

KINASE-INHIBITOREN

AUßERHALB

DER ATP-BINDUNGSSTELLE

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Tanju Yesilkaya
aus Köln

Druck: copy team cologne

2005

Berichtersteller:

Prof. Dr. H. W. Klein

Prof. Dr. R. Krämer

Tag der mündlichen Prüfung:

13.07.2005

Meiner Familie

„Jedes Gefäß wird beim Auffüllen immer enger, aber das Gefäß des Wissens wird immer breiter, wenn man es auffüllt.“

Haci Bektas Veli (anatolischer Dichter im 13. Jhr.)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2002 bis März 2005 am Institut für Biochemie an der Universität zu Köln unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. W. Klein angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Zusammenfassung und Abstract	3
2.1	Abstract	5
3	Einleitung	7
3.1	Allgemeiner Teil	7
3.2	Die Regulation der Src-Kinase	8
3.3	Die Regulierung der CDK-Kinasen	11
3.4	Regulation der Kinaseaktivität über die JM-Domäne	13
3.5	Die Regulation bei der IR/IGFR-Kinase und Fragestellung	16
3.5.1	Dimerisierung als erweiterter Mechanismus der IR/IGFR Kinase-Aktivierung ...	17
3.5.2	Detektion möglicher Dimerisierungsdomänen	17
3.5.3	Fragestellung	19
4	Ergebnisse	20
4.1	Die α D-Helix als neues Target für die Kinaseregulation	20
4.1.1	Inhibition der Kinase-Autophosphorylierung über die α D-Helix	20
4.1.2	Inhibition der Substratphosphorylierung der Kinase durch das α D-Peptid	23
4.1.3	Das α D-Peptid inhibiert nicht über einen kompetitiven Mechanismus.....	25
4.1.4	Die Dimerisierung der Kinasedomäne wird durch das α D-Peptid beeinträchtigt	27
4.1.5	Die Inhibitionsstärke des α D-Peptids ist modulierbar über die Sequenz.....	29
4.2	Darstellung und Charakterisierung der R1092Q-Kinase	31
4.2.1	Konstruktion und Expression der Kinase GST-IRKD Δ 72C-R1092Q	32
4.2.2	Die Autophosphorylierung der R1092Q- Kinase ist in vitro beeinträchtigt.....	33
4.2.3	Der Dimerisierungsmechanismus der R1092Q- Kinase ist gestört	36
4.2.4	Die R1092Q-Kinase zeigt in vitro kein Defekt in der Substratphosphorylierung.	37
4.3	Der Einfluss der JM-Domäne auf die Kinaseaktivität	39
4.3.1	Herstellung und Expression der GST-JM-Konstrukte des IR und IGFR.....	40
4.3.2	Die Autophosphorylierung der IGFR-VK Kinase wird durch die GST-IGFR-JM Proteine gehemmt.....	42
4.3.3	Konstruktion und Isolierung von GST-freien IGFR-JM-6xHis Proteinen.....	44
4.3.4	Die isolierten JM-Domänen sind hinreichend für die Inhibition der IGFR-VK Autophosphorylierung	46
4.3.5	Der Einfluss der isolierten JM-Domäne auf die Substratphosphorylierung der IGFR-VK.....	47
5	Diskussion	50

5.1	Die αD-Helix als neues Target für die Kinaseregulation	50
5.2	Darstellung und Charakterisierung der R1092Q-Kinase	59
5.3	Der Einfluss der JM-Domäne auf die Kinaseaktivität	62
6	Material	67
6.1	Bakterienstämme, Viren, Kulturmedien und –zusätze	67
6.2	Chemikalien	67
6.3	Chromatographie	70
6.4	Kit-Systeme	70
6.5	Laborgeräte	71
6.6	Molekulargewichts- und Längenstandards	74
6.7	Nucleinsäuren	74
6.8	Antikörper und Enzyme	75
6.9	Peptide	76
6.10	Puffer und Lösungen	77
6.11	Verbrauchsmaterial	80
7	Methoden	81
7.1	Molekularbiologische Methoden	81
7.2	Herstellung der E. coli Expressionsvektoren GST-JM_{Mutanten}	81
7.3	Konstruktion des Transfervektors pAC-G2T-IRKΔ72C_{R1092Q}	82
7.4	Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen aus E. coli	83
7.4.1	Proteolytische Spaltung der GST-JM _{Mutanten-6xhis} (IGFR) und Reinigung der erhaltenen JM-Peptide	84
7.5	Bestimmung der Proteinkonzentration	84
7.5.1	Bestimmung nach MINAMIDE und BAMBURG (1990) – „Spot-Test“	84
7.5.2	Bestimmung nach BRADFORD (1976)	85
7.5.3	Bestimmung durch Absorptionsspektroskopie.....	85
7.6	Protein-Biochemische Methoden	86
7.6.1	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE).....	86
7.6.2	Transfer und immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membran ..	87
7.7	Expression und Reinigung der GST-IRKΔ72C-R1092Q	88
7.7.1	Zellkultur	88
7.7.2	Infektion, Proteinexpression und Ernte von Sf9-Zellen.....	89
7.7.3	GST-Abtrennung über Proteaseverdau (Thrombin) und anschließende Ionenaustauschchromatographie der IRK Δ 72C Kinasen	90
7.8	Reversed-phase-HPLC	91
7.9	Phosphorylierungsreaktionen	92
7.9.1	Autophosphorylierung mit anschließender nativer PAGE.....	93

7.9.2	Radioaktive Auto- und Substratphosphorylierungen	93
7.10	Circular Dichroismus (CD)-Spektroskopie	94
7.11	Datenauswertung und -darstellung	95
8	Literaturverzeichnis	96
9	Anhang	101
9.1	GST-Abtrennung und Purifikation der IRKDΔ72C Kinasen	101
9.2	Plasmidkarten	103

1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	FPLC	Fast performance Liquid Chromatography
µCi	Mikrocurie	fw	forward
µg	Mikrogramm	<u>G</u>	1. Erdbeschleunigung
µl	Mikroliter	g	2. Gramm
µM	Mikromolar	G	Guanin
<u>A</u>		Gln, Q	Glutamin
A	1. Adenin	Glu, E	Glutamat
	2. Absorption	Gly, G	Glycin
Ala, A	Alanin	GST	Glutathion S-Transferase
Abb.	Abbildung	<u>H</u>	
AcNPV	Autographa californica Nuclear Polyhydrosis Virus	h	Stunde
AP	alkalische Phosphatase	His, H	Histidin
APS	Ammoniumpersulfat	HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
Arg, R	Arginin	<u>I</u>	
AS	Aminosäure	Ig	Immunoglobulin
Asn, N	Asparagin	Ile, I	Isoleucin
Asp, D	Aspartat	IGF-1	Insulin-like growth factor-1
ADP	Adenosindiphosphat	IGFR	Insulin-like growth factor-1 Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat	IR	Insulinrezeptor
<u>B</u>		IRK	Insulinrezeptorkinase
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat	IRKD	IR-Kinasedomäne
BSA	Rinderserumalbumin	IRS-1	Insulinrezeptorsubstrat-1
bzw.	beziehungsweise	IGFKD	IGFR-Kinasedomäne
<u>C</u>		<u>J</u>	
ca.	Circa	JM	Juxtamembran-Domäne
cDNA	DNA-Kopie der mRNA	<u>K</u>	
Ci	Curie	Kap.	Kapitel
cpm	counts per minute, Zählimpuls pro Minute	Konz.	Konzentration
C-lobe	C-terminaler Kinaselappen	<u>L</u>	
Cys, C	Cystein	Leu, L	Leucin, L auch Liter
<u>D</u>		Lys, K	Lysin
d.h.	das heißt	<u>M</u>	
Da, kDa	Dalton, Kilodalton	M	mol/l
DMSO	Dimethylsulfoxid	mA	Milliampere
DNA	Desoxyribonucleinsäure	max.	maximal
DTT	Dithiothreitol	Met, M	Methionin
<u>E</u>		min.	Minute
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	mind.	Mindestens
EGTA	Ethylenglycolbis-(amino-ethylether)-Tetraessigsäure	mg	Milligramm
EGFR	Epidermal growth factor Rezeptor	ml	Milliliter
et al.	et alii	mm	Millimeter
<u>F</u>		MQ	Millipore Wasser
FGF	fibroblast growth factor	M_r/ MW	Molekulargewicht
FLT3	fms-like tyrosine-kinase 3	ms	Millisekunde

1. Abkürzungsverzeichnis

<u>N</u>		<u>V</u>	
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid	V	Volt
N-lobe	N-terminaler Kinaselappen	v/v	volume/volume, ml Volumen in 100 ml Gesamtvolumen
<u>O</u>		Val,V	Valin
OD	optische Dichte	vgl.	vergleiche
<u>P</u>		<u>W</u>	
p.i.	post infection	W	Watt
P_i	anorganisches Phosphat	WASP	Wiskott-Aldrich Syndrome
PBS	phosphate buffered saline		Protein
PDGF	platelet-derived growth factor	w/v	weight/volume, g Substanz in 100 ml Gesamtvolumen
pH	potentium hydrogenii	Wt	Wildtyp
Phe, F	Phenylalanin	<u>X</u>	
PL	Poly-L-Lysin	<u>X</u>	beliebige Aminosäure
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	<u>Z</u>	
Pro, P	Prolin	z.B.	zum Beispiel
PVDF	Polyvinylidifluorid		
pY	Phosphotyrosin		
<u>R</u>			
re	reverse		
rpm	revolutions per minute		
RT	Raumtemperatur		
RTK	Rezeptortyrosinkinase		
<u>S</u>			
s.	siehe		
s.a.	siehe auch		
s.o.	siehe oben		
SDS	Natriumdodecylsulfat		
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese		
sec	Sekunde		
Ser, S	Serin		
Shc	Src homology 2 domain containing		
Sf9	Spodoptera frugiperda		
sog.	sogenannt		
<u>T</u>			
Tab.	Tabelle		
TBS	Tris Buffered Saline		
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin		
Thr, T	Threonin		
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan		
Trp, W	Tryptophan		
Tyr, Y	Tyrosin		
<u>U</u>			
U	Unit oder Uracil		
u.a.	unter anderem		
UE	Untereinheit		
UV	Ultraviolett		
ü.N.	über Nacht		
ÜNK	Übernachtkultur		

2 Zusammenfassung und Abstract

Rezeptortyrosinkinasen (RTK) werden über Autophosphorylierung aktiviert. Damit eine effiziente Autophosphorylierung stattfinden kann, müssen die Kinasedomänen erst dimerisieren, wodurch eine Transformation der Kinase von der inaktiven, offenen zur aktiven, geschlossenen Form induziert wird.

Dieser Prozess ist für jede Kinase einzigartig und kann selektiv beeinflusst werden. Anstatt Kinasen über ATP-Analoga zu inhibieren, sollten alternative Konzepte etabliert werden, die zu einer spezifischen Hemmung der Kinaseaktivität durch Störung des Dimerisierungsmechanismus führen sollten. Ein repräsentatives Ziel dafür ist die strukturell konservierte α -Helix D der Kinase. Die α D-Helix zählt zu der so genannten Scharnier-Region (*hinge region*) und bestimmt maßgeblich die Konformationsänderung von der inaktiven zur aktiven Form und *vice versa*.

Ein Peptid, welches 15 Aminosäuren der α D-Helix des Insulinrezeptors (IR) umfasst, wurde chemisch synthetisiert. Dieses α D-Peptid inhibiert die Kinasen des IR und IGFR signifikant in Autophosphorylierungsreaktionen. Auch in Substratphosphorylierungen wird eine effiziente Inhibition über das Peptid beobachtet. Der Inhibitor ist nicht kompetitiv zu ATP oder Substrat. Der IC_{50} -Wert des Peptid-Inhibitors liegt bei 30 μ M. Um die Spezifität des Inhibitors zu testen, wurden zwei Kontrollen durchgeführt. Zum einen wurde ein ebenfalls chemisch synthetisiertes Kontrollpeptid, welches eine zufällig angeordnete Sequenz von 14 AS besitzt, in Auto- und Substratphosphorylierungsreaktionen der IR/IGFR Kinasen eingesetzt. Des Weiteren wurde das α D-Peptid bei einem Vertreter der Ser/Thr-Kinasefamilie (Akt-Kinase) verwendet. In beiden Fällen konnte keine Inhibition festgestellt werden. Eine bereits voraktivierte, d.h. vollphosphorylierte Kinase des IGFR in Standardsubstratphosphorylierungen mit dem Substrat polyGluTyr, einem Kopolymer aus Glu und Tyr im Verhältnis 4:1, nicht länger inhibiert werden. Erst bei Verwendung der inaktiven, monomeren Kinase des IR als Substrat trat wieder eine Inhibition auf. Da dieses physiologische Substrat vor allem ein Dimerisierungspartner darstellt, schließe ich daraus, dass der Inhibitor mit der Dimerisierung der Kinase interferiert. Eine Kinasemutante mit der Substitution Arg 1092 zu Gln in der Scharnier-Region bewirkte, dass diese Kinase schwere Defekte in der Autophosphorylierung aufwies und erst in hohen Konzentrationen [$> 8 \mu$ M] aktiv war. Zudem war die Substraterkennung bei der Phosphorylierung der inaktiven Kinase gestört, wogegen andere Substrate wie polyGluTyr oder ein Teilfragment des IRS-1 von der R1092Q-Mutante akzeptiert wurden. Dies bekräftigt die Annahme, dass die Scharnier-Region inklusive der α D-Helix für die Interaktion der IR/IGFR-Kinase mit einer weiteren Kinaseuntereinheit von großer Bedeutung ist.

Weitere Experimente mit einer anderen Dimerisierungsfläche der IR/IGFR-Kinasen, der Juxtamembran(JM)-Domäne, sollten gezielt weitere regulatorische Mechanismen zur Beeinflussung der Kinaseaktivität liefern. Zu diesem Zweck wurde in der hydrophoben Tasche der JM-Domäne das invariante Tyr 985 (IR) bzw. Tyr 957 (IGFR) zu Gln, Lys und Trp substituiert, um möglichst verschiedene Effekte zu erzielen. Bei Zugabe der JM-Konstrukte des IGFR in der Autophosphorylierung der IGFR-Kinase wurde eine starke Inhibition beobachtet. Dagegen zeigten dieselben JM-Konstrukte eine aktivierende Wirkung in der Substratphosphorylierung einer inaktiven Kinase, die ebenfalls von der IGFR-Kinase katalysiert worden war. Dieser Befund demonstrierte, dass die Regulation der Kinaseaktivität durch Interferenz mit dem Dimerisierungsprozess genauso zur Inhibition wie auch zur Aktivierung der Transferaseaktivität führen kann.

2.1 Abstract

Receptor tyrosine kinases (RTKs) are activated by autophosphorylation. A prerequisite for autophosphorylation is dimerization of the kinase domains, which induces the transformation from the open, inactive to the closed, active conformation of the kinase. Targeting the unique dimerization process of a kinase should lead to specific inhibition in contrast to ATP mimics which are commonly applied for this purpose. As a representative target for such an inhibition, I found the conserved α -helix D in the kinase structure. The position of the α D-helix as part of the hinge region determines the inactive or active state of the kinase. A peptide comprising 15 residues of the α D-helix of the insulin receptor was synthesized chemically. The α D-peptide inhibits the kinases of IR and IGFR in autophosphorylation reactions. In addition the phosphoryl transfer in substrate phosphorylation reactions is efficiently inhibited in the 10 μ M range. The inhibitor did not decrease the affinity of IR/IGFR kinases for either ATP or substrates significantly. Rather, at 30 μ M peptide concentration the k_{cat} of substrate phosphorylations catalyzed by the IR kinase was reduced by over 50 %. The specificity of the inhibitor towards the kinases of the IR family has been proven with a randomized peptide and by the use of an unrelated kinase (Akt), a member of the Ser/Thr-kinase family. In both cases no effect has been observed. Once activated kinase is no longer inhibited by the peptide in standard substrate phosphorylations with polyGluTyr, a copolymer of Glu and Tyr in a 4:1 ratio. However, by choosing an inactive kinase mutant (IRKD-D/A) as a substrate, inhibition was restored. IRKD-D/A serves primarily as a dimerization partner. Thus, I conclude that the peptide disrupts the kinase dimerization process.

