass sich die Frage nach einer Neusynthese von n-IP stellt. Mit beiden Fraktionen konnte mit zugegebenem n-IP von der Ratte eine Steigerung der cPIP Synthese gezeigt werden. Dies zeigt, dass die cPIP Synthase der Insektenzellen das n-IP der Ratte als Substrat erkennt.

In einem Wiederholungsversuch wurde als Enzym die gewaschene Partikelfraktion eingesetzt, zweitens wurde, um eventuelle Neusynthese von n-IP zu unterbinden, Neomycin zur Hemmung der PLC zugesetzt. Des weiteren wurde n-IP, das von den Insektenzellen gewonnen wurde, vor und nach Kohlebehandlung zur Adsorption des n-IP eingesetzt, sowie auch n-IP aus Ratte.

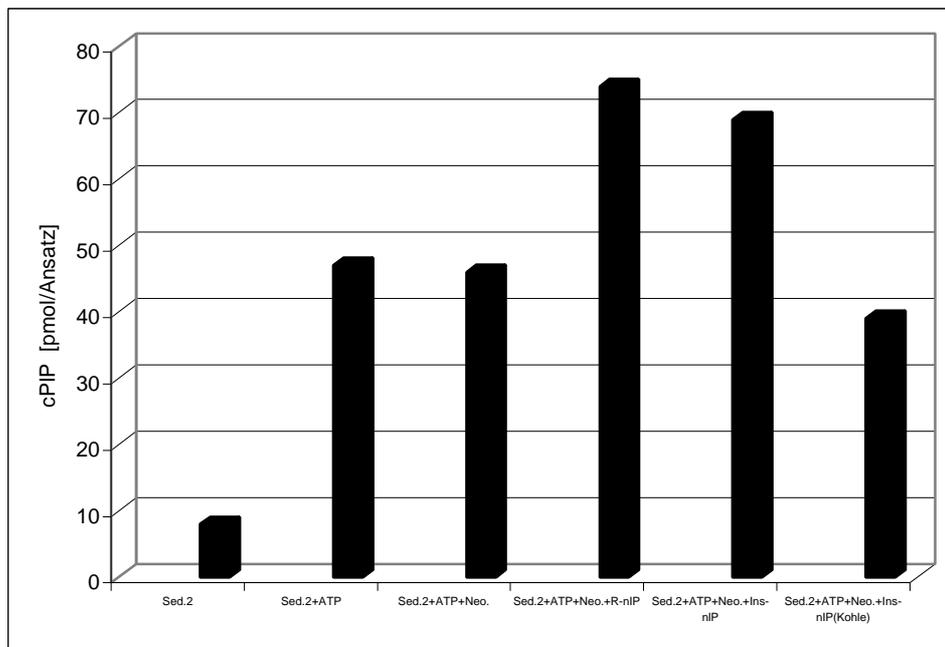


Abb. 3.14.3: cPIP-Synthase-Aktivität im Insekten-Sediment mit und ohne Neomycinsulfat mit n-IP, vor und nach Aktivkohle Behandlung.

Wie aus der Abb. 3.14.3. zu ersehen ist, konnte durch Neomycin-Zusatz die cPIP Synthese in Gegenwart von ATP aber Abwesenheit von n-IP nicht unterbunden werden. Zweitens konnte durch n-IP Zusatz die Synthese von cPIP gesteigert werden, wobei dies mit n-IP aus Rattenleber bzw. aus Insektenzellen gelang. Drittens, analog zum n-IP aus Rattenleber, adsorbiert auch das aus den Insekten gewonnene n-IP an Aktivkohle.

Da mit der anfänglichen n-IP Extraktion aus den Insektenzellen mit cPIP Synthase aus Leber und dann auch aus Insekten keine cPIP-Synthase bewerkstelligt werden konnte, ist anzunehmen, dass die n-IP-Extrakte der ersten Versuche schon vor dem Testen zerfallen waren.

Der Umstand, dass die cPIP Synthase in den Insektenzellen ein cytosolisches Enzym ist, gestaltete es schwierig nachzuweisen, dass auch das Insektenenzym PGE und n-IP für die cPIP Synthase benötigt. Auch wenn es derzeit offen bleiben muß, ob vorhandenes restliches n-IP des Waschvorganges mitgeschleift wurde oder durch Neusynthese entstanden ist, die cPIP Synthase der Insektenzellen synthetisiert cPIP mit n-IP, das aus Ratte bzw. Insekten gewonnen wurde, gleichermaßen.

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass auch das aus Insektenzellen isolierte n-IP an Aktivkohle bindet. Auch wenn noch viele detaillierte Versuche fehlen um die völlige Analogie der cPIP Synthase in der Rattenleber mit der in der Insektenzelllinie aufzuzeigen, so erläutern die wenigen Versuche doch die Aussage, dass die cPIP Synthase relativ analog auch in den Insektenzellen abläuft.

4. DISKUSSION

4.1. Biosynthese von cPIP

Für die Biosynthese des cAMP Antagonisten, Prostaglandylinositolcyclophosphat (cPIP), werden Prostaglandin E (PGE) und neues bzw. aktiviertes Inositolphosphat benötigt. Das benötigte ATP, das, wie anfangs geglaubt wurde, als Energielieferant für die Synthese der Ätherbindung benötigt würde, wird wohl ausschließlich für die Aktivierung des Synthesenzym, cPIP-Synthase benötigt, wie kürzlich gezeigt wurde (86). Es wird davon ausgegangen, dass die Bereitstellung der für die cPIP Synthese benötigten Substrate mit dem durch die Phospholipasen A bzw. C bewirkten Abbau der Phospholipide vor allem des Phosphatidylinositols zusammenhängt. Aktivierung beider Phospholipasen durch Noradrenalin über dessen α -Rezeptoren ist gezeigt (72), während analoge, durch Insulin aktivierte Reaktionen weit weniger definiert sind (85). Insgesamt lässt sich die Biosynthese von cPIP mit den 5 Gleichungen der Abbildung 4.1.1. formulieren.