Furthermore, a kinase mutant of the IR with the substitution R1092Q in the hinge region showed impaired activity. Kinase activity was restored when the autophosphorylation was carried out in high concentration [$> 8 \mu$ M]. However, the active kinase mutant failed to phosphorylate a kinase-dead mutant (IRKD-D/A) efficiently, but showed no defects in standard substrate phosphorylations with polyGluTyr or a fragment of the physiological substrate IRS-1. Thus, I postulate that the hinge region with the α D-Helix is necessary for a specific and productive interaction of two kinase subunits.

Additional experiments with another dimerization site of the IR/IGFR kinases, the juxtamembrane domain (JM), were performed to achieve a specific regulation of kinase activity. For this purpose the invariant Tyr 985 (IR) and Tyr 957 (IGFR), respectively, in the conserved hydrophobic groove were replaced with Gln, Lys and Trp, to gain distinctive effects. A strong inhibition of the IGFR kinase autophosphorylations was observed when all JM constructs were added into the reaction. In contrast, the same constructs exposed an activating effect in substrate phosphorylations of the inactive kinase-mutant, IRKD-D/A.

2. Zusammenfassung und Abstract

These results demonstrate that regulation of kinase activity by interfering with the unique dimerization process can lead to both inhibition and activation of the kinase.

3 Einleitung

3.1 Allgemeiner Teil

Die Phosphorylierung von Proteinen ist die häufigste posttranslationale Modifikation. Die reversible Übertragung von Phosphorylgruppen, katalysiert durch Proteinkinasen, spielt eine entscheidende Rolle im Stoffwechsel, in der Differenzierung und im Überleben der Zelle. Die Bedeutung der Phosphorylierung von Proteinen in der eukaryotischen Signaltransduktion spiegelt sich wieder in der Tatsache, dass Proteinkinasen ca. 2 % des Genoms ausmachen [Rubin et al., 2000]. Die räumliche und zeitliche Kontrolle der Phosphorylierung von spezifischen Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten ist entscheidend für Zellwachstum und Zelldifferenzierung. Diese Kontrolle vertraut auf die korrekte Regulation von Proteinkinasen. Kinaseaktivität an falscher Stelle oder zu falscher Zeit kann desaströse Konsequenzen mit sich bringen. Meist führt dies zu Transformation von Zellen und zu Krebs. Tatsächlich war das erste entdeckte Onkogen, v-Src, eine fehlerhaft regulierte Tyrosinkinase [Levinson et al., 1978; Eckhart et al., 1979].

Auf der Basis der Sequenz und Struktur bilden eukaryotische Proteinkinasen eine nah verwandte Super-Familie, welche sich von den Histidinkinasen und anderen Phosphoryltransferasen unterscheiden. Da die mehreren hundert eukaryotischen Proteinkinasen dasselbe katalytische Gerüst aufweisen, hat sich eine Anzahl von sehr verschiedenen, regulatorischen Mechanismen entwickelt. Dies erlaubt Kinasen, in der Funktion individuell zu sein. Die Abb. 3.1 zeigt den schematischen Aufbau einer typischen Proteinkinase anhand des Beispiels der Proteinkinase A (PKA).

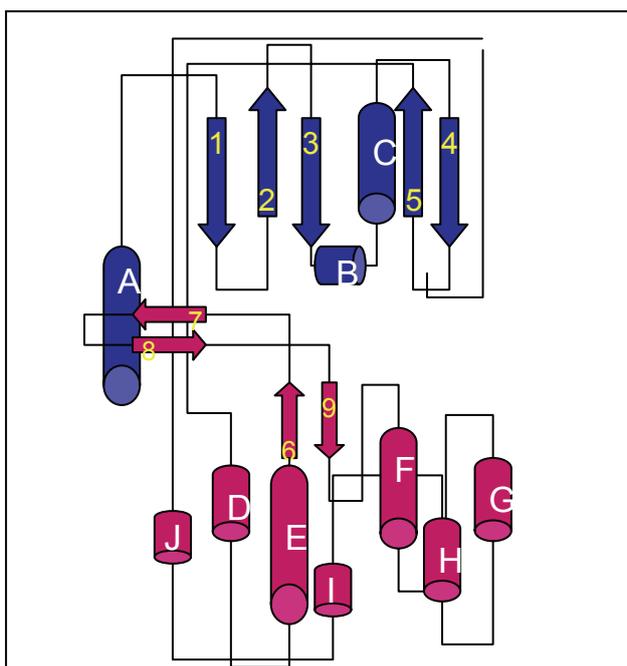


Abb. 3.1: Schematische Struktur der Topologie der Proteinkinase A aus Knighton et al. (1991)

Gezeigt ist der N-terminale Bereich, auch als *N-lobe* bezeichnet (blau) mit der α C-Helix, der C-terminale Bereich, *C-lobe* (rot) mit der Aktivierungsschleife zwischen β 8 und β 9 sowie der katalytischen Schleife zwischen β 6 und β 7.

Zylinder: α -Helices;
Pfeile: β -Faltblätter

Im Grundzustand sind Proteinkinasen in der Regel inaktiv und die Akquisition der katalytischen Aktivität wird oftmals erst nach einer mehrstufigen Kontrolle erreicht. Die Reichweite dieser Kontrolle geht von der Bindung allosterischer Effektoren bis zur Änderungen der subzellulären Lokalisation des Enzyms.

Proteinkinasen stellen molekulare Schalter dar, die zumindest zwei extreme Konformationen einnehmen können: einen „An“-Zustand mit maximaler Aktivität, und einen „Aus“-Zustand, der minimal aktiv ist. Alle Proteinkinasen katalysieren dieselbe Reaktion, den Transfer des γ -Phosphats (Phosphorylrest) von ATP an die Hydroxylgruppe des Serins, Threonins oder Tyrosins. Daher nehmen sie nach Aktivierung die gleiche katalytisch aktive Konformation ein, die strukturell gesehen sehr ähnlich ist [Canagarajah et al., 1997; Hubbard, 1997].

Aus diesem Grunde lassen sich Kinasen nur spezifisch regulieren, wenn sie in ihrem inaktiven Zustand verharren bzw. arretiert sind. So haben sich bei unterschiedlichen Klassen von Kinasen einzigartige Mechanismen in der Aufrechterhaltung des inaktiven Zustands entwickelt. Häufig daran beteiligte strukturelle Elemente sind kritische Regionen wie z.B. die α C-Helix im N-Terminus der Kinase (auch *N-lobe* genannt) oder der Aktivierungsschleife, die eine sehr flexible Region der Kinase darstellt. Mit Hilfe von drei Beispielen soll im Folgenden die Vielfalt der Regulierung bei Proteinkinasen veranschaulicht und erklärt werden.

3.2 Die Regulation der Src-Kinase

Die Src-Familie der Tyrosinkinase umfasst neun Mitglieder (Src, Blk, Fgr, Fyn, Hck, Lck, Lyn, Yes und Yrk). Nach Aktivierung spielen die Src-Kinasen eine Schlüsselrolle in der Kontrolle der Zellproliferation und Zelldifferenzierung. Daher muss ihre katalytische Aktivität streng reguliert werden. Schon frühere biochemische Studien haben darauf hingewiesen, dass die verschiedenen Domänen innerhalb der Src-Kinase essentiell für die Regulation sind [Superti-Furga und Courtneidge, 1995; Brown und Cooper, 1996]. Ein Meilenstein bei der Klärung der Frage, wie die Domänen bei der Repression der Kinase involviert sind, stellt die Veröffentlichung der Kristallstruktur von Src dar [Xu et al., 1997; Williams et al., 1997].

Der modulare Aufbau der Src besteht aus einem myristoylierten N-Terminus, gefolgt von einer nicht-konservierten Region, einer Src homology 3 (SH3)-Domäne, einer SH2-Domäne, einer Tyrosinkinase (auch als SH1 bezeichnet) und einem kurzen C-terminalen Abschnitt (s. Abb. 3.2 a)

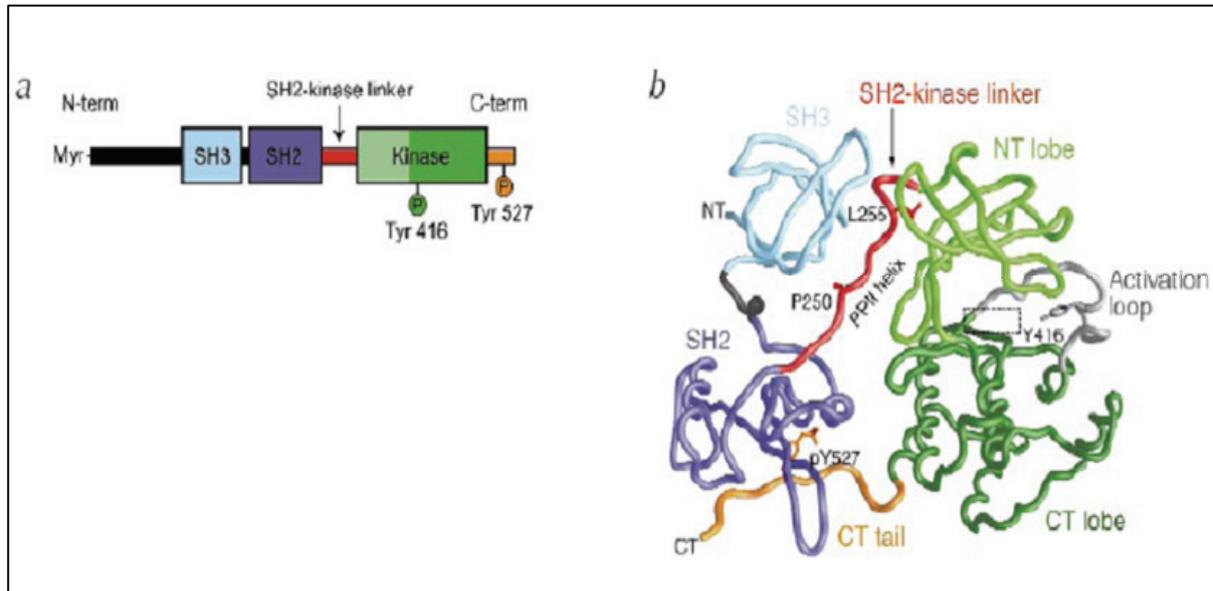


Abb. 3.2: Aufbau der Src-Kinase

a, Schematischer Aufbau der Src-Kinase. Die N- und C-terminalen Lappen der Tyrosinkinasedomäne sind hell- bzw. dunkelgrün markiert. Die zwei Tyr-Phosphorylierungsstellen sind angezeigt: Y416 (Autophosphorylierung – aktivierend) und Y527 (Csk-Phosphorylierung – inhibierend). **b**, Wurmdiagramm der Src-Kinase. Das Farbschema ist wie in (a) mit der Aktivierungsschleife in grau. Die Positionen der Polyprolin-type II-Helix (PPII helix) und des SH2-Kinase-Linker sind verdeutlicht. NT und CT deuten den N- bzw. C-Terminus an. Abbildung aus Hubbard (1999).

Die modularen SH2- und SH3-Domänen, welche auch in einer Heerschar von anderen Signalproteinen vorkommen, binden spezifische Sequenzen in Proteinen, die ein Phosphotyrosin bzw. Polyproline beinhalten [Pawson, 1995; Kuriyan und Cowburn, 1997]. Zudem haben die Src-Kinasen zwei wichtige Tyrosinphosphorylierungsstellen mit gegensätzlichen, regulatorischen Effekten [Hunter, 1987]. Die Autophosphorylierung an Tyr 416 (Src-Nomenklatur) in der Aktivierungsschleife der Kinase führt zur Stimulierung der Kinaseaktivität. Im Gegensatz dazu kommt es zur Inhibition der Aktivität, wenn das Tyr 527 im C-terminalen Schwanz von einer anderen Kinase, der Csk, phosphoryliert wird [Nada et al., 1991]. Die Kristallstruktur von Src zeigte dann, dass die intrinsische SH2-Domäne mit dem phosphorylierten Tyr 527 interagiert und deckte sogar eine weitere intramolekulare Interaktion auf (s. Abb. 3.2b). Obwohl der Bereich zwischen SH2- und Kinasedomäne (SH2-Kinase-Linker) nicht vollständig dem Minimumkonsensusmotiv Pro-X-X-Pro entspricht, formt dieser Teil des Linkers dennoch eine Helix. Diese Helix bindet an die SH3-Domäne (s. Abb. 3.2b).

Wie unterdrücken nun diese intramolekularen Interaktionen die Aktivität der Kinase? Auf den ersten Blick ist dieser autoinhibitorische Mechanismus nicht aus der Struktur ersichtlich. Das aktive Zentrum der Kinase wird nicht von der SH2- bzw. SH3-Domäne oder dem Linker

verdeckt. Stattdessen interagieren diese Bereiche mit der Rückseite der Kinase genau gegenüber dem aktiven Zentrum. Bei näherer Betrachtung aber zeigt sich, dass die Interaktion der SH3-Domäne mit dem SH2-Kinase-Linker die Ausbildung einer Salzbrücke verhindert, die entscheidend für die Kinaseaktivität ist.

In aktiven Proteinkinasen bildet ein invariantes Glutamat (Glu 310 in Src) in der α C-Helix eine Salzbrücke zu einem ebenfalls invariantem Lysin (Lys 295 in Src). Diese Salzbrücke dient dazu, das Lysin so zu platzieren, dass es die Phosphatgruppen des ATP für eine effiziente Katalyse koordinieren kann (s. Abb. 3.3).

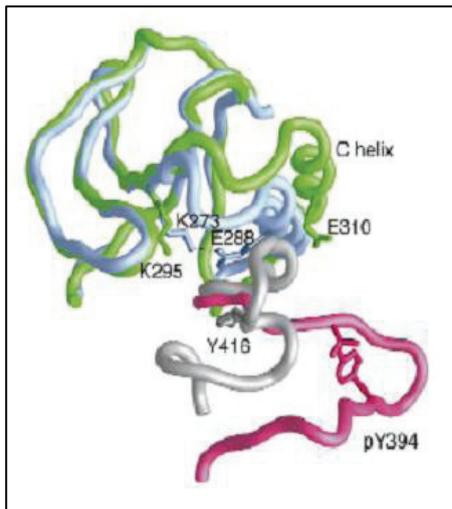


Abb. 3.3: Die α C-Helix als „An/Aus“-Schalter für Kinaseaktivität

Die *N*-lobes der inaktiven Src und der aktiven Lck sind hier superpositioniert. Src ist in hellgrün und grau markiert. Der N-terminale Lappen der Lck-Kinase ist in hellblauer Farbe und die Aktivierungsschleife mit dem phosphorylierten Y394 in Pink. Bei der Lck ist die Salzbrücke zwischen dem K273 und E288 ausgebildet. Die entsprechenden Reste in der Src sind K275 und E310. Abbildung aus Hubbard (1999).

Die Interaktion SH3-Linker hat zur Folge, dass die α C-Helix unproduktiv positioniert wird, d.h. keine Salzbrücke vorhanden ist. Die Bindung der SH2-Domäne an dem phosphorylierten C-Terminus wirkt dabei unterstützend auf die SH3-Linker-Interaktion. Aus der Kristallstruktur von Src [Xu et al., 1997] geht hervor, dass das Leu 255, welches zwei Reste C-terminal zum Pro-X-X-X-Motiv im Linker liegt, in eine hydrophobe Spalte auf der Rückseite des N-terminalen Kinaselappen hineinragt (s. Abb. 3.4).

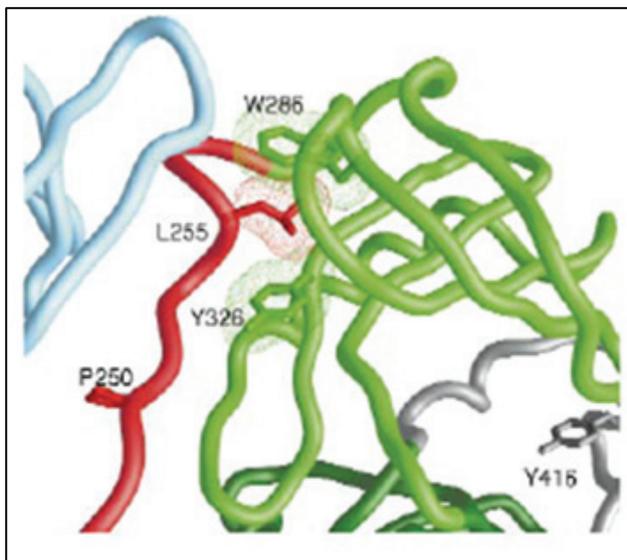


Abb. 3.4: Die Interaktion des Linkers mit der Src-Kinase

Das Bild zeigt eine Nahaufnahme der Interaktion zwischen dem L255 des SH2-Kinase-Linkers und dem N-terminale Lappen der Src-Kinase. L255 ist zwischen dem W285 und Y326 des *N*-lobes der Kinase fest verankert. (Rot: Linker; Grün: *N*-lobe der Kinasedomäne; Blau: SH3-Domäne; Grau: Aktivierungsschleife mit Y416). Abbildung aus Hubbard (1999).

Die Hydrophobizität an der Position 255 ist ebenso wie die hydrophobe Spalte im *N-lobe* bei den Src-Kinasen konserviert. Gonfloni et al. (1999) haben das Leu 255 zu verschiedenen, kleineren hydrophoben Resten mutiert und überprüft, ob diese Mutanten weiterhin durch die Csk-Phosphorylierung an Tyr 527 negativ reguliert werden können. Die Autoren fanden, dass die Mutation zu Alanin oder Valin zu einer kompletten Deregulation der Src-Kinase führt; sie war konstitutiv aktiv. Weiterhin zeigten sie, dass die Src-L255V-Mutante eine geringere Zugänglichkeit der SH3-Domäne zur Kinasedomäne aufweist als die Mutante, in der das Pro des Pro-X-X-X-Motivs im Linker durch ein Glycin substituiert ist. Die L255V-Mutante scheint also den Linker von der Kinasedomäne komplett zu entkoppeln, wobei die SH3-Linker-Interaktion größtenteils erhalten bleibt. Die Arbeit demonstrierte, dass das Leu 255 für die Bindung des Linkers an die Kinasedomäne notwendig ist.

3.3 Die Regulierung der CDK-Kinasen

Die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) spielen eine zentrale Rolle in der Koordination des eukaryotischen Zellzyklus [Morgan, 1997]. Ihre Aktivierung ist ein Zwei-Stufen-Prozess, welcher zum einen die Bindung an Cyclin benötigt und zusätzlich noch die Phosphorylierung von der CDK-aktivierenden Kinase (CAK) an einem Threonin (Thr 160 in CDK2) im Aktivierungssegment. Die Cyclin-Bindung an die α C-Helix, oder hier auch PSTAIRE-Helix genannt, wird benötigt, damit die autoinhibitorischen Wechselwirkungen der Helix mit dem Aktivierungssegment aufgebrochen werden und die Helix in die für Katalyse korrekte Position gestoßen wird [Jeffrey et al., 1995]. pCDK2 im Komplex mit Cyclin A zum Beispiel wird aktiv, wenn die Zelle die S-Phase im Zellzyklus betritt. Der Komplex phosphoryliert dann „*downstream*“ Targets, die u.a. die Tumorsuppressor-Proteine pRb (Retinablastoma-Protein) und das verwandte p107 einschließen. Aber auch andere Proteine, welche die Transkription und Replikation der DNA regulieren sind Substrate der CDK2.

Außer dem Ablauf des Zellzyklus zu koordinieren, müssen die CDKs wachstumsregulierende Signale, die den Zellzyklus betreffen, empfangen und integrieren können. Diese Signale kontrollieren den Zellzyklus dadurch, dass sie die CDKs wie Schalter an- oder ausstellen. Beispielsweise bewirken extrazelluläre Wachstumsfaktoren eine Signalweiterleitung über Rezeptortyrosinkinasen, Ras und den MAP Kinase-Weg, die zur Induktion von CyclinD, einem Aktivator der CDK4/6, führt [Hunter und Pines, 1994]. Die meisten anti-proliferativen Signale führen zur Expression von CDK-Inhibitoren, von welchen es zwei Familien gibt, die Kip/Cip- und INK4-Proteine. Die Abbildung 3.5 veranschaulicht die Wirkungsweise dieser Inhibitoren.

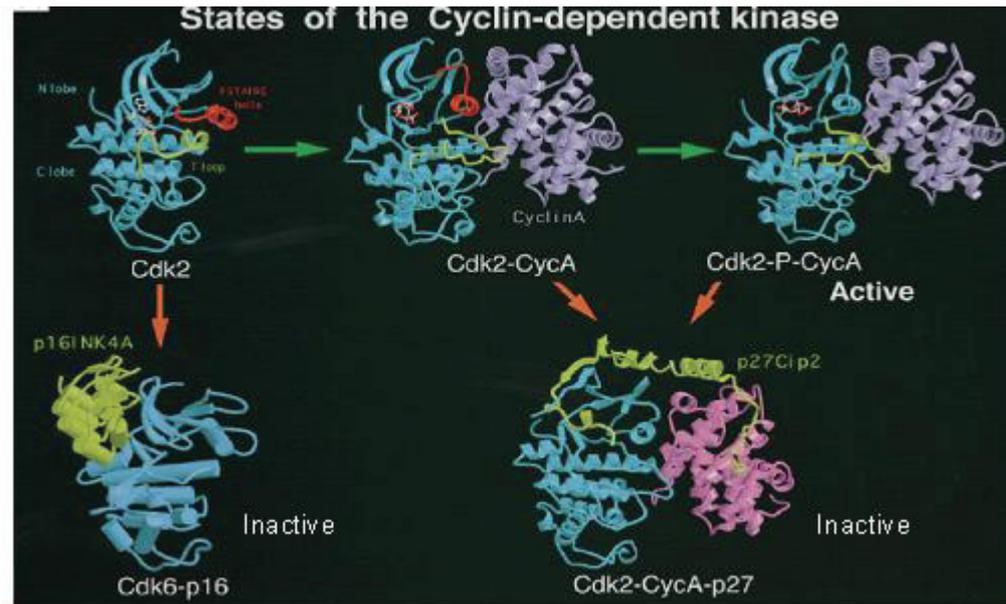


Abb. 3.5: CDKs werden auf molekularer Ebene über verschiedene Mechanismen reguliert

Es sind folgende CDK-Strukturen zu sehen: nicht-aktivierte CDK2, partiell-aktiver CDK-CycA Komplex, voll aktivierte phosphorylierte CDK2-P-Cyc2, inhibierter Zustand CDK2-CycA-p27 und nicht-aktivierbarer Zustand CDK6-p16. Die PSTAIRE-Helix ist in Rot und der T-loop (Aktivierungsschleife) in Gelb markiert. Die Phosphatgruppe ist durch einen gelben Ball angedeutet. ATP ist als *ball-and-stick*-Modell dargestellt. Abbildung modifiziert nach Pavletich (1999).

Der unterschiedliche Wirkungsmechanismus soll im Folgenden anhand zweier Vertreter dieser Klassen kurz erläutert werden. $p27^{KIP1}$ interagiert gleichzeitig mit Cyclin A und mit der CDK2, wie in Abb. 3.5 gezeigt. Die N-terminale, inhibitorische Domäne des $p27^{KIP1}$ bindet dabei an die konservierte Cyclin-Box des Cyclins. Simultan interagiert $p27^{KIP1}$ mit der CDK2 so, dass die Konformation der Kinase in der *N-lobe* sich ändert und der Inhibitor sich in der katalytischen Spalte festsetzen kann. Dadurch wird eine Phosphorylierung der Zielproteine blockiert.

In Gegensatz dazu bindet $p16^{INK4a}$ an die CDK6-Kinase in der Nähe der katalytischen Spalte, und zwar diametral entgegengesetzt der Region, die mit dem Cyclin D interagiert. Die Interaktion des $p16^{INK4a}$ erstreckt sich über beide Lappen der Kinase, wodurch eine durchgehende Bindefläche entsteht (s. Abb. 3.5). Die INK4- und Cyclin-Bindestellen überlappen sich also nicht, und das ist der Grund dafür, dass die INK4-Proteine CDK-Cyclin-Komplexe ohne die vorherige Dissoziation von Cyclin binden können. $p16^{INK4}$ blockiert die Cyclin-Bindung aber indirekt; zum Teil durch allosterische Effekte, deren Wirkung sich über die ganze CDK-Kinase ausdehnt. Der Inhibitor verursacht eine Rotation der Kinaselappen zueinander, wodurch das aktive Zentrum beeinträchtigt und die α C-Helix verlagert wird. Die Konsequenz davon ist, dass Cyclin nicht mehr binden kann. Zusätzlich dazu wird die ATP-

Bindetasche deformiert, was zwar nicht zur einer vollständigen Eliminierung der Bindung von ATP führt, aber die Affinität der Kinase zu ATP deutlich senkt.

3.4 Regulation der Kinaseaktivität über die JM-Domäne

Einige Kinasen werden durch N-terminale Segmente reguliert, die nicht direkt auf das aktive Zentrum der Kinase wirken, sondern allein durch Konformationsänderungen die Aktivität beeinflussen. Die EphB2-Rezeptortyrosinkinase wird durch Phosphorylierungen innerhalb der Aktivierungsschleife und zweier konservierter Tyrosine in der Juxtamembran(JM)-Region, direkt N-terminal der Kinasedomäne gelegen, aktiviert. Mutagenese-Studien zeigten, dass das unphosphorylierte Juxtamembran-Segment als negativer Regulator auf die Aktivität der Kinase wirkt [Dodelet und Pasquale, 2000].

Die Kristallstruktur der unphosphorylierten EphB2-Kinase enthüllte, dass die JM-Region eine helikale Konformation einnimmt und unmittelbar auf den *N-lobe* der Kinase einwirkt, wodurch eine katalytisch inaktive Kinasekonformation stabilisiert wird [Wybenga-Groot et al., 2001]. Die α C-Helix ist geknickt und näher zu den β -Faltblättern des *N-lobes* hin gerichtet, wo sie in Kontakt mit der Glycin-reichen Schleife kommt und dadurch eine korrekte Bindung des Nukleotids behindert wird. Gleichzeitig hindert die JM-Region die Aktivierungsschleife daran, eine aktive Konformation einzunehmen (s. Abb. 3.6).

Der Typ-I TGF β -Rezeptor (T β R-I), eine Serin-/Threoninkinase, wird ebenfalls durch Phosphorylierung im N-Terminus aktiviert. Dieses regulatorische Segment, genannt GS-Region, beinhaltet das hoch konservierte TTSGSGSG-Motiv. Um das Enzym voll zu aktivieren, müssen 3-4 dieser Serine bzw. Threonine phosphoryliert sein [Wieser et al., 1995].

Die unphosphorylierte GS-Region inhibiert die Kinaseaktivität von T β R-I aber nur im Komplex mit dem Protein *FK506-binding protein*, FKBP12 [Huse et al., 2001]. Die GS-Region formt eine Helix-Loop-Helix-Struktur, in der die Phosphorylierungsstellen sich im Loop (GS-Loop) befinden. Solange die GS-Region an FKBP12 gebunden ist, adoptiert der GS-Loop eine geordnete Konformation und ist so positioniert, dass der *N-lobe* der Kinase eine verdrehte, inaktive Konformation behält. Die α C-Helix ist hierbei von den β -Faltblättern an ihrem C-Terminus weggedrängt und mit ihrem N-Terminus fester an den *N-lobe* gedrückt (s. Abb. 3.6).

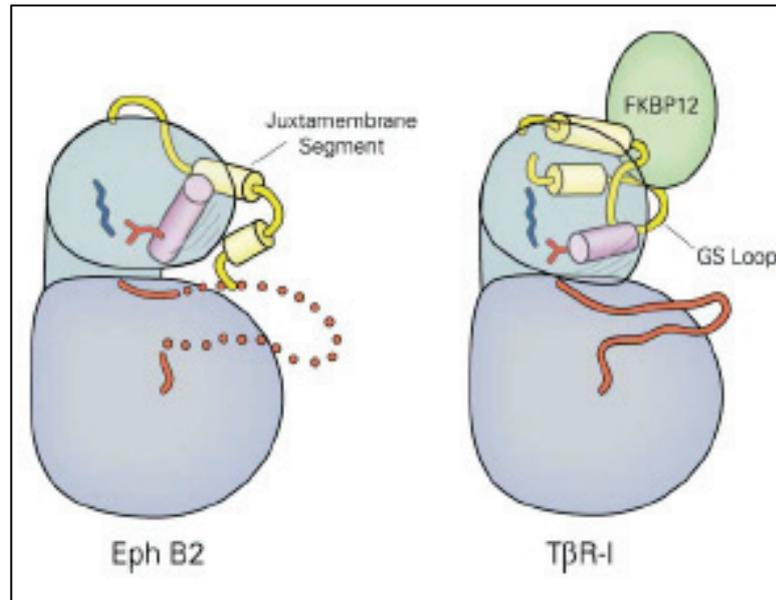


Abb. 3.6: Die Regulation von Rezeptorkinasen durch die Juxtamembran-Region

EphB2 und TβR-I sind schematisch dargestellt mit den JM-Segmenten in gelb. Im unphosphorylierten Zustand nimmt die JM-Region von EphB2 eine helikale Struktur ein, welche die α C-Helix und die Aktivierungsschleife daran hindert, eine aktive Konformation wahrzunehmen. Das unphosphorylierte JM-Segment von TβR-I (GS-Region) sorgt für eine Aufrechterhaltung des inaktiven Zustands des *N-lobe* der Kinase, aber nur in Kombination mit dem inhibitorischen FKBP12-Protein (Abb. aus Huse und Kuriyan, 2002).

Wie beim EphB2-Rezeptor führen diese Konformationsänderungen dazu, dass eine produktive Bindung von ATP verhindert wird. Bei Abwesenheit von FKBP12 wird der GS-Loop flexibel und nimmt nicht länger eine inhibitorische Form an [Huse et al., 2001].

Die N-terminalen Segmente von EphB2 und TβR-I wandeln sich nach Phosphorylierung zu Bindestellen ihrer jeweiligen physiologischen Substrate. EphB2 interagiert mit einer Reihe von SH2-Domänen via den phosphorylierten Juxtamembran-Tyrosinen [Wybenga-Groot et al., 2001]. In der inaktiven Konformation der Kinase bleiben diese Bindestellen aber noch verdeckt. Im Falle des TβR-I führt die Phosphorylierung der GS-Region ebenfalls zur Bildung von Interaktionsorten für Substrate der Smad-Proteinfamilie und zugleich zur Aufhebung der Bindung von FKBP12 [Huse et al., 2001].

Bei den c-Kit- und PDGF-Rezeptoren spielen die JM-Domänen eine ähnliche duale Rolle [Wybenga-Groot et al., 2001]. Die Wichtigkeit der JM-Region bei der Regulation von Rezeptortyrosinkinasen wird mit dem Befund unterstrichen, dass mehrere Punktmutationen und Deletionen in der JM-Region von c-Kit, dem Rezeptor des Stammzellfaktors, assoziiert sind mit gastro-intestinalen Tumoren [Hirota et al., 1998]. Diese Mutationen, welche sich ausschließlich in der Nähe von zwei Tyrosinphosphorylierungsstellen in der JM-Region konzentrieren, wirken konstitutiv aktivierend.

Die JM-Region des Insulinrezeptors ist ca. 35 Aminosäuren lang und hat zwei Autophosphorylierungsstellen (Y965 und Y972, Nomenklatur nach Ebina et al., 1985). Das phosphorylierte Y965 ist offenbar in der Rezeptor-Endozytose beteiligt [Rajagopalan et al., 1991]. Das pY972 dagegen ist eine essentielle Bindestelle für die Phosphotyrosin-bindende (PTB)-Domäne von IRS-Proteinen und Shc [Gustafson et al., 1995]. Austausch dieser zwei Tyrosine zu Phenylalaninen führten zu keinem signifikanten Effekt auf die Autophosphorylierung des Rezeptors oder die Kinaseaktivität [Backer et al., 1990].

Somit reguliert die JM-Region des IR anscheinend nicht allein die Aktivität der Kinase wie beim EphB2-Rezeptor. Dennoch führt die Autophosphorylierung von den Tyrosinen Y965 und Y972 zu einer partiellen Aktivierung der Kinase [Cann et al., 1998]. Ein weiteres Tyrosin in der JM-Domäne des IR, Y984, welches fünf Reste vor Beginn der Kinasedomäne liegt, ist in der gesamten IR-Familie konserviert. Aber es ist keine Autophosphorylierungsstelle. Die Substitution dieses Tyrosins zu einem Phenylalanin in der löslichen, unphosphorylierten Kinase resultierte in einem vierfachen Anstieg der katalytischen Aktivität [Li et al., 2003]. Darüber hinaus führte ein Austausch an dieser Stelle zu einem Alanin im Insulinrezeptor zu einem substantiellen Anstieg der basalen und Insulin-stimulierten Phosphorylierung. Kristallographische Untersuchungen weisen auf einen autoinhibitorischen Mechanismus des Y984 hin, wobei das Y984 zum Teil in der Positionierung der α C-Helix im *N-lobe* involviert ist [Li et al., 2003]. Vor Autophosphorylierung in der Aktivierungsschleife füllt das Y984 eine Tasche zwischen α C-Helix und den N-terminalen β -Faltblättern (s. Abb. 3.7 a), wodurch wahrscheinlich die α C-Helix gehindert ist, eine Schlüssel-Bewegung Richtung des *C-lobes* der Kinase auszuführen. Solch eine Bewegung wird aber benötigt, um die Lys 1030 – Glu 1047 Salzbrücke zu formieren, die notwendig für die Koordination von ATP ist (s. Abb. 3.7 b).