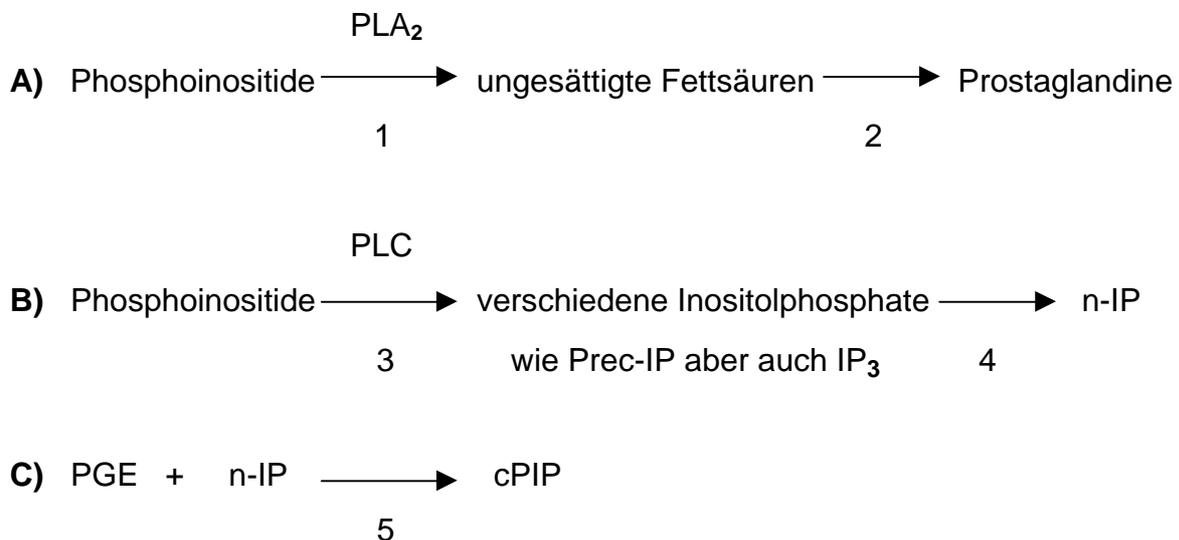


Abb. 4.1.1.: Biosynthese von cPIP und dessen Substrate, PGE und n-IP.

Inhalt dieser Arbeit war es, die Reaktion von Prec-IP zu n-IP zu charakterisieren. Aufgrund der erzielten Befunde können die Reaktionsgleichungen 4 und 5 detaillierter formuliert werden, wie in der Abbildung 4.1.2. dargestellt ist.

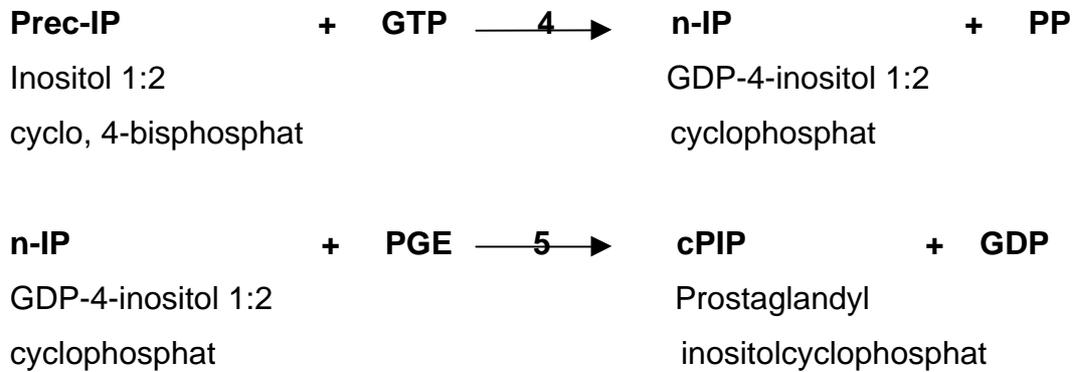


Abb. 4.1.2.: Detaillierte Darstellung der Reaktionsgleichungen der Synthese von n-IP und cPIP

4.2. Anreicherung von Prec-IP

Gypakis (22) hatte, trotz unzureichender Auftrennung von Prec-IP und n-IP, gezeigt, dass für die Synthese von n-IP das Precursor genannte Inositolphosphat (IP), welches im Bereich der Inositolbisphosphate chromatographiert, sowie ein Nucleosidtriphosphat benötigt werden. Eine weitere Erkenntnis war, dass die n-IP Synthese sehr selektiv nur Inositolphosphate mit einer Phosphodiester-Struktur als Substrat erkennt. Die n-IP Synthese konnte er als partikuläres Enzym ausmachen, das bei Anwendung der fraktionierten Zentrifugation vor allem im 3600 g Sediment nachgewiesen werden konnte, in dem vor allem Mitochondrien angereichert sind.

Im Zuge der Nacharbeitung und Bestätigung dieser Resultate gelang es, die Ausbeute und Reinheit an Prec-IP im Zuge der Isolierung aus Rattenleber wesentlich zu verbessern. So selektiv die n-IP-Synthase bezüglich des Prec-IP's ist, so unselektiv scheint sie bezüglich der Nucleosidtriphosphate zu sein. Da bei Einsatz gleicher Nucleosid-Konzentrationen GTP den besten Umsatz erbrachte, wurde dem Test in der Regel GTP zugesetzt.

Geht man aber davon aus, dass die innerzelluläre ATP-Konzentration um einiges höher ist als die des GTP, dann ist anzunehmen, dass das aus z.B. Rattenleber isolierte n-IP statt des GDP Molekülteiles auch ein ADP haben könnte.

Die gemessenen enzymkinetischen Parameter, Zeit- und Enzymabhängigkeit sowie Substratabhängigkeit von sowohl GTP als auch Prec-IP zeigen, dass in den Umsetzungen in der Regel bei Substratsättigung des Enzyms gearbeitet wurde, mit der Ausnahme des Prec-IP, das meistens bei den Umsetzungen der limitierende Faktor war (siehe weiter unten). Das Ziel, alles eingesetzte Prec-IP quantitativ zu n-IP umzusetzen, das dann quantitativ als cPIP gemessen werden kann, wurde nicht erreicht, vor allem wegen der nicht linearen Zeitabhängigkeit, die aufzeigt, dass neben der Synthese von n-IP vermutlich Abbau nicht nur des n-IP sondern auch der Substrate stattfindet. Solange es nicht gelingt, die Zeitabhängigkeit der n-IP Synthese zu optimieren, ist es nicht möglich das vorgelegte Prec-IP quantitativ zu bestimmen, d.h. bei den derzeitigen Meßwerten ist davon auszugehen, dass die tatsächlich vorhandene Menge an Prec-IP größer als die gemessene ist.

4.3. Zur Labilität des Prec-IP bzw. n-IP

Das schwierigste Problem dieser Arbeit ist die Instabilität nicht nur des Prec-IP sondern auch des n-IP, die in beiden Fällen vor allem mit der Labilität des 5-Ring-Phosphodiesters in Zusammenhang steht. Es ist nur gelungen diese Labilität zu beschreiben in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung, der Ionenstärke bzw. Salzkonzentration der Lösung und der Lagerzeit. Bemerkenswert war, dass Prec-IP-Lösungen am besten im neutralen pH-Bereich bei maximal niedriger Salzkonzentration gelagert werden müssen.

Je nach Auftragsmenge eluiert das Prec-IP bei der Gelfiltration früher oder später von der Säule. Die frühere Elution kann einerseits dadurch erklärt werden, dass die Chromatographie, wegen der hohen Labilität, mit Wasser erfolgte, und andererseits wurden sowohl bei der Rechromatographie als auch bei den markierten Proben geringere Mengen auf die Säule aufgetragen. Das Auftragen kleinerer Mengen führt zu einer früheren Elution.