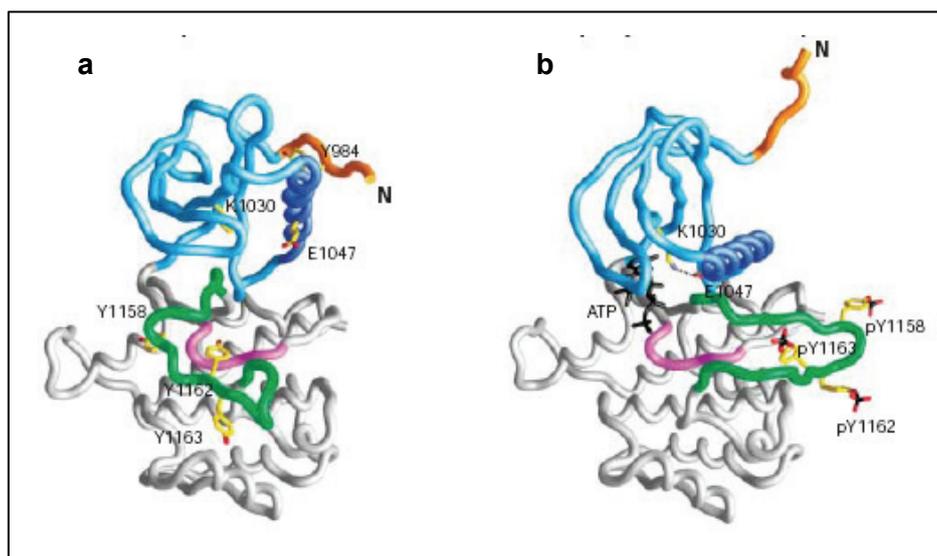


Abb. 3.7: Die Autoinhibition im Insulinrezeptor über die Juxtamembran-Domäne

Zu sehen sind die Kristallstrukturen des unphosphorylierten Insulinrezeptor (a) und phosphorylierten Rezeptors (b). Die JM-Domäne ist in Orange, der *N-lobe* der Kinase ist in Hellblau mit der α C-Helix in Dunkelblau, der *C-lobe* der Kinase ist grau hinterlegt, mit der Aktivierungsschleife in Grün und der katalytischen Schleife in Lila. Die Konformationen des *N-lobe* mit der JM-Domäne und der α C-Helix sowie die der Aktivierungsschleife unterscheiden sich drastisch zwischen inaktiven und aktiven Zustand (Abb. aus Hubbard, 2001).

Aus den Kristallstrukturen der Kinasedomänen des FGF-Rezeptor I [Mohammadi et al., 1996], EphB2-Rezeptor [Wyngenta-Groot et al., 2001] und des FLT3-Rezeptors [Griffith et al., 2004] geht hervor, dass ein Tyrosin oder ein anderer hydrophober Rest der Kinaseproximalen JM-Region in einer ähnlichen Weise wie Y984 die Kluft zwischen der α C-Helix und den β -Faltblättern ausfüllt. Diese Tatsache weist auf einen allgemeinen autoinhibitorischen Mechanismus in diesen Rezeptortyrosinkinasen hin. Diese Hypothese unterstützend führt eine Substitution des Y557 im PDGF-Rezeptor β , das dieselben Kontakte in der α C- β -Faltblatt-Spalte ausbildet wie das Y984 des IR, zu einem erhöhten basalen Level an Phosphorylierung [Irusta et al., 2002].

3.5 Die Regulation bei der IR/IGFR-Kinase und Fragestellung

Die lösliche, monomere Kinasedomäne des IR (IRKD) und IGFR (IGFKD) gelten als bevorzugte Modelle, um die molekularen Mechanismen der Kinaseaktivierung zu untersuchen. Nach dem „cis-Inhibitions/ trans-Aktivierungsmodell“ [Hubbard et al., 1998], abgeleitet aus der Röntgenstruktur der monomeren Kinasedomäne des IR, wird für die nichtphosphorylierte Kinase eine Autoinhibition postuliert. Dabei versperrt die Tyrosinautoposphorylierungsstelle Y1162 der Aktivierungsschleife im inaktiven Zustand der Kinase (0P) den Zugang von ATP/Mg²⁺ und Substrat, indem dieser Rest dem aktiven Zentrum zugewandt und durch Wasserstoffbrücken mit der katalytischen Base D1132 verbunden ist. Erst durch Phosphorylierung – in trans – dieses Restes, der zur Freigabe des aktiven Zentrums führt, wird die Inhibition aufgehoben und die Kinase aktiviert. Diese Hypothese wird durch die Kristallstruktur der (un)phosphorylierten Kinasedomäne unterstützt. (vgl. Abb. 3.7).

Die nichtphosphorylierte Kinase (0P) stellt dementsprechend ein Modell für die entsprechende Rezeptortyrosinkinase in Abwesenheit des Hormons dar, die nach Autophosphorylierung erfolgte Aktivierung der Kinase (3P) hingegen den Hormonstimulierten Rezeptor. Dieses Modell ist aber nicht frei von Widersprüchen:

1. Die Autoinhibition kann überwunden werden, wenn die monomere Kinase in der Autophosphorylierungsreaktion in hohen Konzentrationen ($> 10 \mu\text{M}$) eingesetzt wird [Schmolz, 2002]. Im IR und IGFR liegen außerdem konstitutive Dimere vor.
2. Generell wird angenommen, dass Hormon-induzierte Aktivierung von Wachstums-Hormonrezeptoren, wie z.B. der *epidermal growth factor receptor* (EGFR), durch Dimerisierung und anschließender Autophosphorylierung in *trans* erfolgt [Ullrich und Schlessinger, 1990]. Der EGFR benötigt aber nicht die Phosphorylierung in der Aktivierungsschleife, um aktiv zu sein, sondern es genügt Dimerisierung [Stamos et al., 2002].
3. Die Arbeit von Li et al. (2003) zeigt, dass in der Regulation der Kinase des IR Bereiche wie die Juxtamembran-Domäne eine entscheidende Rolle spielen.

3.5.1 Dimerisierung als erweiterter Mechanismus der IR/IGFR Kinase-Aktivierung

Vorherige Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass in der Aktivierungsschleife jeder Tyrosinrest gegen Phenylalanin ausgetauscht werden konnte, ohne dass es zur Beeinträchtigung der Phosphoryltransferaseaktivität kam [Noelle et al., 2000]. Es wurde deutlich, dass es bei der Aktivierung weniger auf eine festgelegte sequentielle Phosphorylierung der Aktivierungsschleife ankam [vgl. Wei et al., 1995], als vielmehr auf das Vorliegen einer genügend hohen Kinasekonzentration. Unterstützend für diese Hypothese war, dass die über GST-Fusion dimerisierten Kinasekonstrukte eine um den Faktor 100 gesteigerte Kinaseaktivität gegenüber den monomeren Kinasen aufwiesen [Baer et al., 2001]. Sie waren somit ein Modell für den aktivierten IR bzw. IGFR, ohne dass es der Phosphorylierung in der Aktivierungsschleife bedurfte. Ergebnisse aus Experimenten, in der die limitierte Proteolyse mit Trypsin angewendet wurde, enthüllten, dass bei den dimeren Kinasekonstrukten die Aktivierungsschleife exponiert ist [Baer et al., 2001].

3.5.2 Detektion möglicher Dimerisierungsdomänen

In unserer Arbeitsgruppe wurde die monomere Kinase des IGFR konzentrationsabhängig über Ultrazentrifugation untersucht (Rufer unveröffentlichte Versuche). Aus diesen Untersuchungen wurde eine Dimerisierungskonstante von $8\text{-}10 \mu\text{M}$ ermittelt. Dies ist in Übereinstimmung mit den Befunden der Röntgenstrukturanalyse der unphosphorylierten

Tyrosinkinase des IGFR [Munshi et al., 2002; Munshi et al., 2003], wo Dimere im Kristall gesehen wurden (s. Abb. 3.8).

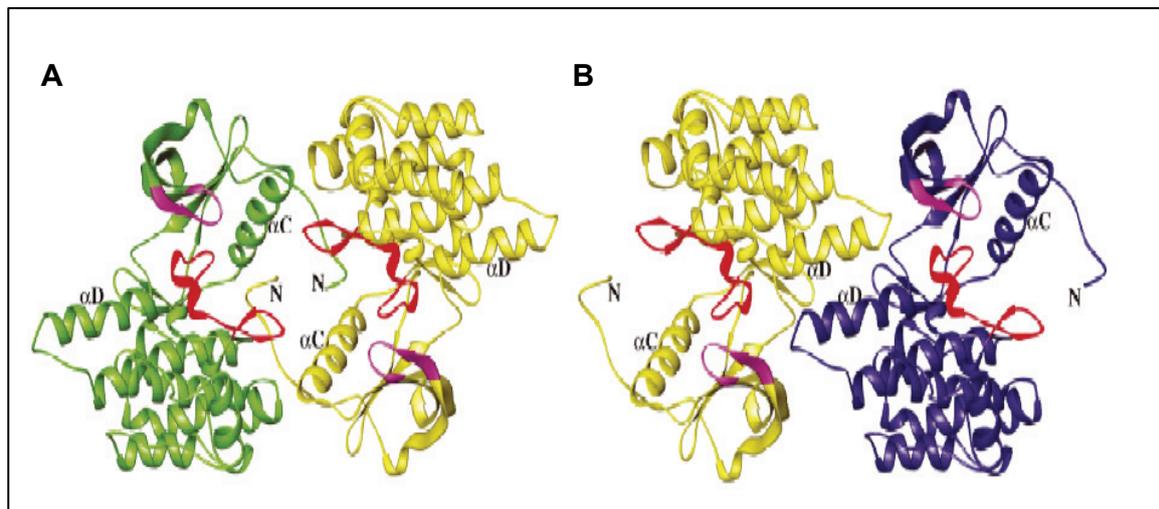


Abb. 3.8: Struktur der unphosphorylierten IGF-1 Rezeptorkinase (IGFKD*) und Dimerbildung *in vitro*

(A und B) Schleifendiagramm der IGFKD*-Dimere (AS 944-1264). Der phosphatbindende Loop (P-loop) ist in lila und die Aktivierungsschleife ist in rot gezeichnet. Nur die Doppelmutter mit den Austausch E1067A und E1069A in der *hinge region* resultierte in Kristallen mit einer Auflösung von 1.5 Å. IGFKD* assoziiert als Dimer über zwei Möglichkeiten. In der einen sind die aktiven Zentren zueinander gewandt (A). Bei der anderen ist es genau anders herum (B). Interessanterweise sind in beiden Dimeren die Juxtamembran-Domäne und α C-Helix sowie die *hinge region* mit der α D-Helix an der Dimerisierung beteiligt (Abb. aus Munshi et al., 2003).

Die Autoren sprechen zwar von einem „konzentrationsabhängiges Phänomen“ schließen aber eine physiologische Bedeutung der Dimerbildung auf Grund der großen Interaktionsflächen von 1500 Å (Abb. 3.8A) bzw. 800 Å (Abb. 3.8B), welche für ein reines Kristallartefakt ungewöhnlich groß sind, und anhand der Tatsache, dass der IGFR als konstitutives Dimer *in vivo* vorliegt, nicht aus. Des Weiteren sind wichtige regulatorische Regionen wie die Juxtamembran-Domäne, die α C- und α D-Helices sowie die Aktivierungsschleife an diesen Interaktionen beteiligt. Im Fall des vorderseitigen Dimers (Abb. 3.8A) z.B. kommt das Serin 952 in der Schleife, die das β -Faltblatt mit der α C-Helix verbindet, in engen Kontakt mit der Seitenkette des Phenylalanins 1124 aus der Aktivierungsschleife (DFG-Motiv). Zusätzlich interagiert der N-Terminus des einen Monomers mit zahlreichen Aminosäurenresten des anderen Monomers.

3.5.3 Fragestellung

In meiner Doktorarbeit sollten Mittel und Wege gefunden werden, mit denen eine spezifische Regulation von Kinasen ermöglicht wird. Als Untersuchungsobjekt standen mir die Kinasen des IR bzw. IGFR zur Verfügung. Eine Regulierung z.B. der IGFR-Kinase erscheint sinnvoll, da diese im aktivierten Zustand mit Onkogenese und Unterdrückung der Apoptose in Verbindung gebracht wird [Adams et al., 2000]. Anstatt eine Inhibition der Kinase über Konkurrenz mit ATP (ATP-Analoga) zu versuchen, sollte ich einen alternativen Ansatz etablieren. Dieser sah vor, die Dimerisierung der Kinasedomäne, welche ja mit Aktivierung einhergeht, zu hemmen. Als repräsentative Ziele für diese Inhibitoren, wie sie sich aus der Kristallstruktur offenbarten, sind zum einen die Juxtamembran-Domäne und die α C- und α D-Helices. Diese Regionen sind zwar unter den Proteinkinasen strukturell gesehen konserviert, aber in ihrer Aminosäurezusammensetzung sind sie einzigartig. Meine Annahme ist, dass dieser Umstand die Bereitstellung von spezifischen Interaktionsflächen in der Kinase, an denen selektiv Effektoren binden können, ermöglicht. Anhand der Wahl des Effektors sollte eine Regulierung sowohl zur Aktivitätssteigerung als auch zur Aktivitätssenkung der Kinase führen.

4 Ergebnisse

4.1 Die α D-Helix als neues Target für die Kinaseregulation

4.1.1 Inhibition der Kinase-Autophosphorylierung über die α D-Helix

Die bereits in der Einleitung erwähnte Regulierung der CDK-Kinasen über Inhibitoren, die entweder die CDK separat binden oder nur mit dem Komplex aus CDK und Cyclin interagieren (vgl. Abb. 3.5) findet man in dieser Form nicht bei den Tyrosinkinase.

Jedoch ist das Prinzip der Inhibition, die weder auf ATP- noch auf Substratkompetition beruht, sondern die konformationelle Plastizität einer Kinase ausnutzt durchweg in der gesamten Kinasefamilie zu finden.

Vor kurzem ist eine Arbeit über die Src-Kinase veröffentlicht worden, die genau diesen Sachverhalt beschreibt [Schulte und Sefton, 2003]. Die Autoren haben gefunden, dass das Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (WASP) eine Reihe von Kinasen der Src-Familie bindet und die Aktivität dieser Kinasen *in vivo* und *in vitro* signifikant hemmt. Unerwarteter Weise beruhte die beobachtete Interaktion nicht auf der Wechselwirkung zwischen der Prolinreichen Domäne von WASP und der SH3-Domäne der Src-Kinase, sondern fokussierte sich auf ein kleines Peptidfragment aus WASP (AS 81-94), welches zur katalytischen Kinasedomäne affin war. Durch die Bindung des Peptids wurde die Affinität der Src-Kinasen zu ATP und Substraten nicht beeinträchtigt. Hingegen wurde der V_{\max} in Substratphosphorylierung bei Bindung des Peptids drastisch reduziert.

WASP	81	KSY FIR LYGLQAGR	94
IR	1067	AHGDL KSY LR SLRPEAENN	1086
IGFR	1052	TRGDL KSY LR SLRPEMENN	1071

Abb. 4.1: Alignment der Aminosäuresequenz 81-94 aus WASP mit dem Insulin- (IR) und IGF-1-Rezeptor (IGFR)

Ausgehend von der Peptidsequenz des WASP 81-94 wurden die Sequenzen der Kinasen des IR bzw. IGFR miteinander verglichen (Nomenklatur nach Ullrich et al., 1986). Konservierte Reste sind fett hinterlegt und die strukturellen Bestandteile in der Kinase markiert.