Dieser Befund wurde schon von Mirmohammadsadegh (47) beschrieben. Er konnte zeigen, dass durch Auftragen steigender Mengen an Substanz auf die Säule die Elution mehr und mehr nach zu größeren Fraktionszahlen, also zu späterer Elution verschoben wird.

Konzentration [μM]	ATP	ADP	AMP	cAMP
1. 80	33	37	43	51
2. 40	30	33	37	41
3. 20	31	32	36	38
4. 10	29	30	33	35
Differenz von 1. und 4.	4	7	10	16

Tabelle 4.3.1.: Elution einer (1:1:1:1) Nukleotidmischung bei pH 7. Die Zahlen geben die Fraktionsnummern der Substanz-Maxima an (47).

Bei der mit dem Prec-IP ausgeführten Anionenaustauscherchromatographie konnte gezeigt werden, dass Prec-IP später als IP_1 aber früher als IP_2 eluiert. Die Ausbeuteverluste, die wahrscheinlich mit der Instabilität des Prec-IP in Lösungen mit hoher Salzkonzentration zusammenhängen, machen das Ziel, das Prec-IP vollends zu reinigen derzeit nicht erreichbar. Immerhin haben die HPLC-Läufe, mit denen versucht wurde, den Reinheitsgrad der Prec-IP Lösungen zu charakterisieren, bereits eine gute Anreicherung erzielt.

4.4. [^3H]myo-Inositol-Einbau

Durch den Einsatz von mit [^3H]myo-Inositol markierten Zellen konnte [^3H]myo-Inositol markierter Precursor isoliert werden, was durch Einbau von [^3H]myo-Inositol in cPIP nachgewiesen wurde. Es überraschte, dass von der Gesamtmenge an isolierten und mit [^3H]myo-Inositol markierten Inositolphosphaten, der prozentuelle Anteil an Prec-IP zwischen 60-70 % lag. Es wäre für weiterführende Versuche interessant zu messen, ob die Ausbeute an Prec-IP auch in anderen Zellkulturen vergleichbar hohe Werte erbringt.

Dennoch kann man die hohe Ausbeute als Indiz dafür werten, dass es sich bei der Synthese von Prec-IP und n-IP als Substrate für die cPIP Synthese um keinen unbedeutenden Stoffwechselfad handeln kann, sondern jedenfalls aus dem Blickwinkel dieses markierten Prec-IP um einen durchaus zentralen.

Mit diesem [^3H]myo-Inositol markierten Prec-IP konnte gezeigt werden, dass der Precursor beim Lagern zu IP_2 zerfällt, und durch selektivere HPLC konnte das Hydrolyseprodukt des Precursors mit hoher Wahrscheinlichkeit als Inositol 1,4-bisphosphat identifiziert werden. Außerdem konnte mit dem [^3H]myo-Inositol-markierten Precursor [^3H]myo-Inositol markiertes n-IP synthetisiert werden. Bei anschließender Anionenaustauscherchromatographie konnte gezeigt werden, dass das n-IP vor allem zu IP_1 zerfällt, wie die Cochromatographie mit [^{14}C]myo-Inositol 1-phosphat erbrachte. Da es diejenige Bindung ist, die im Zuge der cPIP-Synthese gespalten wird, mag es plausibel erscheinen, dass die Esterbindung, welche GDP und IP_1 zu n-IP verbindet, labil ist. Generell ist jedoch eine Inositolphosphat-Esterbindung als stabil anzusehen. Die Frage, in wie weit diese Esterbindung im Falle des an das Inositol gebundenen GDPs labiler wird, kann derzeit nicht schlüssig erklärt werden.

4.5. [^3H]-GTP-Einbau

Durch Einsatz von [^3H]-Guanosintriphosphat in die Umsetzung des Prec-IP zu n-IP konnte gezeigt werden, dass der [^3H]-Guanosin-Teil des GTP mit n-IP co-chromatographiert. Dieser Schluß wird dadurch unterstützt, dass in einer Kontrollumsetzung ohne Prec-IP keine [^3H]-Guanosin-Markierung mit dem vor der Chromatographie zugesetztem, unmarkiertem n-IP co-chromatographiert. Bei Umsatz dieses mit [^3H]-Guanosin markierten n-IP zu cPIP, wird das [^3H]-Guanosin nicht im cPIP wiedergefunden. Bei der Chromatographie an Kieselsäure zur Auftrennung von cPIP, eluiert die [^3H]-Guanosin markierte Substanz erst mit Wasser später als cPIP, das mit Methanol eluiert. Bei der sich anschließenden Anionenaustauscherchromatographie zeigt sich, dass die [^3H]-Guanosin markierte Substanz [^3H]-GDP ist.

Dieser Befund sagt aus, dass im Zuge der Synthese von cPIP aus PGE und n-IP das GDP freigesetzt worden sein muß. Folglich muß im n-IP das GDP vorgeformt gewesen sein, also muß das n-IP ein GDP-4-inositol-1,2-cyclophosphat sein. Der mögliche Einwand, dass das rechromatographierte n-IP zufällig auch GDP enthalten könnte, ist folgendermaßen zu entkräften: n-IP, mit einem aus dem Strukturvorschlag kalkulierten Molekulargewicht von 667, eluiert von einer Sephadex G15 Säule in der Regel gut abgetrennt früher als Nukleosidtriphosphate, also bei höherem Molekulargewicht als GTP, während das GDP (Molekulargewicht von 443) einige Fraktionen später als GTP eluiert, also bei kleinerem Molekulargewicht.

Das weitere Ziel, anhand der spezifischen Radioaktivität des in die Synthese von n-IP eingesetzten GTP und der Annahme, dass das synthetisierte n-IP die gleiche spezifische Radioaktivität hat, das erwartete Molverhältnis von 1:1 für PGE und n-IP bei der cPIP Synthese zu prüfen, wurde nicht erreicht. Der Grund lag wiederum in der Labilität von n-IP, die sich bei kleineren Substanzmengen dieses Versuches doppelt hinderlich erwies und zu der Lösung führte, nach der Umsetzung von [³H]GTP mit Prec-IP zu [³H]n-IP, kaltes n-IP zuzusetzen.

4.6. cPIP-Synthese in den *Chironomus tentans* Insektenzellen

Die Versuche, in der *Chironomus tentans* Insektenzelllinie die cPIP Synthese zu messen und aus diesen Zellen einen n-IP-haltigen Extrakt herzustellen, mag etwas aus dem Rahmen fallen.