Das in Abb. 4.1 gezeigte Alignment der Peptidsequenz von WASP (AS 81-94) mit den Kinasen des IR und IGFR hat gezeigt, dass eine sehr starke Identität zu der α D-Helix des C-terminalen Lappens besteht. Zusammen mit der *hinge region* bildet diese Helix das „Gelenk“ oder „Scharnier“ der Kinase und beeinflusst maßgeblich die Positionierung von N- und C-lobe der Kinase [Hubbard, 1997]. Auffällig ist auch, dass der IR und der IGFR in dieser Region bis auf eine Aminosäure an Position 1083 (IR: Ala) bzw. 1068 (IGFR: Met) nahezu identisch sind. Diese Konservierung verweist auf eine wichtige Rolle dieses Bereiches in der Kinaseregulation.

Dieser relevante Befund veranlasste mich dazu, ein Peptid zu synthetisieren, welches von dem entsprechenden Bereich der IR Kinase abgeleitet ist. Zusätzlich als Kontrolle wurde ein etwa gleichlanges Peptid mit einer randomisierten Sequenz nach der Vorgabe von Schulte und Sefton (2003) dargestellt:

αD-Peptid (IR 1071-1086)	LKSYLRSLRPEAENN
Kontrollpeptid	RLIGNLRFYASGFK

Beide Peptide wurden kommerziell von der Firma Thermo Electron GmbH (Ulm) bezogen. Als typischer Reinheitsgrad habe ich „immunograde“ gewählt, was schon an sich einer Reinheit von über > 50 % entsprach. Zusätzlich habe ich die Peptide über die *Reversed-phase*-HPLC noch weiter aufgereinigt (s. 7.8) und zur Applikation in Auto- und Substratphosphorylierungsreaktionen mit den Kinasen des IR bzw. IGFR angewendet.

Das Ergebnis der Autophosphorylierung in der N- und C-terminal deletierten, monomeren „Core“-Kinase des IGFR (IGFR-VK: V956-K1256), welche nur noch über die drei Autophosphorylierungsstellen der Aktivierungsschleife verfügt (Y1131/1135/1136), ist in Abb. 4.2 dargestellt. Deutlich ist zu sehen, dass in Anwesenheit des α D-Peptids die Autophosphorylierung (mit 10 mM ATP) der Kinase signifikant verzögert ist. Das Verhältnis Kinase zu Peptid betrug 1:50 [4,2 μ M : 210 μ M]. Sogar nach 60 min. ist der größte Kinaseanteil (> 70%) noch im unphosphorylierten Zustand und eine Tris-phosphorylierte Stufe, wie ohne Peptid zu sehen ist, wird nie erreicht. Es sei noch hinzugefügt, dass in sämtlichen Phosphorylierungsreaktionen, Auto- sowie Substratphosphorylierung, die Inkubation des α D-Peptids immer vor dem Phosphorylierungsstart erfolgte, und zwar für 45 min. bei 4°C.

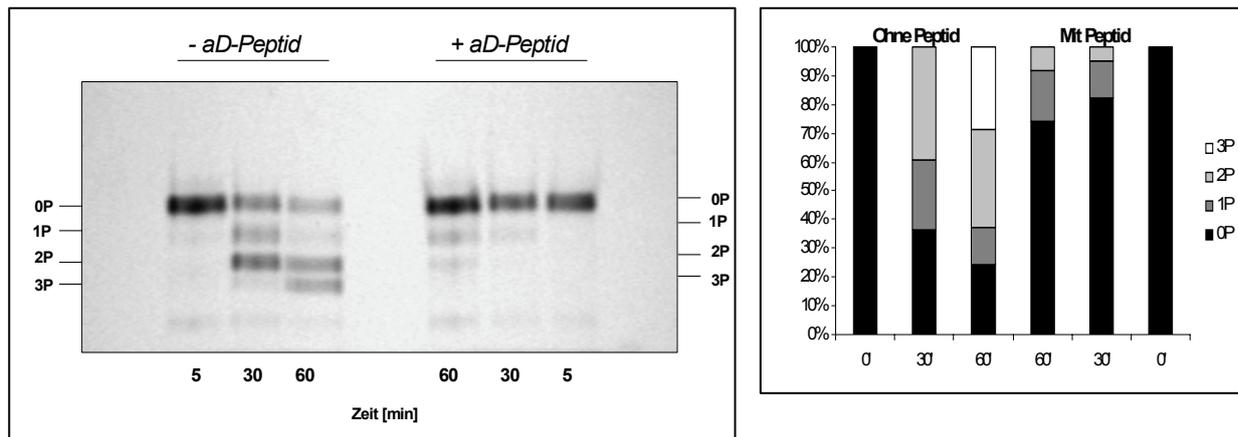


Abb. 4.2: Ergebnis der Autophosphorylierung der monomeren IGFR-VK Kinase \pm α D-Peptid dokumentiert über native PAGE

Aufgetragen sind die Zeitwerte 5, 30 und 60 min. ohne α D-Peptid und in Anwesenheit des α D-Peptids. Die Konzentration der Kinase betrug $4,2 \mu\text{M}$, und phosphoryliert wurde mit 30 mM Mg^{2+} und 10 mM ATP bei RT. Das α D-Peptid wurde in einer Konzentration von $210 \mu\text{M}$ eingesetzt, was einem Verhältnis von 1:50 entsprach. Die Inkubation mit dem Peptid erfolgte vor der Phosphorylierung bei 4°C und für 45 min. Die rechte Grafik zeigt die prozentuale Aufteilung der Autophosphorylierung über die Zeit mit den Phosphorylierungsstufen von 0 bis 3 (0P – 3P).

Das Kontrolleperiment, in dem ich anstelle des α D-Peptids das Kontrollpeptid verwendet habe, wies keine Inhibition der Autophosphorylierung der Kinase auf, wie in Abb. 4.3 zu sehen ist. Aber wie bereits Schulte und Sefton (2003) festgestellt haben, wirkt das Kontrollpeptid aktivierend auf die Autophosphorylierung. Bereits nach 30 min. wurde hier die Tris-Form erreicht.

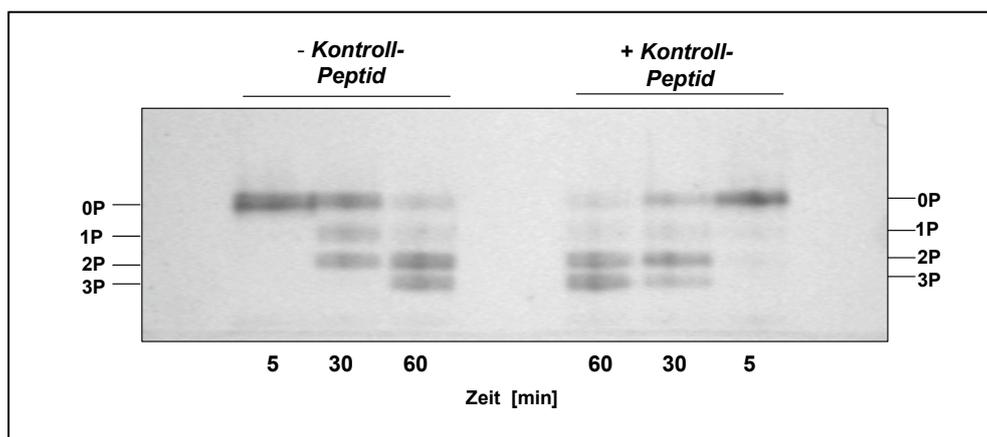


Abb. 4.3: Ergebnis der Autophosphorylierung der IGFR-VK Kinase \pm Kontrollpeptid dokumentiert über native PAGE:

Aufgetragen sind wieder die Zeitwerte 5, 30 und 60 min. mit und ohne Kontrollpeptid. Die Konzentration der Kinase betrug $4,2 \mu\text{M}$ und phosphoryliert wurde mit 30 mM Mg^{2+} und 10 mM ATP bei RT. Das Kontrollpeptid wurde auch in einem Verhältnis von 1:50 eingesetzt. Sichtbar sind die

Phosphorylierungsstufen von 0 bis 3 (0P – 3P). Die Inkubation mit dem Peptid erfolgte vor der Phosphorylierung bei 4°C und für 45 min.

4.1.2 Inhibition der Substratphosphorylierung der Kinase durch das α D-Peptid

Die nächste Frage, die sich nun stellte, war zu klären, ob dieser inhibitorische Einfluss des α D-Peptids sich auch in Substratphosphorylierungen bemerkbar macht. Dazu wurden die über GST dimerisierten Kinasen des IR bzw. IGFR [Baer et al., 2001] in einer Substratphosphorylierung mit einem Standardsubstrat für Tyrosinkinase, das polyGluTyr (einem Kopolymer bestehend aus Glutamat und Tyrosin im Verhältnis 4:1), mit und ohne Peptid untersucht (s. Abb. 4.4). Wie aus der Abbildung klar ersichtlich ist, reduziert die Anwesenheit des α D-Peptids den Phosphat-Transfer über 50% bei einer Konzentration von 25 μ M. Dagegen konnte ich keinen Unterschied feststellen, wenn das Kontrollpeptid in der Substratphosphorylierung eingesetzt wurde (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zur monomeren IGFR-VK Kinase wurde die Autophosphorylierung der GST-Kinasen durch das Peptid wenig oder überhaupt nicht beeinträchtigt (Daten nicht gezeigt).

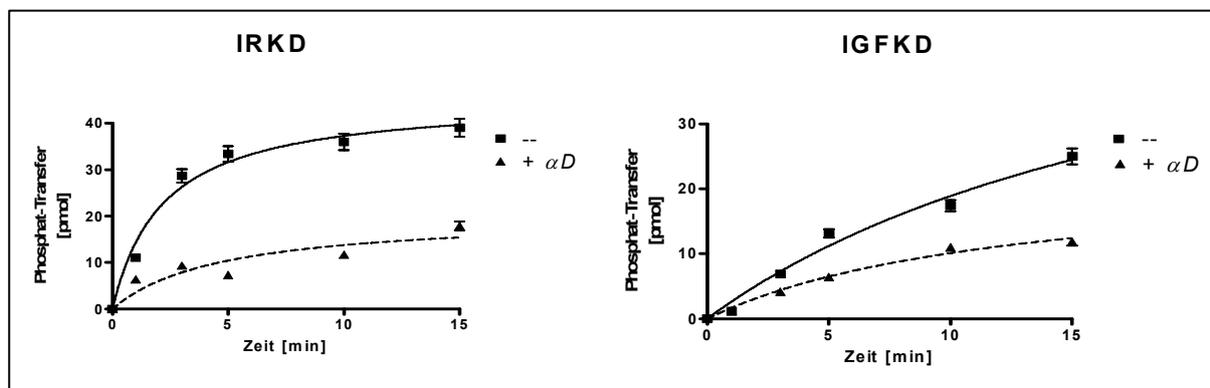


Abb. 4.4: Ergebnis der Substratphosphorylierung von polyGluTyr mit den dimeren Kinasen des IR und IGFR \pm α D-Peptid

Das Bild zeigt die Zeitverläufe (1, 3, 5, 10 und 15 min.) der Phosphorylierung von polyGluTyr [0,45 μ g/ μ l] via vorphosphorylierter GST-IRKD bzw. GST-IGFKD [0,05 μ M] +/- α D-Peptid [25 μ M] – 45 min. Vorinkubation bei 4°C. Phosphoryliert wurde mit 0,5 mM [γ - 32 P]ATP und 30 mM Mg $^{2+}$ bei RT. Die Auswertung der Proben erfolgte nach Bindung an P81 Kationenaustauscher-Papier (s. 7.9.2). Aufgetragen ist der Phosphat-Transfer [pmol] gegen die Zeit [min]. Deutlich ist die Senkung des Transfers (> 50 %) in Anwesenheit des α D-Peptids zu erkennen.

Die Spezifität des α D-Peptids in der inhibitorischen Wirkung habe ich überprüft, indem ich einen Vertreter der Serin/Threonin-Kinasefamilie, die Akt- oder auch PKB-Kinase (GST- Δ PH Akt2; Baer et al., 2005), in der Phosphorylierung untersucht habe. Als Substrat wählte ich die

Phosphotyrosin-bindende (PTB)- Domäne des IRS-1 (AS P158-N275) [Parvaresch, unveröffentlicht]. Das Resultat zeigt die Abbildung 4.5.

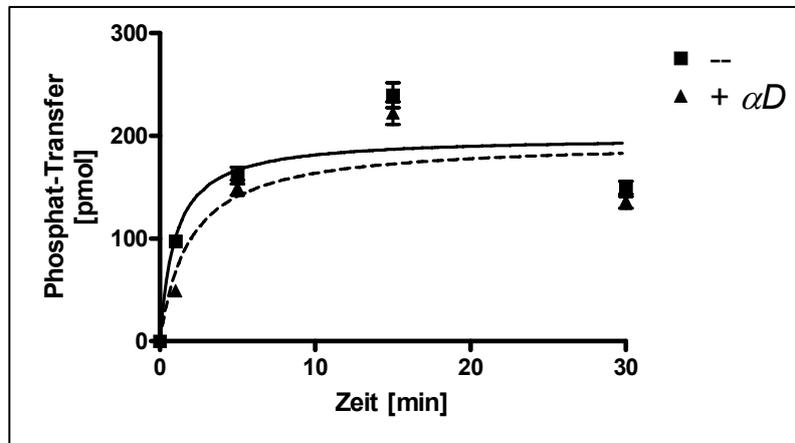


Abb. 4.5: Ergebnis der Substratphosphorylierung von GST-PTB mit der Akt-Kinase \pm αD -Peptid
Phosphoryliert wurde mit 1 mM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, 15 mM Mg^{2+} , 5 mM Glycerol-Phosphat, 0,2 mM NaVO_3 und 0,5 mM EGTA bei RT. Das Verhältnis von Akt-Kinase und dem Substrat GST-PTB betrug 1:40 [0,54:24 μM]. Das αD -Peptid wurde in Konzentration von 27 μM (1:50) eingesetzt und mit der Kinase bei 4°C für 45 min. vorinkubiert. Zu den Zeitpunkten 1, 5, 15, 30 und 45 min. wurden die Proben entnommen, über SDS-PAGE getrennt, eine Autoradiographie durchgeführt und der Transfer über Cerenkov-Messung der Gel-Banden bestimmt. Das αD -Peptid scheint keinen Einfluss auf die Aktivität der Akt-Kinase zu haben.

Tatsächlich wurde diesmal keine Inhibition beobachtet, wie im Fall der IRKD und IGFKD. Der Phosphat-Transfer ist nahezu identisch \pm αD -Peptid. Dieser Befund deutet auf eine sehr spezifische Wirkung des Peptids hin. Der nächste Versuch sollte den IC_{50} -Wert bestimmen, d.h. die Konzentration, bei der die halbmaximale Hemmung erreicht wird. Die Abb. 4.6 zeigt das Ergebnis.

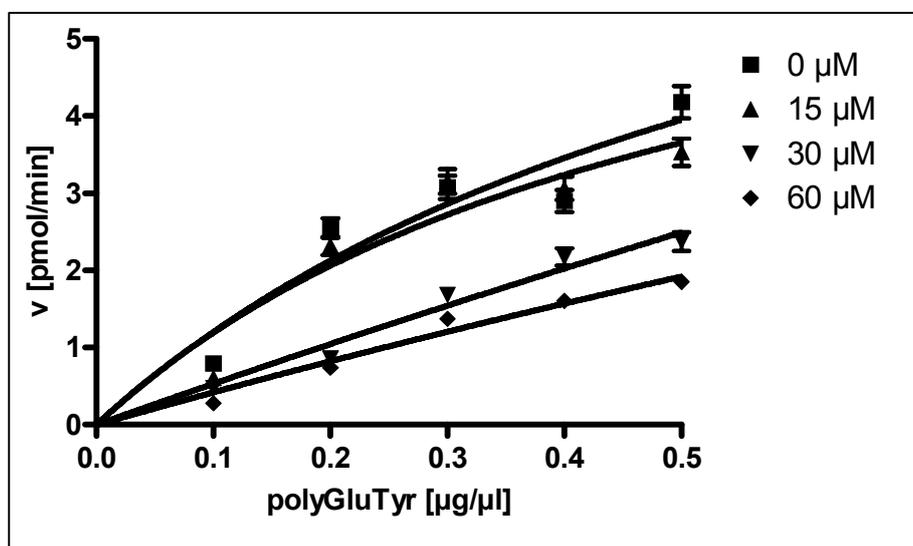


Abb. 4.6: Bestimmung des IC_{50} -Wertes für das α D-Peptid in Substratphosphorylierungen katalysiert von der Kinase GST-IRKD

Die Phosphorylierung wurde unter Standardbedingungen durchgeführt (vgl. 7.9.2). Dabei betrug die Konzentration der Kinase 0,2 μ M und die $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -Konz. 1 mM. Das Substrat (polyGluTyr) wurde zwischen 0,1-0,5 μ g/ μ l eingesetzt. Vor Reaktionsstart wurde das α D-Peptid in aufsteigender Konzentration mit der Kinase bei 4° und für 45 min. [0, 15, 30 und 60 μ M] vorinkubiert. Die Dauer der Phosphorylierung war 5 min. Auswertung erfolgte entsprechend 7.9.2. Bei einer Peptid-Konzentration von 30 μ M ist die Geschwindigkeit der Reaktion um 50 % reduziert.