Diese Versuche wurden deswegen durchgeführt, da sie zeigen, dass auch in dieser phylogenetisch entlegenen Zelllinie die cPIP-Synthese weitgehend analog abläuft. Abgesehen von dem Umstand, dass die cPIP-Synthase hier kein partikuläres sondern ein cytosolisches Enzym ist, zeigt dieses Enzym ebenfalls eine hohe ATP-Abhängigkeit. Das aus diesen Zellen isolierte n-IP adsorbiert wie das aus Rattenleber isolierte, an Aktivkohle. Dies ist sicher kein Identitätsbeweis, da es sich jedoch hier um ein wasserlösliches Phosphoinositol-Derivat handelt, sollte es schon als ein Indiz für strukturelle Ähnlichkeit zu werten sein. Ebenso scheint das n-IP der Insektenzelllinie auch labil zu sein, da in den ersten Isolierungsversuchen (Abb. 3.14.1.) kein n-IP erhalten wurde.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der cAMP-Antagonist Prostaglandylinositolcyclophosphat, kurz cPIP, wurde als Hormonbote des Insulins vorgeschlagen. Dieser Mediator wird von einem membranständigen Enzym synthetisiert und zwar durch Verknüpfung von einem Prostaglandin E und einem aktivierten Inositolphosphat (n-IP), das durch keines der käuflichen Inositolphosphate ersetzt werden kann. Es wurde nachgewiesen, dass die Biosynthese von cPIP durch Hormone wie Insulin und Noradrenalin stimuliert wird (80,82).

Für die Biosynthese von n-IP ist ein partikuläres Enzym der Leber notwendig, das im mitochondrialen Sediment enthalten ist, weiterhin ein Nukleosidtriphosphat, wobei mit GTP der beste Umsatz erzielt wird, und ein Inositolbisphosphat-Precursor, der eine Phosphodiester Struktur besitzt. Diese Phosphodiester Struktur des Precursors ist essentiell für dessen Umwandlung zu n-IP und erklärt die hohe Labilität dieser Substanz. Sein Zerfall wird begünstigt sowohl durch sauren und alkalischen pH als auch durch hohe Ionenstärke. Durch Optimierung der Synthesebedingungen sowie der ersten Anreicherungsschritte konnte der Precursor mit guter Ausbeute durch Gelfiltration angereichert werden. Wegen der Labilität des Precursors in Abhängigkeit von der Ionenstärke erbrachte die Anionenaustauscherchromatographie im Gegensatz zur Gelfiltration eine sehr geringe Ausbeute.

Aus Gefäßmuskelzellen, die mit [³H]myo-Inositol markiert wurden, konnte nach 1-minütiger Hormonstimulation Tritium-markierter Precursor mit einer Ausbeute von 60% isoliert werden. Dieser [³H]myo-Inositol-markierte Precursor wird zu n-IP und danach zu cPIP umgesetzt. Mittels hochauflösender HPLC-Methode, mit der die Inositol 5,6-, 3,5- und 1,4-bisphosphate voneinander getrennt werden, konnte gezeigt werden, dass der Precursor im Bereich des Inositol 1,4-bisphosphates eluiert. Dieser Befund zeigt, dass der Precursor naheliegend ein Inositol-1,2-cyclo-4-bisphosphat sein muß.

Wird n-IP-Biosynthese unter Einsatz von [³H]-GTP ausgeführt, so wird ein [³H]-Guanosin-markiertes n-IP erhalten. Das ist ein Hinweis auf die Präsenz von Guanosin im n-IP. Bei der Umsetzung dieses n-IP zu cPIP wird der [³H]-Guanosin-markierte Teil des n-IP nicht in cPIP eingebaut sondern als [³H]-GDP wiedergefunden.

Diese Daten sind am besten interpretierbar, wenn das n-IP ein Guanosindiphospho-4-Inositol-1,2-cyclophosphat ist, das im Laufe der cPIP Biosynthese in GDP und Inositol-1,4-cyclophosphat gespalten wird. Letzteres bindet dann an die C15-Hydroxylgruppe des PGE unter Bildung von cPIP.

Aus einer Reihe von käuflichen Inositolbisphosphaten wurde nach klassischer Synthesemethode deren cyclische Diesterprodukte synthetisiert und anschließend in die Biosynthese von n-IP als Precursor eingesetzt. Nur das Inositol-1,2-cyclo-4-bisphosphat führte zur Synthese von n-IP.

Die Synthese von cPIP konnte auch in Insektenzellen von *Chironomus tentans* (51) nachgewiesen werden. Es konnte einerseits gezeigt werden, dass die Biosynthese von cPIP in diesen Zellen analog abläuft wie in der Rattenleber, und das Insekten-n-IP eine analoge Struktur wie das Ratten-n-IP aufweisen dürfte.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abel,J.J., Geiling, E.M.K., Rouiller,C.A., Bell,F.K. and Wintersteiner,O. ,1927
Crystalline insulin
J.Pharmacol.Exp.Ther. 31, 65-85
2. Adelt, S., 1999
Untersuchungen zum Stoffwechsel von *myo*-Innositolpolyphosphaten in *Dictyostelium discoideum*; Anreicherung und Charakterisierung von Phospho-
hydrolasen – Thesen zur physiologischen Funktion und Anwendungen bei der
Enzym-unterstützten Synthese biologisch aktiver Inositolphosphate
Dissertation-Universität- GH Wuppertal, Shaker Verlag, Aachen
3. Alemany,S., Mato,J.M., Stralfors,P., 1987
Phospho-dephospho-control by insulin is mimicked by a phospho-oligo-
saccharide in adipocytes
Nature 330, 77-79
4. Amini Hadi Kiashar, H., 1993,
Der hormonell regulierte Glucose-Transport in Fettzellen und der Effekt von
cPIP,
Diplomarbeit aus der Biochemischen Abteilung des Deutschen Diabetes
Forschungsinstitutes an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
5. Banting,F.G., Best, C.H., 1922
The internal secretion of the pancreas,
J. Lab.Klin.Med. 7, 251-266
6. Banting,F.G., Best, C.H., Collip,J.B., MacLeod,J.J.R., 1922
Physiological effects of insulin,
Proc.Trans.Roy.Soc.Can. V16, 27-34

7. Banting,F.G., Best, C.H., MacLeod,J.J.R., 1922
The internal secretion of the pancreas,
Am.J.Physiol., 59, C1-C1
8. Berger,M., 2000
Diabetes mellitus
2. Auflage., Urban & Fischer
9. Berridge,M.J., 1984
Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers
Biochem.J., 220, 345-360
10. Berridge,M.J., 1987
Inositol triphosphate and diacylglycerol: Two interacting second messengers ,
Ann.Rev.Biochem., 56, 159-193
11. Berridge, M.J. and Irvine, R., 1989,
Inositol phosphates and cell signalling,
Nature , 341, 197-205.
12. Cheng, K. and Lerner,J., 1985
Intracellular mediators of insulin action,
Ann.Rev.Physiol., 47, 405-424
13. Chiasson, J.L., Dietz, M.R., Shikama, H., Wooten, M., Exton, J.H., 1980
Insulin regulation of skeletal muscle glycogen metabolism
Am.J.Physiology, 239, E69-E74
14. Conrad, M., 1993
Zur Charakterisierung des Kochsaftfaktors der cPIP-Synthese, dem „neuen
Inositol-Phosphat“
Diplomarbeit aus der biochemischen Abteilung des Deutschen Diabetes
Forschungsinstituts an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