Eingesetzt wurden die Mengen von 0,1 – 0,5 μ g/ μ l polyGluTyr, und als Katalysator diente wieder die dimere GST-IRKD [0,2 μ M]. Gleichzeitig wurde mit dem α D-Peptid in aufsteigenden Konzentrationen inkubiert [0 – 60 μ M]. Bei 15 μ M findet noch keine Verringerung der Geschwindigkeit statt, aber ab 30 μ M erreicht der Phosphateinbau pro Minute nur noch die Hälfte ($v = \sim 2$ pmol/min) bei maximaler Substratkonzentration. Somit liegt der IC_{50} -Wert in diesem μ M-Bereich.

4.1.3 Das α D-Peptid inhibiert nicht über einen kompetitiven Mechanismus

Die nächsten Schritte waren jetzt für mich, die Wirkungsweise des α D-Peptids aufzudecken. Wie würde der inhibitorische Mechanismus aussehen? Drei Möglichkeiten sind in Betracht zu ziehen: (1) Konkurrenz mit ATP, (2) Konkurrenz mit Substraten oder (3) ein nicht-kompetitiver Weg. Die nachfolgenden Experimente konnten die Möglichkeiten (1) und (2) ausschließen. Abb. 4.7 zeigt die Substratphosphorylierung von polyGluTyr bei unterschiedlichen ATP-Konzentration [80-800 μ M]. Als Kinase verwendete ich die dimere Kinase des IR (GST-IRKD). Die Anwesenheit des α D-Peptids führte nicht zu einer signifikanten Veränderung des K_M für ATP bei der Kinase. Er liegt bei 240 μ M (ohne Peptid) bzw. 155 μ M (mit Peptid).

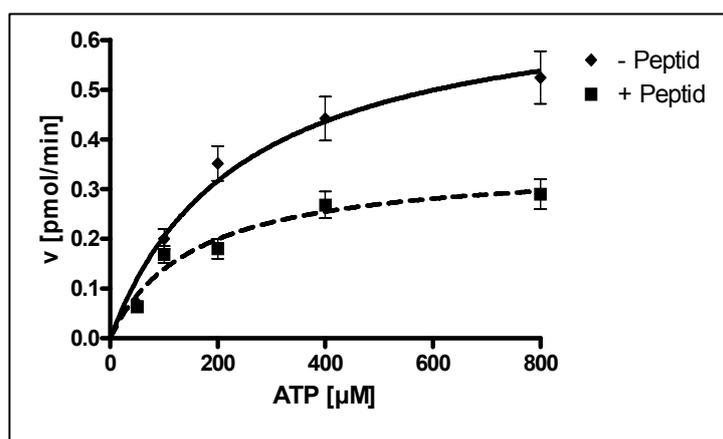
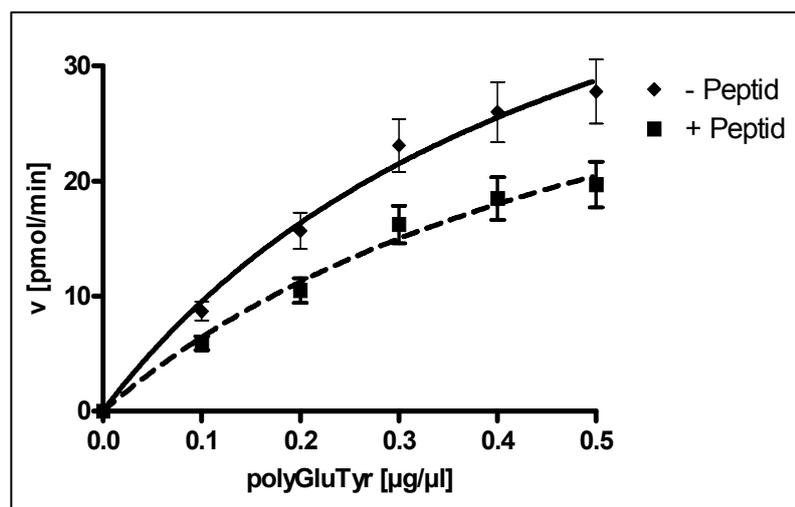


Abb. 4.7: Substratphosphorylierung von polyGluTyr durch GST-IRKD mit steigender ATP-Konzentration \pm α D-Peptid

Die Phosphorylierung fand unter Standardbedingungen statt (vgl. 7.9.2). Die Kinasekonzentration (GST-IRKD) lag bei 0,2 μ M und die Konzentration des Substrates zwischen 0,4-0,5 μ g/ μ l. [γ - 32 P]ATP wurde zu 50, 100, 200, 400 oder 800 μ M hinzugefügt. Die Konzentration des α D-Peptids betrug 30 μ M. Die Dauer der Phosphorylierung betrug 5 min. Die Auswertung erfolgte über Dot-Blot auf Phosphozellulose-Papier (s. 7.9.2). Der K_M ohne Peptid belief sich auf 240 μ M, mit Peptid war er leicht erniedrigt auf 155 μ M.

Ich machte einen vergleichbaren Versuch, diesmal mit verschiedenen Substratkonzentrationen. Dieser bewies, dass auch keine Kompetition des α D-Peptids mit polyGluTyr auftrat, sondern dass es zu einer generellen Erniedrigung des V_{max} der Reaktion kommt (s. Abb. 4.8). Da es auf Grund der weiten Spannweite des Molekulargewichtes (20 – 50 kDa) nicht möglich ist, die molare Konzentration zu bestimmen von polyGluTyr, ist die Menge an Substrat in μ g/ μ l angegeben.


Abb. 4.8: K_M -Bestimmung für polyGluTyr \pm α D-Peptid

Die Substratphosphorylierung wurde unter Standardbedingungen durchgeführt (vgl. 7.9.2). Dabei betrug die Konzentration der GST-IRKD Kinase 0,2 μ M und die [γ - 32 P]ATP-Konz. 1 mM. Das Substrat (polyGluTyr) wurde zwischen 0,1-0,5 μ g/ μ l eingesetzt. Vor Reaktionsstart wurde das α D-Peptid in der Konzentration von 30 μ M mit der Kinase bei 4° und für 45 min. vorinkubiert. Die Dauer der Phosphorylierung betrug 5 min. Auswertung erfolgte nach 7.9.2. Der K_M -Wert für polyGluTyr ist ohne Peptid bei 0,51 μ g/ μ l und mit Peptid bei 0,605 μ g/ μ l.

Wie bereits erwähnt, konnte ich keinen signifikanten Unterschied im K_M bei der Kinase feststellen. Der Wert lag bei 0,51 (ohne Peptid) bzw. 0,605 μ g polyGluTyr / μ l (mit Peptid).

In der Tabelle 4.1 sind die kinetischen Parameter der dimeren Kinasen des IR und IGFR in Anwesenheit des α D-Peptids in Substratphosphorylierungen zusammengefasst. Auch bei Verwendung der Kinase des IGFR als Katalysator war der gleiche inhibitorische Effekt des

Peptids zu beobachten. Der k_{cat} sinkt stets bei einer Peptidkonzentration von 30 μM um 50 %, und die Affinität der Kinasen zu ATP und Substrat wird nicht beeinträchtigt.

Tabelle 4.1 : Kinetische Parameter der dimeren IRKD und IGFKD +/- α D-Peptid

in Substratphosphorylierungen						
aD	k_{cat} [min^{-1}]		K_{M} ATP [μM]		K_{M} pEY [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	
	-	+	-	+	-	+
IRKD	53.33 \pm 5.3	24 \pm 2.4	241.6 \pm 24.2	155.1 \pm 15.5	0.51	0.6
IGFKD	33.33 \pm 3.3	16 \pm 1.6	n.a	n.a	n.a	n.a

IC₅₀ Peptid ~ 30 μM

4.1.4 Die Dimerisierung der Kinasedomäne wird durch das α D-Peptid beeinträchtigt

Diesen Resultaten nach konnte ich einen kompetitiven Mechanismus der Inhibition ausschließen. Das Peptid scheint, wie in der Arbeit von Schulte und Sefton (2003) beschrieben, an die Kinasedomäne zu binden und daraufhin die Aktivität der Kinase zu hemmen. Baer et al. (2001) haben gezeigt, dass die Aktivität erst durch Dimerisierung der Kinasedomänen induziert wird. Die über GST-dimerisierten Kinasen sind um den Faktor 100 aktiver als ihre monomeren Gegenstücke. Die monomeren Kinasen lassen sich aber schon durch eine Erhöhung der Konzentration maßgeblich in der Aktivität steigern. Aktivität geht also einher mit der Dimerisierung. Wenn nun das Peptid mit der Dimerisierung interferiert, dann wird damit auch die Aktivität der Kinase beeinträchtigt. Im nächsten Experiment wurde die Inhibition des α D-Peptids in einer bereits phosphorylierten, aktiven Kinase (pIGFR-VK) untersucht (Abb. 4.9). Vor der Inkubation mit dem Peptid wurde die Kinase unter geeigneten Bedingungen – hohe ATP- und Kinasekonzentrationen - größtenteils, d.h. 70-80%, (Tris-) autophosphoryliert, um eine maximale Aktivität zu gewährleisten. Wie im Säulendiagramm (Abb. 4.9) illustriert ist, wurde die inhibitorische Wirkung des α D-Peptids in der Substratphosphorylierung von polyGluTyr aufgehoben.

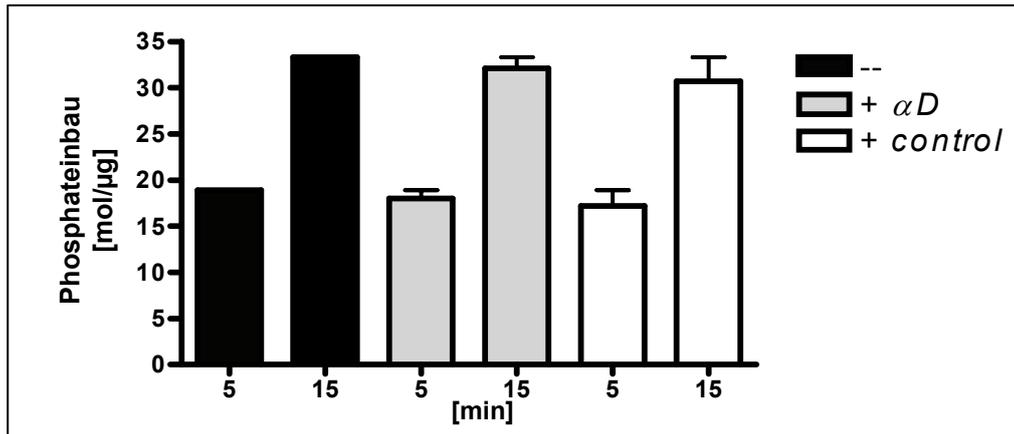


Abb. 4.9: Substratphosphorylierung von polyGluTyr mit aktivierter pIGFR-VK ohne Peptid, mit dem α D- und dem Kontrollpeptid

Die Kinase IGFR-VK [10 μ M] wurde mit 10 mM ATP und 30 mM Mg^{2+} für 10 min. vorphosphoryliert. Danach wurde die pIGFR-VK verdünnt auf 0,5 μ M und ohne Peptid, mit dem α D-Peptid und dem Kontrollpeptid [je 200 μ M] für 45 min. bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Standardsubstrat polyGluTyr [0,45 μ g/ μ l] phosphoryliert mit 1 mM [γ - 32 P]ATP und bei 5 und 15 min. eine Probe entnommen. Auswertung erfolgte über den P81-Assay (vgl. 7.9.2). In allen drei Fällen ist der Phosphateinbau gleich und eine Inhibition war nicht detektierbar.

Das Peptid entfaltet seine inhibitorische Wirkung also nur im Dimerisierungs- bzw. Aktivierungsprozess der Kinase. Die Bindung des Peptids muss auch an separater Stelle außerhalb der polyGluTyr-Binderegion erfolgen. Wenn man aber nun anstelle des polyGluTyr ein anderes Substrat in einem vergleichbaren Versuch verwendet, ist die Inhibition durch das Peptid wieder hergestellt (Abb. 4.10). Als Substrat habe ich hier die inaktive Kinasemutante (IRKD-D/A) benutzt, welche durch einen Austausch des katalytischen Aspartats 1120 zu Alanin keine katalytische Aktivität mehr besitzt [Corona, 1999]. Dieses Substrat beinhaltet mehrere Phosphorylierungsstellen und ist im Gegensatz zum Katalysator nicht deletiert, sondern erstreckt sich über den ganzen Bereich der Kinase (R941-S1343). Bevor aber das inaktive Enzym als Substrat bedient werden kann, muss eine vorherige produktive Dimerisierung erfolgen. Mit der Zusetzung des α D-Peptid in steigender Konzentration bei der Substratphosphorylierung von IRKD-D/A, stieg die Inhibition der Kinaseaktivität proportional an (s. Abb. 4.10).

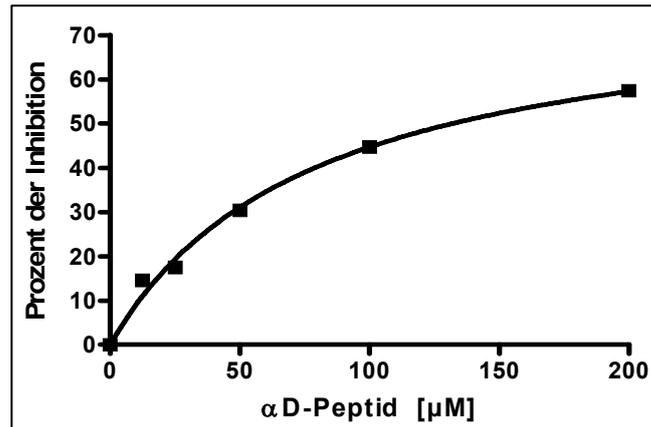


Abb. 4.10: Das α D-Peptid interferiert mit der Kinasedimerisierung

Die Kinase (pIGFR-VK) wurde wie oben beschrieben hergestellt (vgl. Abb. 4.9), auf 25 nM in der Reaktion herunterverdünnt. Als Substrat diente die inaktive Kinasemutante IRKD-D/A in einer Konzentration von 7,5 μ M. Zusammen mit Katalysator und Substrat wurde das Peptid in aufsteigenden Mengen [0 – 200 μ M] dazu pipettiert und vor dem Phosphorylierungsbeginn für 45 min. bei 4°C inkubiert. Die Phosphorylierung erfolgte dann für 15 min. unter 1 mM [γ - 32 P]ATP und 30 mM Mg^{2+} . Anschließend folgte eine Trennung über SDS-PAGE, Autoradiographie des Gels und Cerenkov-Zählung der ausgeschnittenen Banden. Mit steigender Peptidkonzentration wird auch die Inhibition verstärkt.

Der IC_{50} -Wert lag jetzt mit ca. 150 μ M deutlich höher, als vorherige Experimente mit der nicht vorphosphorylierten Kinase ermittelt haben.

4.1.5 Die Inhibitionsstärke des α D-Peptids ist über die Sequenz modulierbar

Es wurden auch die Peptide WASP 81-94, α D-IGFKD-EE/AA und das Original α D-Peptid in der Effizienz der Inhibition bei der Autophosphorylierung der IGFR-VK Kinase verglichen.

WASP 81-94 entspricht der Sequenz, die von Schulte und Sefton (2003) als die Src-Kinase bindende und inhibierende Region identifiziert worden ist. Das α D-IGFKD-EE/AA-Peptid leitet sich aus der Sequenz der IGFR-Kinase 1056-1071 (s. Abb. 4.1) ab, wobei die Glutamate 1067 und 1069 durch Alanine ausgetauscht worden sind. Diese Doppelmutation führte bei Munshi et al. (2003) zu einer Versteifung der α D-Helix und damit der *hinge region*, die sich ansonsten höchst flexibel und plastisch verhält, und hatte eine Kristallstruktur der IGFR-Kinase in einer Auflösung von 1,5 Å ergeben. Die Abbildung 4.11 zeigt, dass sich die drei Peptide in der Autophosphorylierung der Kinase in ihrer Inhibitionsstärke geringfügig

unterscheiden. Am stärksten wirkt das IGFR α D-Peptid, da hier über 70 % der Kinase noch unphosphoryliert ist und der Anteil der Bis-Form mit 5,5 % am kleinsten ist.