-
- 15.** Crapo, L., 1988
Hormone,
Auflage, Spektrum der Wissenschaft der Verlagsgesellschaft, Heidelberg, 113
- 16.** Czech, M.P., 1985
The nature and regulation of insulin receptor: Structure and function,
Ann.Rev.Physiol., 47, 357-381
- 17.** Czech, M.P., Klarlund, J.K., Yagaloff, K.A., Bretford, A.P., Lewis, R.E., 1998
Insulin receptor signalling
J.Biol.Chem., 263, 11017-11020
- 18.** Debant, A., Clauser, E., Ponzio, G., Filloux, C., Auzan, C., Contreres, J-O.,
Rossi, B., 1988
Insulin receptor mutates on Tyr 1162-1163, displays the mitogenic effect but
not the rapid effect of the hormone.
Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 85: 8032-8036
- 19.** Denton, R.M., Midgley, P.J.M., Rutter, G.A., Thomas, A.P., McCormack, J.G.,
1989
Studies into mechanism whereby insulin activates pyruvate dehydrogenase
complex in adipose tissue,
Ann.New York Acad.Sci., 573, 285-296
- 20.** Farese, R.V. 1990
Lipid-derived mediators in insulin action
Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 195, 312-324
- 21.** Gottchalk, W.K., Jarret, L., 1988
The insulinomimetic effects of the polar head group of an insulin-sensitive
glycophospholipid on pyruvate dehydrogenase in both subcellular and whole
cell assays
Arch.Biochem.Biophys., 261, 175-185

-
- 22.** Gypakis, A., 1999,
Untersuchungen zur Biosynthese von aktiviertem Inositolphosphat,
Inaugural-Dissertation aus der biochemischen Abteilung des Deutschen
Diabetes-Forschungsinstitutes an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- 23.** Haysteas, T.A., Campell, D.G., Hardie, D.G., 1988
Analysis of sites phosphorylated an acetyl-CoA carboxylase on response to
insulin in isolated adipocytes. Comparison with sites phosphorylated by casein
kinase-2 and the calmodulin-dependent multiprotein kinase.
Eur.J.Biochem., 175, 347-354
- 24.** Ho, R.J. and Sutherland, E.W., 1971
Formation and release of a hormone antagonist by rat adipocytes,
J.Biol.Chem., 246, 6822-6827
- 25.** Ho, R.J. and Sutherland, E.W., 1975
cAMP mediated feedback regulation in target cells.
Advances in Cyclic Nucleotide Research (Greengard P., Paoletti R. and
Robinson GA, eds), 5, 533-548
- 26.** Ho, R.J., Bomboy, J.D., Wasner, H.K. and Sutherland, E.W., 1975
Preparation and characterization of a hormone antagonist from adipocytes,
Methods Enzymol., 37, 431-438
- 27.** Jaffe, B.M., Behrmann, H.R. and Parker, C.W., 1973
Radioimmunoassay measurement of prostaglandine E, A und F in human
plasma
J.Clin.Invest, 52, 398-405
- 28.** Kahn, C.R., 1994,
Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes,
Diabetes, 43, 1066-1084.

-
- 29.** Kaiser, A.-M., Wasner, H.K. and Spindler, K.D., 1988
Synthesis and action of the cyclic AMP antagonist, Prostaglandin-inositol Cyclic Phosphate (cPIP) in *Dictyostelium discoideum*,
Biol.Chem., 379, 727-730
- 30.** Kelly, K.L., Mato, J.M., Jarett, L., 1986
The polar head group of a novel insulin-sensitive glycosphospholipid mimics insulin action on phospholipid methyltransferase
FEBS Lett., 209, 238-242
- 31.** Kelly, K.L., Mato, J.M., Merida, I., Jarett, L., 1987
Glucose transport and antilipolysis are differentially regulated by the polar head group of an insulin-sensitive glycosphospholipid
Proc.Natl.Acad.Sci., 84, 6404-6407
- 32.** Kelly, K.L., Merida, I., Wong, E.H.A., DiCenzo, D., Mato, J.M., 1987
A phospho-oligosaccharide mimics the effect of insulin to inhibit isoproterenol-dependent phosphorylation of phospholipid methyltransferase
J.Biol.Chem., 262, 15285-15290
- 33.** Kiechle, F.L., Jarett, L., Kotagal, N. and Popp, D.A., 1981
Partial purification from rat adipocyte plasma membranes of a chemical mediator which simulates the action of insulin on pyruvate dehydrogenase,
J.Biol.Chem., 256, 2945-2951
- 34.** Krauss, G., 1997
Biochemie der Regulation und Signaltransduktion: das moderne Lehrbuch für Chemiker, Biochemiker, Biologen und Mediziner
Weinheim, Wiley-VCH.

- 35.** Larner, J., Cheng, K., Schwartz, C., Dubler, R., Creacy, S., Kikuchi, K., Tamura, S., Galasko, G., Pullin, C. and Katz, M., 1981
Chemical mechanism of insulin action via proteolytic formation of mediator peptides,
Mol. Cell Biochem., 40, 155-161
- 36.** Larner, J., Huang, L.C., Schwartz, C.F.W., Oswald, A.S., Shen, T.-Y., Kinter, M., Tang, G., Zeller, K., 1988
Rat liver insulin mediator which stimulates pyruvate dehydrogenase phosphatase contains galactosamine and D-chiroinositol
Biochem. Biophys. Res. Commun., 151, 1416-1426
- 37.** Larner, J., Huang, L.C., Tang, G., Suzuki, S., Schwartz, C.F.W., Romero, G., Roulidis, Z., Zeller, K., Shen, T.-Y., Oswald, A.S., Luttrell, L., 1988
Insulin mediators: Structure and formation
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 53, 965-971
- 38.** Leßmann, M., 1991
Zur *in vitro* Biosynthese des cAMP-Antagonisten Prostaglandylinositol-cyclophosphat (cPIP)
Dissertation aus der biochemischen Abteilung des Deutschen Diabetes-Forschungsinstitutes an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- 39.** Low, M.G., Saltiel, A.R., 1988
Structural and functional roles of glycosyl-phosphatidylinositol in membranes
Science, 239, 268-275
- 40.** Malchoff, C.D., Huang, L., Gillespie, N., Villar, P.C., Schwartz, C.F.W., Cheng, K., Hewlett, E.L., Larner, J., 1987
A putative mediator of insulin action which inhibits adenylate cyclase and adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase: Partial purification from rat liver: Site and kinetic mechanism of action
Endocrinology, 120, 1327-1337