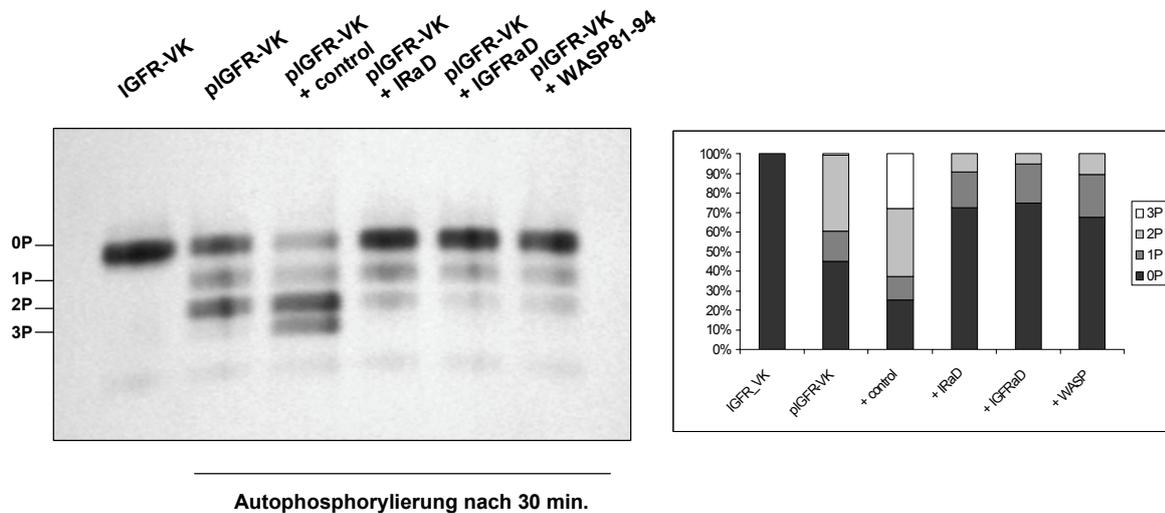


Abb. 4.11: Ergebnis der Autophosphorylierung der IGFR-VK Kinase \pm verschiedenen Peptiden dokumentiert über native PAGE

Die Autophosphorylierung fand mit einer Kinasekonzentration von 4,2 μ M und 30 mM Mg²⁺ und 10 mM ATP bei RT für 30 min. statt. Die Peptide (Kontrolle, IR α D, IGFR α D und WASP 81-94) wurden in einer Konzentration von 210 μ M eingesetzt, was einem Verhältnis von 1:50 entsprach. Die Inkubation mit dem jeweiligen Peptid erfolgte vor der Phosphorylierung bei 4°C und für 45 min. Die rechte Grafik zeigt die prozentuale Aufteilung der Autophosphorylierung nach 30 min. mit den Phosphorylierungsstufen von 0 bis 3 (0P – 3P).

Das Peptid WASP 81-94 ist mit 11 % Bis-Phosphorylierung der schwächste Inhibitor und dazwischen liegt das IR α D-Peptid mit 9,5 % Anteil an der 2P-Form. Wieder sieht man eine Aktivierung der Kinase über das Kontrollpeptid. Hier wird bereits die Tris-phosphorylierte Form nach 30 min. erreicht.

4.2 Darstellung und Charakterisierung der R1092Q-Kinase

Die α D-Helix mit der anschließenden *hinge region* wird in der Literatur als eine für Substraterkennung und wahrscheinlich auch Substratbindung essentielle Region beschrieben [Hubbard, 1997; Lee et al., 2003]. Besonders einem Rest, dem Arginin 1092 kommt da besondere Bedeutung zu (s. Abb. 4.12). Im Folgenden wird die Nomenklatur nach Ebina et al. (1985) übernommen, um eine einfache Abgleichung mit der Literatur zu ermöglichen. Für die Umformung in die Ullrich-Nomenklatur muss mit 12 subtrahiert werden. Substrate des IR und anderer Tyrosinkinase haben oft N-terminal zum Akzeptor-Tyrosin ein oder mehrere saure Reste [Hunter, 1982]. Der basische Cluster, bestehend aus K1085, R1089 und R1092, könnte dabei eine Rolle bei der Erkennung von Substraten mit sauren Resten in den Positionen P-3 und P-4 spielen [Hubbard, 1997].

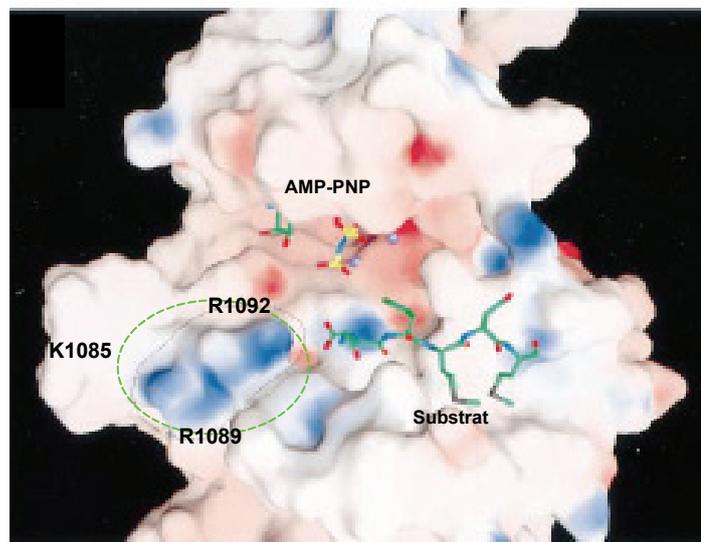


Abb. 4.12: Modell der Substraterkennung mithilfe der α D-Helix/*hinge region* (abgeändert nach Hubbard 1997)

Gesamtansicht der Bindung des Substratpeptids und des ATP-Analogons AMP-PNP an die IR Kinase. Das Peptid ist abgeleitet aus einer putativen Phosphorylierungsstelle Y727 des IRS-1 [Sun et al., 1991]. Die Oberfläche der Kinase ist entsprechend des elektrostatischen Potentials angefärbt: positiv in blau, negativ in rot und neutral in weiß. Der in grün eingekreiste Bereich stellt den basischen Cluster aus den Resten K1085, R1089 und R1092 dar.

In mehreren Arbeiten ist eine Punktmutation an der Stelle Arginin 1092 zu einem Tryptophan oder Glutamin beschrieben, die zu einer schweren Form der Insulinresistenz, dem „*Leprechaunismus*“, führt [Desbois-Mouthon et al. 1996; Takahashi et al. 1997]. Diese Mutation führte zu einer drastischen Reduktion der Kinaseaktivität und einer kaum gesteigerte Phosphorylierung von IRS-1 nach Insulin-Stimulierung über den basalen Status

hinaus. Die Folge daraus waren schwere Defekte *in vivo* im Insulin-stimulierten Glukose-Transport, in der Glykogen-Synthese und DNA-Synthese.

4.2.1 Konstruktion und Expression der Kinase GST-IRKΔ72C-R1092Q

Um die Ursachen dieser Defekte *in vitro* näher untersuchen zu können, habe ich die Kinasemutante R1092Q über ortsgerichtete Mutagenese hergestellt (s. 7.3). Als Ausgangsvektor diente das Konstrukt pAc-GST-IRKΔ72C. Dieses Kinasekonstrukt umfasst die Aminosäuren R953-K1283 der Kinasedomäne und ist N-terminal mit GST fusioniert [Rogon, 2004].

Die Überprüfung des mutierten Vektors erfolgte über Restriktionsenzymspaltung und Sequenzierung (Daten nicht gezeigt). Mit dem verifizierten Vektor pAc-GST-IRKΔ72C-R1092Q wurden *Sf9*-Zellen transfiziert und über das Baculovirus-Expressionssystem erfolgte die Expression der Kinase für 48 h. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die Zellpellets lysiert (s. 7.7).

Die Kinase GST-IRKΔ72C-R1092Q wurde über die Gluthation-Sepharose-Affinitätschromatographie aufgereinigt (s. 7.4). In Abbildung 4.13 ist die Aufreinigung per 12%iger SDS-PAGE dokumentiert. Aufgetragen wurden das Kinase enthaltende Lysat, welches über die Affinitätsmatrix gegeben wurde; der Durchlauf; die einzelnen Waschfraktionen; sowie eine Eluatfraktion. Im Eluat (E) ist deutlich die Kinasebande in hoher Reinheit bei ca. 64 kDa zu erkennen. Die Eluate wurden nach Vereinigung mit 50 mM Tris (pH 7,5) gewaschen und über Ultrafiltration auf 2 µg/µl konzentriert.

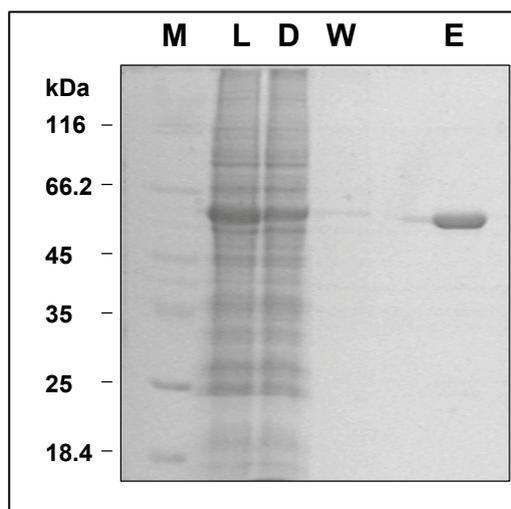


Abb. 4.13: Reinigungsverlauf der GST-IRKΔ72C-R1092Q in der Affinitätschromatographie

Es wurden folgende Proben aufgetragen: M = Marker; L = Lysat; D= Durchlauf; W = 3. Waschschrift mit 1xPBS; E= Eluat GST-IRKΔ72C-R1092Q

Die Kinase (ca. 64 kDa) liegt bereits nach einer Reinigung hochrein vor (> 95 %). Dokumentiert wurde über eine 12%ige SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung.

4.2.2 Die Autophosphorylierung der R1092Q-Kinase ist *in vitro* beeinträchtigt

Als erstes habe ich die Kinasemutante mit dem Wildtyp in der Autophosphorylierung verglichen und mehrere Unterschiede feststellen können (s. Abb. 4.14).

Beide Kinasen weisen unterschiedliche Initialgeschwindigkeiten auf. Der Wildtyp hat eine v_i von 2,5 mol Phosphat/min * mol Kinase, während die Mutante nur die Hälfte mit 1,3 mol Phosphat/min*mol Kinase erreicht. Auch beträgt der maximale Phosphateinbau mit ca. 1,06 mol Phosphat/mol bei der R1092Q-Mutante nur etwa 40 % des Wertes beim Wildtyp (~ 2,5 mol/mol). Damit konnte ich die in der Literatur beschriebene Aktivitätsminderung bestätigen [vgl. Takahashi et al., 1997].

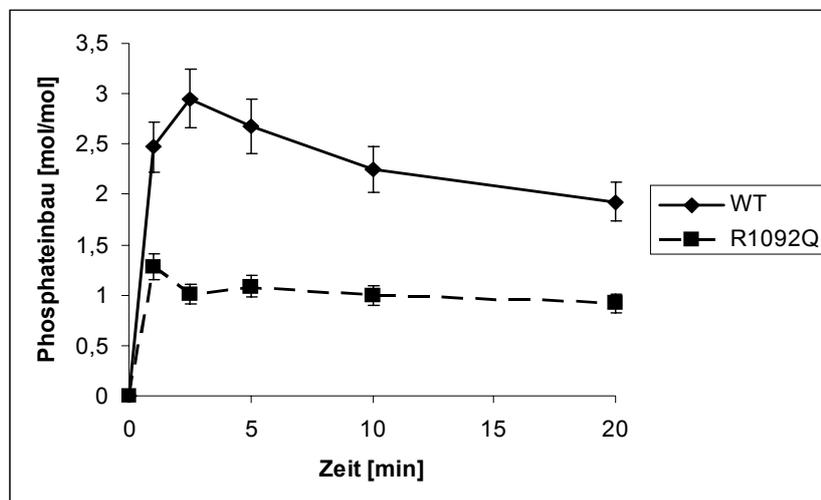


Abb. 4.14: Vergleich der Autophosphorylierung der GST-IRKΔ72C-Kinasen: WT gegen R1092Q

Es wurde mit 1 mM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ und 1 μM Kinase phosphoryliert bei RT. Zu den Zeiten 1, 2½, 5, 10 und 20 min. wurden Proben entnommen und über SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Autoradiographie folgte die Cerenkov-Messung der Banden. Wie der Verlauf der Phosphorylierung zeigt, ist die Mutante im Einbau sowie der Initialgeschwindigkeit drastisch vermindert.

Der neu auftretende Befund war jedoch, dass die beiden Kinasen im Phosphateinbau verschieden sind. Es sah ganz danach aus, dass in der R1092Q-Kinase eine Phosphorylierungsstelle nicht mehr zugänglich ist. Um dies zu klären, wurde dieselbe Autophosphorylierung auch auf eine andere Kinase (GST-IRKΔ72C-Y972F; Karau 2004) ausgeweitet. Bei der Y972F-Kinase ist eine Autophosphorylierungsstelle in der JM-Domäne zu Phenylalanin mutiert. Der Gesamteinbau müsste daher dem der R1092Q-Kinase gleichen, da hier auch eine Phosphorylierungsstelle fehlt.

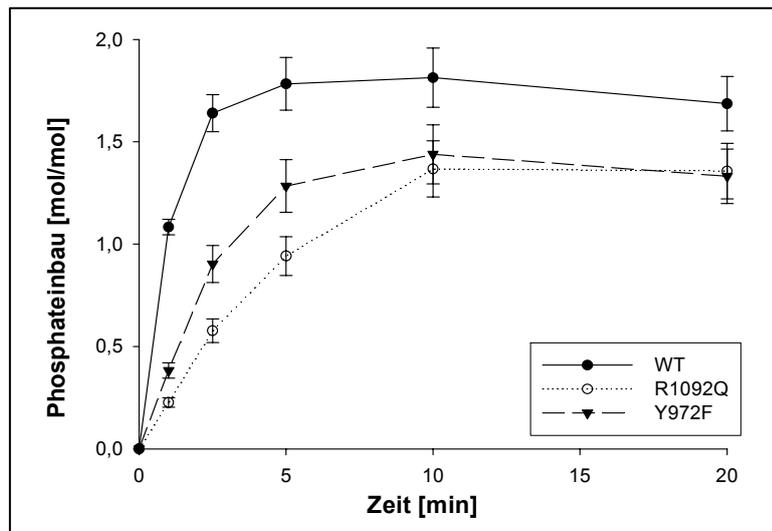


Abb. 4.15: Vergleich der Autophosphorylierung der GST-IRKΔ72C-Kinasen: WT, R1092Q und Y972F

Es wurde mit 1 mM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ und 2 μM Kinase phosphoryliert bei RT. Zu den Zeiten 1, 2½, 5, 10 und 20 min. wurden Proben entnommen und über SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Autoradiographie folgte die Cerenkov-Messung der Banden. Beide Mutanten sind im Gesamtphosphateinbau deutlich schlechter als die Wildtyp-Kinase.

Das Ergebnis ist in Abb. 4.15 dargestellt. Beide Mutanten erreichen mit 1,3 mol/mol den gleichen Gesamteinbau an Phosphat, und damit sind weniger Phosphorylierungsstellen als beim Wildtyp verfügbar. Bedauerlicherweise waren die eingesetzten Kinasekonzentrationen trotz Bestimmung tatsächlich unterschiedlich, so dass keine Aussage über die Initialgeschwindigkeiten möglich ist.

Um einen Effekt durch Stimulierung über GST-Fusion auf die Kinase auszuschließen, wollte ich als nächstes diese Kinasen als isolierte Monomere untersuchen und miteinander vergleichen. Dazu wurden die dimeren Kinasen über Thrombinspaltung vom GST abgetrennt und die monomerisierten Kinasen anschließend über Anionenaustauschchromatographie isoliert (s. 7.7.3). In Abb. 4.16 ist das Resultat einer konzentrationsabhängigen Autophosphorylierung der IRKΔ72C und IRKΔ72C-R1092Q Kinasen dokumentiert über die native PAGE zu sehen.