- 41.** Maller, J.L., Pike, L.J., Freidenberg, G.R., Cordera, R., Stith, B.J., Olefsky, J.M., Krebs, E.G., 1986
Increased phosphorylation of ribosomal protein S6 following microinjection of insulin receptor-kinase into *Xenopus* oocytes,
Nature (London), 320, 459-461
- 42.** Mato, J.M., Kelly, K.L., Abler, A., Jarett, L., 1987
Identification of a novel insulin-sensitive glycopospholipid from H35 hepatome cells
J.Biol.Chem., 262, 2131-2137
- 43.** Mato, J.M., 1989
Insulin mediators revisited
Cell Signalling, 1, 143-146
- 44.** Mato, J.M., Kelly, K.L., Abler, A., Jarett, L., Corkey, B.E., Cashel, J.A., Zopf, D., 1987
Partial structure of an insulin-sensitive glycopospholipid
Biochem.Biophys.Res.Comm., 146, 764-770
- 45.** Mayerus, P.W., Connolly, T.M., Deckmyn, H., Ross, T.S., Bross, T.E., Ishii, H., Bansal, V.S., Wilson, D.B., 1986
The metabolism of phosphoinositide-derived messenger molecules
Science 234, 1519-1526
- 46.** Mayr, G.W., 1987
Inositol phosphates: Structural components, regulators and signal transducers of the cell – a review in : *Topics in Biochemistry*, Sonderdruck von Boehringer Mannheim, 1-18

47. Mirmohamadsadegh, A., 1993

Zur Reinigung des Kochsafffaktors der cPIP Biosynthese, dem "neuen Inositol-Phosphat"

Dissertation aus der biochemischen Abteilung des Deutschen Diabetes-Forschungsinstitutes an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.

48. Parthasarathy, R. and Eisenberg, F., 1986,

The Inositol phospholipids: a stereochemical view of biological activity,
Biochem. J., 235, 313-322

49. Partke, H.J. and Wasner, H.K., 1987

Cyclic AMP-antagonist, a second messenger for insulin action, inhibits glucose-stimulated insulin secretion in isolated islets of chinese hamsters

Biophysics of the Pancreatic β -Cell (Atwater I., Rojas E., Soria B., eds.),
Plenum Press: New York, 409-412

50. Patel, M.S., Roach, T.E., 1990

Molekular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes
FASEB J., 4, 3224-3233

51. Polifke, T., 1997

Intrazelluläre Signaltransduktion bei der epithelialen Zell-Linie von Chironomus tentans

Diplomarbeit an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

52. Robison, G.A., Butcher, R.W., Sutherland, E.W., 1971

Cyclic AMP, New York and London, Chapter 3, 49-60

53. Romero, G., Luttrell, L., Rogol, A., Zeller, K., Hewlitt, E., Lerner, J., 1988

Phosphatidylinositol-glycan anchors of membrane proteins: Potential precursor of insulin mediators

Science, 240, 509-511

- 54.** Sadegh Alireza Mirmohammad, 1993
Zur Reinigung des Kochsaftfaktors der cPIP Biosynthese, dem "neuen Inositol-Phosphat",
Diplomarbeit aus der biochemischen Abteilung des Deutschen Diabetes Forschungsinstitutes an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- 55.** Salge, U., 1987
Untersuchungen zur biologischen Synthese des cAMP-Antagonisten
Dissertation aus der biochemischen Abteilung des Deutschen Diabetes-Forschungsinstitutes an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- 56.** Saltiel, A.R., Cuatrecasas, P., 1988
In search of a second messenger for insulin
Am.J.Physiol., 255, C1-C11
- 57.** Saltiel, A.R., Osterman, D.G., Darnell, J.C., Sorbara-Cazan, L.R., Chan, B.L., Low, M.G., Cuatrecasas, P., 1988
The function of glycosyl phosphoinositides in hormone action
Phil. Trans.R.Soc.Lond., B320, 345-358
- 58.** Saltiel, A.R., 1990
Second messengers of insulin action
Diabetes Care, 13, 244-256
- 59.** Saltiel, A.R., 1990
Signal transduction in insulin action
J.Nutr.Biochem., 1, 180-188
- 60.** Saltiel, A.R., Osterman, D.G., Darnell, J.C., 1988
Role of glycosyl phosphoinositides in insulin action
Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol., 53, 955-963

- 61.** Saltiel, A.R., Osterman, D.G., Darnell, J.C., Chan, B.L., Sorbara-Cazan, L.R., 1989
The role of glycosylphosphoinositides in signal transduction
Rec.Prog.Horm.Res., 45, 353-382
- 62.** Saltiel, A.R., 1990
Second messengers of insulin action
Trends Endocrin.Metabol., 1, 158-163
- 63.** Saltiel, A.R., Sherline, P., Fox, J.A., 1987
Insulin-stimulated diacylglycerol production results from the hydrolysis of a novel phosphatidylinositol glycan
J.Biol.Chem., 262, 1116-1121
- 64.** Saltiel, A.R., 1987
Insulin generates an enzyme modulator from hepatic plasma membranes: Regulation of adenosine 3', 5'-monophosphate phosphodiesterase, pyruvate dehydrogenase and adenylate cyclase
Endocrinology, 120, 967-972
- 65.** Saltiel, A.R., 1996
Diverse signaling pathways in the cellular actions of insulin
Am.Physiol.Soc., E375-E385
- 66.** Sato, T., Villar, P.C., Huang, L., Tang, G., Lerner, A.C., Lerner, J., 1988
Insulin and a putative insulin metabolic mediator fraction from liver and muscle stimulate p33 messenger ribonucleic acid accumulation by apparently different mechanism
Endocrinology, 123, 1559-1564
- 67.** Schultz, C., Burmester, A. and Stadler, C., 1996
Synthesis, separation and identification of different inositol phosphates,
Subcell.Biochem., 26, 371-413

- 68.** Seals, J. and Czech, M.P., 1980
Evidence that insulin activates an intrinsic plasma membrane protease in generating a secondary chemical mediator,
J.Biol.Chem., 255, 6529-6531
- 69.** Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goetze, N.M., Olsen, B.J. and Klenk, D.C., 1985
Measurement of protein using bicinchoninic acid
Anal.Biochem., 150, 76-85
- 70.** Smith, L.D., 1989
The induction of oocyte maturation: transmembrane signalling events and regulation of the cell cycle
Development, 107, 685-699
- 71.** Spindler-Barth, M., Junger, E. and Spindler, K.-D., 1992
Vesicle formation and ecdysteroid-induced cellular differentiation in the epithelial cell line from *Chironomus tentans*
Tissue Cell., 24(6) , 919-934
- 72.** Sue Goo Rhee, 2001
Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C
Annu.Rev.Biochem., 70, 281-312
- 73.** Suzuki, S., Toyota, T., Tamura, S., Kikuchi, K., Tsuiki, S., Huang, L., Villar, P.C., Larner, J., Goto, Y., 1987
ATP-Mn²⁺ stimulates the generation of a putative mediator of insulin action
J.Biol.Chem., 262, 3199-3204
- 74.** Thakkar, J.K., Rayu, M.S., Kennington, A.S., Foil, B., Caro, J.F., 1990
3H-myoinositol incorporation into phospholipids in liver microsoms from human with and without type II diabetes,
J.Biol.Chem., 265, 5475-5481

- 75.** Wasner, H.K., 1975,
Regulation of protein kinase and phosphoprotein phosphatase by cyclic AMP and cyclic AMP antagonist.
FEBS Lett., 57, 60-63.
- 76.** Wasner, H.K., 1976,
Preparation of a liver plasma membrane with an adrenalin responsive cyclase after inhibition of prostaglandine synthesis by indomethacin.
FEBS Lett., 72, 127-130.
- 77.** Wasner, H.K., 1981,
Biosynthesis of cyclic AMP antagonist in hepatocytes from rats after adrenalinor insulin stimulation.
FEBS Lett., 133, 260-264.
- 78.** Wasner, H.K., 1985
Prostaglandylinositol cyclic phosphate, an antagonist to cyclic AMP
Prostaglandines, Leucotrienes and Lipoxins (Bailey JM, ed.), Plenum Press:
New York, 251-257
- 79.** Wasner, H.K. and Salge, U., 1987a
Prostaglandylinositol cyclic phosphate, an antagonist to cyclic AMP
Advances in Prostaglandin, Tromboxane and Leucotriene Research Vol. 17
(Samuelsson B., Paoletti R., Ramwell PW:, eds.), Raven Press:New York,
691-695
- 80.** Wasner, H.K. and Salge, U., 1987b
Prostaglandylinositol cyclic phosphate, a second messenger for insulin
Recent Trends in Management of Diabetes Mellitus (Sakamoto N., Alberti KGMM, Hotta N., eds.), Excerpta Medica: Amsterdam, International Congress
Series No. 726, 226-231

- 81.** Wasner, H.K., Lemoine, H., Junger, E., Leßmann, M. and Kaufmann, R., 1991, Prostaglandyl-inositol cyclic-phosphate, a new second messenger. Prostaglandines, Leukotrienes, lipoxins and PAF (Bailey JM, ed.), Plenum Press; New York, 153-169.
- 82.** Wasner, H. K., Kaufmann, R and Lemoine, H., 1992
Mass spectrometric identification of prostaglandylinositol; the dephosphorylated cyclic AMP antagonist, cyclic PIP, *Analisis*, 20, 171-177.
- 83.** Wasner, H. K., Salge, U. and Gebel, M., 1993
The endogenous cyclic AMP antagonist, cyclic PIP: ist ubiquity, hormone stimulated synthesis and identification as prostaglandylinositol cyclic phosphate, *Acta Diabetol.*, 30, 220-232.
- 84.** Wasner, H. K., Weber, S., Partke, H.J. and Amini-Hadi-Kishar, H., 1994, Indomethacin treatment causes loss of insulin action in rats: involvement of prostaglandines in the mechanism of insulin action, *Acta Diabetol.*, 31, 175-182.
- 85.** Wasner, H. K., Leßmann, M., Conrad, M., Amini, H., Psarakis, E., Mir-Mohammad-Sadegh, A., 1996a,
Biosynthesis of endogenous cyclic adenosine monophosphate (AMP) antagonist, prostaglandylinositol cyclic phosphate (cyclic PIP), from prostaglandin E and activated inositol polyphosphate in rat liver plasma membranes, *Acta Diabetol.*, 33, 126-138
- 86.** Wasner, H.K., 2000b,
Phosphatidylinositol 3-Kinase and Prostaglandylinositol cyclic Phosphate (Cyclic PIP), a Mediator of Insulin Action, in the Signal Tranduction of Insulin *Biol. Chem.*, 381, 1139-1141

87. Wilson, K. and Goulding, K.H., 1991

Methoden der Biochemie,

3. neubearbeitete und erweiterte Auflage; Thieme Verlag, 82-84

88. Zick, Y., 1989

The insulin receptor: Structure and function

CRC Crit.Rev.Biochem., 24, 217-269

7. ANHANG

7.1. Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1.1.1.: Insulinsignalkaskaden (65)	7
Abb. 1.2.1.: Vorgeschlagenen chemische Struktur von cPIP (75,81,83).....	9
Abb. 1.2.2.: Derzeit angenommene Struktur des aktivierten Inositolphosphates (n-IP).....	10
Abb. 2.2.9.1.: Schematische Darstellung der Auftrennung der verschiedenen Bestandteile des Homogenates nach Zentrifugation	22
Abb.2.2.11.1.: Schema der Differentialzentrifugation eines Rattenleberhomogenats .	23
Abb. 3.1.1.: Abhängigkeit der cPIP-Biosynthese von der Menge an eingesetztem n-IP	29
Abb. 3.2.1.: n-IP mit und ohne vorheriger Adsorption an Aktivkohle	30
Abb. 3.3.1.: Anreicherung des Precursors durch Gelfiltration an Sephadex G15.....	31
Abb. 3.4.1.: Anionenaustauscherchromatographie des Prec-IP an einer Q-Sepha- rose-Säule	33
Abb. 3.5.2.: Analyse der Prec-IP-Lösung durch HPLC-MDD	35
Abb. 3.5.3.: UV-Profil des mittels HPLC-MDD analysierten Prec-IP-Lösung	35
Abb. 3.5.4.: Auftrennung verschiedener Inositolbisphosphate an eine Q-Sepharose- Säule (HPLC-Anlage).....	36
Abb. 3.5.6.: HPLC der durch Gelfiltration angereicherten Prec-IP-Lösung unter analogen Bedingungen der Abb. 3.5.4	37
Abb. 3.5.7.: UV-Profil des an HPLC angereicherten Prec-IP-Lösung.....	37
Abb. 3.6.2.: Erhaltenen n-IP-Menge in pmol beim Einsetzen verschiedener Substrat- Kombinationen in den Synthese-Tests	39
Abb. 3.7.1.: Abhängigkeit der n-IP-Synthese von der Konzentration an Fluorid, einem Phosphatase-Inhibitor	40
Abb. 3.8.1.: Biosynthese von n-IP unter Einsatz der vier möglichen Nucleosidtri- phosphate	41
Abb. 3.9.1.1.: Zeitabhängigkeit der n-IP-Synthese.....	42
Abb. 3.9.2.1.: Abhängigkeit der n-IP-Synthese von der Enzym-Konzentration	43
Abb. 3.9.3.1.: Abhängigkeit der n-IP-Synthese von der Precursor-Konzentration.....	44
Abb. 3.9.4.1.: Abhängigkeit der n-IP Synthese von der GTP-Konzentration	45