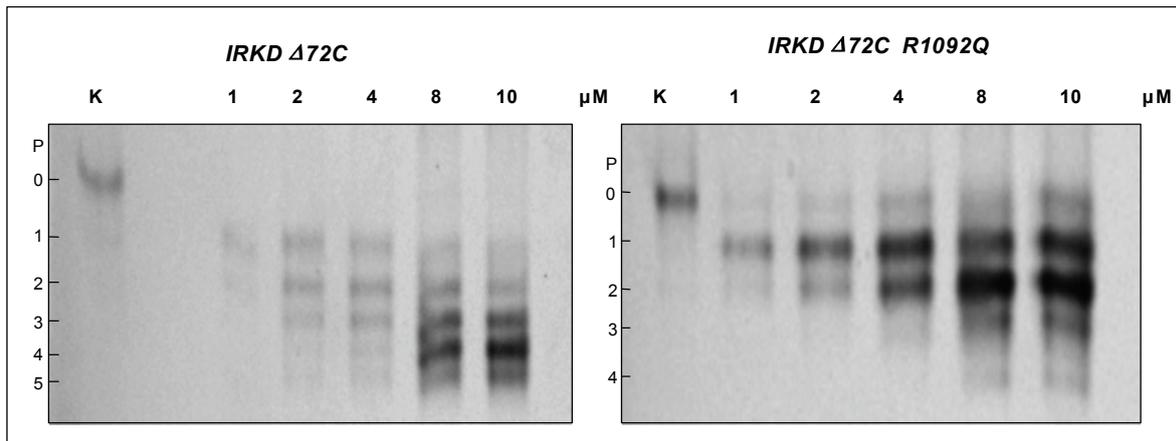


Abb. 4.16: Konzentrationsabhängige Autophosphorylierung der monomeren IRK Δ 72C-Kinasen: Wildtyp und R1092Q-Mutante

Die Autophosphorylierung wurde mit 10 mM ATP und 30 mM Mg²⁺ für 10 min. durchgeführt. Die Konzentrationen der Kinasen betragen 1, 2, 4, 8 und 10 μ M. Das Bild zeigt das Coomassie-gefärbte Gel nach nativer PAGE. Beim Wildtyp gibt es bis zu fünf Phosphorylierungsstufen. Dagegen sind es nur vier bei der Mutante. K= Kinase (ohne ATP).

Laut dem Gel-Foto ist der Wildtyp nicht nur schon ab einer Konzentration von 2 μ M viel weiter fortgeschritten im Phosphorylierungsverlauf als die Mutante, sondern erreicht auch eine fünfte Stufe. Diese ist nicht in der R1092Q-Phosphorylierung zu sehen. Hier gibt es insgesamt nur vier Phosphorylierungsstufen. Beim Wildtyp häuft sich ab 8 μ M zusätzlich noch die Tetrakis-phosphorylierte Stufe an, wogegen bei der Mutante eine Anhäufung der Bis-phosphorylierten Stufe gesehen wird.

Im weiteren Vorgehen habe ich alle drei monomere Kinasen, IRK Δ 72C: Wildtyp, R1092Q-Mutante und Y972F-Mutante in der Autophosphorylierung verglichen (Daten nicht gezeigt). Es stellte sich unerwartet heraus, dass sich die Wildtyp-Kinase von der R1092Q-Mutante sich nicht mehr in der Initialgeschwindigkeit und im Phosphateinbau bei einer Kinasekonzentration ab 8 μ M unterschied. Nur bei der Y972F-Kinase hatte man es wie erwartet mit einem geringeren Phosphateinbau zu tun. Es hatte den Anschein, dass die R1092Q-Kinase in ihrer Dimerisierung beeinträchtigt ist und erst in hohen Konzentrationen dimerisiert und damit voll aktiviert wird.

4.2.3 Der Dimerisierungsmechanismus der R1092Q-Kinase ist gestört

Die nächste Frage, die sich nun stellte, war, wie sich die R1092Q-Kinase mutante im Vergleich zu dem Wildtyp in Substratphosphorylierungen verhält. Als Substrat habe ich zunächst die inaktive Kinase IRKD-D/A [Corona, 1999] gewählt. Dieses Substrat muss, wie schon erwähnt, zuerst mit dem Katalysator dimerisieren, um effizient phosphoryliert werden zu können (vgl. Abb. 4.10). Das Ergebnis des Versuchs ist in Abb. 4.17 zu sehen.

Der Phosphat-Transfer auf das Substrat ist, wie erwartet, bei der R1092Q-Kinase dramatisch vermindert, und zwar bis zu 80 %, wenn man den Endwert der Wildtyp-Kinase von ~160 pmol Phosphat nach 40 min. betrachtet. Die Autophosphorylierung der Kinasen wich nur geringfügig ab, bei Berücksichtigung von Fehlern beim Pipettieren und bei der Konzentrationsbestimmung. Zumindest die letztere Fehlerquelle wurde weitgehend ausgeschlossen, da die SDS-Gele vor der Autoradiographie über Coomassie-Färbung angefärbt worden und die Proteinbanden verglichen worden sind (Daten nicht gezeigt).

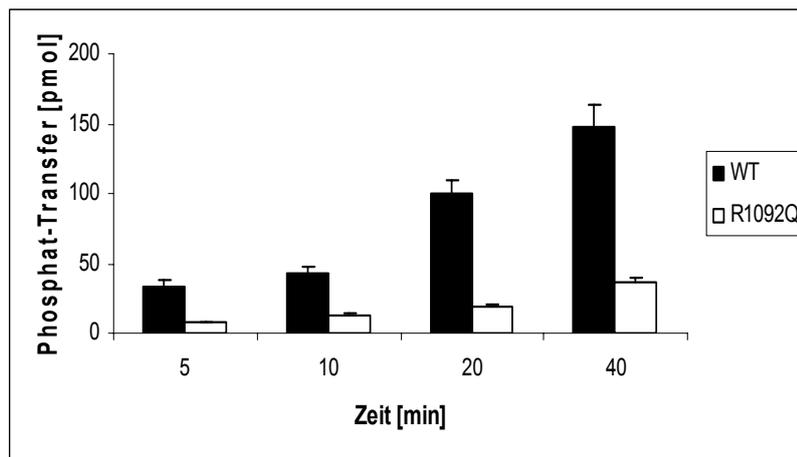


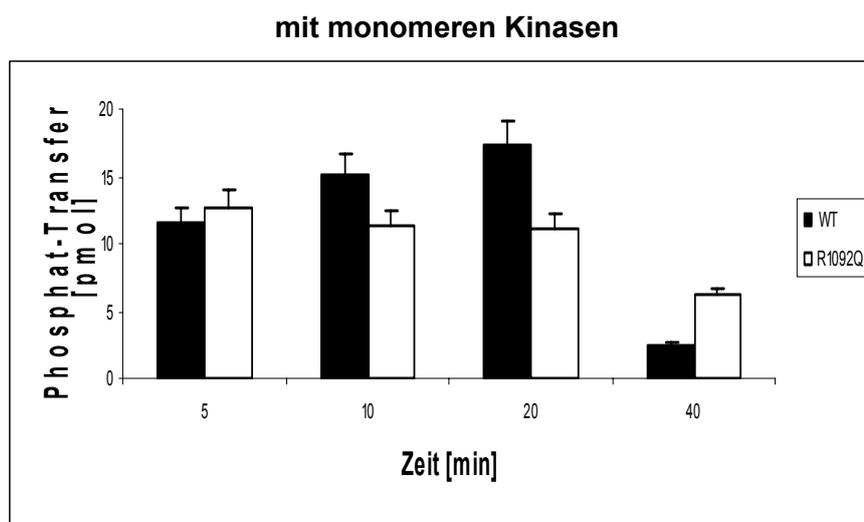
Abb. 4.17: Substratphosphorylierung der IRKD-D/A mit monomerer IRKD Δ 72C WT und R1092Q

Die Phosphorylierungsbedingungen waren standardgemäß gewählt [1 mM [γ - 32 P]ATP]. Das Verhältnis Kinase (vorphosphoryliert) zu Substrat war 1:10 [1 μ M bzw. 10 μ M]. Bei den Reaktionszeiten 5, 10, 20 und 40 min. sind Proben entnommen und über SDS-PAGE separiert worden. Über die Cerenkov-Messung der ausgeschnittenen Gelbanden nach Autoradiographie ist der Phosphat-Transfer bestimmt worden. Die Kinase mutante phosphoryliert das Substrat IRKD-D/A sehr viel schlechter als der Wildtyp.

Dieses Resultat demonstrierte, dass die R1092Q-Mutante, bedingt durch die intrinsische Dimerisierungsschwäche, einen Defekt in der Auto- und Substratphosphorylierung aufweist. Dadurch erkennt die Kinase mutante das aktive bzw. inaktive Enzym, den physiologischen Interaktionspartner, nicht mehr als Substrat.

4.2.4 Die R1092Q-Kinase zeigt *in vitro* kein Defekt in der Substratphosphorylierung

Der folgende Versuch sollte klären, ob diese verminderte Aktivität sich auch generell in der Substratphosphorylierung bei Verwendung von keiner Dimerisierung bedürftenden Substraten auftritt. Daher habe ich mit der R1092Q-Mutante polyGluTyr, ein Standardsubstrat für Tyrosinkinase, phosphoryliert. Es sei angemerkt, dass die Katalysatoren diesmal vor der Substratphosphorylierung in hoher Konzentration [8 μM] vorphosphoryliert wurden, damit man sicher sein konnte, dass die Kinasen aktiv waren. Das Ergebnis dieser Phosphorylierung ist in Abb. 4.18 dargestellt. Die monomere WT-Kinase hat mit max. 17 pmol Phosphat nach 20 min. das Substrat polyGluTyr besser umgesetzt als die R1092Q-Kinase mit max. 12 pmol Phosphat nach 20 min. Der extreme Abfall im Transfer nach 40 min. begründet sich durch die de- und wieder rephosphorylierende Aktivität der Kinase, wenn die Substratkonzentration im K_M -Bereich liegt oder der ATP-Pool limitierend ist [Tennagels, 1998]. Dadurch kann ein Großteil der Radioaktivität wieder ausgebaut werden. Genau umgekehrt war die Effizienz der dimeren GST-Kinasen in der Substratphosphorylierung von polyGluTyr. Hier erreichte die R1092Q-Kinase einen Transfer von 27 pmol Phosphat bereits nach 20 min., wogegen die WT-Kinase sich erst nach 40 min. auf 19 pmol Phosphat einpendelte. Die aktivere Kinase war hier die Kinasemutante. Jedenfalls konnte man in beiden Fällen keinen Defekt in der Substratphosphorylierung von polyGluTyr bei der R1092Q-Kinasemutante feststellen.



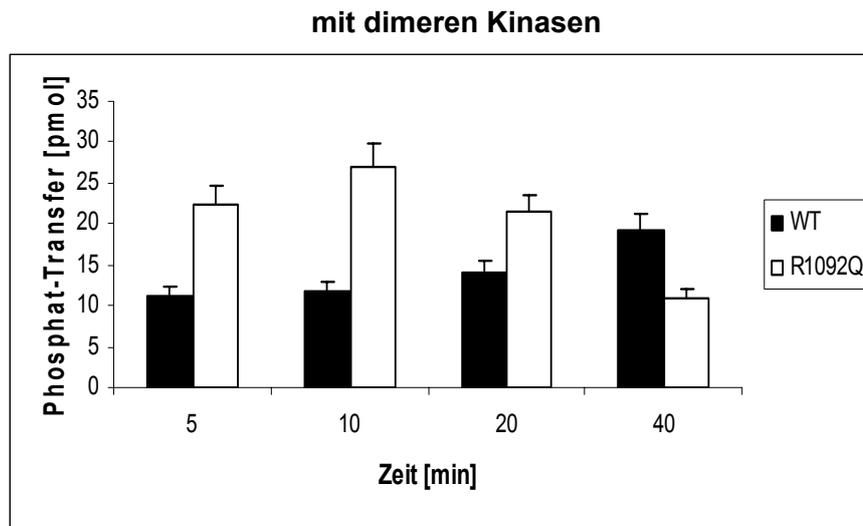


Abb. 4.18: Substratphosphorylierung von polyGluTyr mit den monomeren bzw. dimeren IRKD Δ 72C-Kinasen

Die monomeren und dimeren Kinasen wurden mit einer Konzentration von 8 μ M vor der Zugabe des Substrats vorphosphoryliert mit je 5 mM ATP für 5 min. bei RT. Es folgte die Substratphosphorylierung bei 1 mM [γ - 32 P]ATP und 1 μ M Kinase (ebenfalls bei RT). Die Konzentration von polyGluTyr betrug 0,5 μ g/ μ l. Zu den Zeiten 5, 10, 20 und 40 min. sind Proben entnommen und auf P81-Papier aufgetragen worden. Auswertung erfolgte nach 7.9.2. Wie die Säulendiagramme zeigen, besteht keine Defizienz im Phosphat-Transfer der R1092Q-Kinase auf das Substrat polyGluTyr. Bei dem dimeren Konstrukt ist dieser sogar gesteigert.

Dies war ein weiteres Indiz dafür, dass die R1092Q-Mutante generell fähig ist, Substrate zu binden und damit auch zu phosphorylieren, wenn sie einmal richtig aktiviert wird. Der Mangel in der Substratphosphorylierung, den ich bei der Phosphorylierung der IRKD-D/A Kinase gesehen hatte, muss auf eine gestörte oder zumindest nicht für Katalyse produktive Dimerisierung zurückzuführen sein. Gleichzeitig aber funktioniert die Dimerisierung bei der Autophosphorylierung der Kinasemutante noch in einer produktiven Form, wenn sie bei hoher Kinasekonzentration stattfindet.

Ein weiterer Versuch, mit einem physiologischen Substrat GST-IRS1p30, welches der mittleren Domäne des humanen IRS-1 (D517-P777) entspricht [Siemeister et al., 1995], bestätigte, dass kein Defekt in der Katalyse vorliegt, und dass die R1092Q-Mutante das Substrat sogar besser phosphoryliert als der Wildtyp (s. Abb. 4.19). Die R1092Q-Kinase hatte nach 40 min. 172 pmol Phosphat transferiert, die WT-Kinase dagegen nur 117 pmol Phosphat. Demnach konnte nicht wie von Takahashi et al. (1997) beschriebene, die bei der R1092Q-Mutante defizitäre IRS-1 Phosphorylierung, nicht bestätigt werden. Aber höchstwahrscheinlich muss man davon ausgehen, dass die Autoren es auch mit kaum

aktiven Katalysatoren zu tun hatten. Ich habe dagegen, wie bereits erwähnt, die Kinase vor Substratzugabe in hoher Konzentration vorphosphoryliert und damit aktiviert.

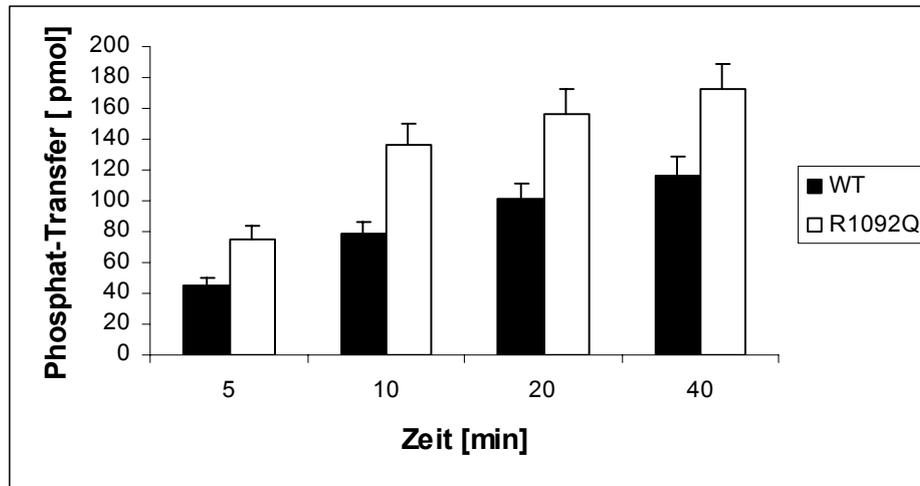


Abb. 4.19: Substratphosphorylierung von GST-IRS1p30 mit der IRKD Δ 72C WT und R1092Q

Die Kinasen wurden nach Vorphosphorylierung (s.o.) zu je 1 μ M und das Substrat zu je 10 μ M eingesetzt. Phosphorylierung erfolgte mit 1 mM [γ - 32 P]ATP bei RT für 5, 10, 20 und 40 min. Anschließend wurden die Proben über