Abb. 3.10.1.1.: Stabilität des Precursors und des Monoesters des n-IP in Abhängigkeit von der Ionenstärke	46
Abb. 3.10.2.1.: Stabilität des Precursors bei verschiedenen pH-Werten	47
Abb. 3.10.3.1.: Labilität des Precursor in Abhängigkeit von der Lagerungszeit und den Behandlungsbedingungen	48
Abb. 3.11.1.1.: Gelfiltration des Extraktes von [³ H]-Inositol markierten Zellen an Sephadex G15.....	49
Abb. 3.11.1.2.: Auftrennung des Inositolphosphat-Gipfels der Gelfiltration durch Anionenaustauscher-Chromatographie	50
Abb. 3.11.1.4.: Erzielter Einbau des [³ H]myo-Inositols bei Einsatz der Substanzen der Gipfel 1-3 der Abb. 3.11.1.2. an Stelle von n-IP in den cPIP-Test	52
Abb. 3.11.1.6.: Umsetzung des [³ H]-n-IP zu cPIP ohne und mit vorheriger Adsorption an Aktivkohle	53
Abb. 3.11.2.1.: Anionenaustauscher-Chromatographie des markierten n-IP und [¹⁴ C] -IP ₁ als Marker	54
Abb. 3.11.3.1.: Gelfiltration der [³ H]Guanosin-markierten Reaktionsprodukte und des unmarkierten n-IP an Sephadex G15.....	55
Abb. 3.11.3.2.: Rechromatographie der gepoolten Fraktionen und des unmarkierten n-IP an Sephadex G15	56
Abb. 3.11.3.3.: Gelchromatographie der Umsetzung ohne Precursor und des unmarkierten n-IP an Sephadex G15.....	57
Abb. 3.11.3.4.: Rechromatographie der Kontrollinkubation ohne Precursor und des unmarkierten n-IP an Sephadex G15.....	57
Abb. 3.11.4.1.: Auftrennung von [3H]PGE (Fraktion 1+2) und daraus synthetisiertes cPIP (Fraktion 4+5) an Kieselgel	58
Abb. 3.11.4.2.: Auftrennung der Produkte der cPIP-Synthese bei Einsatz von [³ H] Guanosin-markiertem n-IP anstelle von [³ H]PGE an Kieselsäuregel	59
Abb. 3.11.4.3.: [¹⁴ C]-GDP auf Kieselgel	59
Abb. 3.11.4.4.: Chromatographie des [³ H]Guanosin-markierten Substanz der Fraktion 6 (Abb. 3.11.4.2.) sowie Elution des [¹⁴ C]-GDP an Q-Sepharose.....	60

Abb. 3.12.1.: Hydrolyse von cyclischem Phosphatdiester (schematisch).....	61
Abb. 3.12.2.: HPLC des mit [³ H]myo-Inositol-markierten Prec-IP nach Hydrolyse in 0,1N HCl	61
Abb. 3.12.3.: Radioaktivitätsgehalt der Fraktionen nach der HPLC	62
Abb. 3.11.1.: Cyclisierung von Inositolphosphat mit Carbodiimid (schematisch).....	63
Abb. 3.13.2.: Aktivität des Precursors sowie der synthetisierten Inositolbis- phosphate nach dem Einsetzen in den n-IP-Synthese-Test	64
Abb. 3.14.1.: cPIP-Aktivität des Insekten-Precursor mit und ohne Ratten-n-IP.....	65
Abb. 3.14.2.: cPIP-Aktivität im Insekten-Sediment bzw. – Überstand getestet mit und ohne ATP	66
Abb. 3.14.3: cPIP-Aktivität im Insekten-Sediment mit und ohne Neomycinsulfat sowie vor und nach Kohle-Filtration	67
Abb. 4.1.1.: Biosynthese von cPIP und dessen Substrate	69
Abb. 4.1.2.: Detaillierte Darstellung der Reaktionsgleichungen der Synthese von n-IP und cPIP	70

7.2. Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 3.5.1.: Abreicherung von Verunreinigungen im Laufe der Prec-IP Reinigung.....	33
Tabelle 3.5.5.: Zuordnung verschiedener Inositolbisphosphat-Isomere zu den durch Leitfähigkeitsdetektion ermittelten Substanzgipfeln 8-10	36
Tabelle 3.6.1.: Abhängigkeit der n-IP Synthese von verschiedenen Substanzkombi- nationen	39
Tabelle 3.11.1.3.: Umsatz zu cPIP mit den verschiedenen Substanz-Peaks der Anionenaustauscherchromatographie.....	51
Tabelle 3.11.1.5.: cPIP-Umsatz vor und nach Absorption des n-IP an Aktivkohle	52
Tabelle 4.3.1.: Elution einer (1:1:1:1) Nukleotidmischung bei pH 7. Die Zahlen geben die Fraktionsnummern der Substanz-Maxima an.....	72

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Deutschen Diabetes-Forschungsinstitut an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Hans Reinauer danke ich herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Diabetes-Forschungsinstitut und für die Begutachtung meiner Arbeit. Gleichmaßen danke ich seinem Nachfolger Herrn Prof. Dr. Müller-Wieland für das Interesse an der Arbeit.

Herzlich danken möchte ich Herrn Dr. H.K. Wasner für die freundliche und engagierte Betreuung, für die vielen weiterführenden Ratschläge, für seine stete Hilfsbereitschaft bei der praktischen Arbeit sowie für das Überlassen des Themas dieser Arbeit.

Bei Herrn Professor Dr. F. Wunderlich bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Herrn Prof. Dr. Vogel und Dr. Adelt danke ich herzlich für die Analyse der in dieser Arbeit beschriebenen Lösungen mittels HPLC.

Bei Herrn Prof. Dr. Spindler und Prof. Dr. Lemoine bedanke ich mich für die Bereitstellung der Insektenzellen bzw. Gefäßmuskelzellen.

Dipl. Biol. Sabine Hucken und allen Mitarbeitern des Institutes danke ich für die gute Zusammenarbeit, für die Hilfestellungen und das freundliche Arbeitsklima.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen lieben Eltern, die mir mein Studium erst ermöglicht haben, die nie an mir gezweifelt haben und mir stets hilfsbereit und unterstützend zur Seite standen.

Zum Schluß danke ich von ganzem Herzen meinem lieben Ehemann Attila für seine Unterstützung, Hilfsbereitschaft, Aufmunterung, Geduld und Liebe, mit der er mich durch dieser Zeit begleitet hat.

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit- einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen-, die anderen Werken im Wortlaut oder im Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt.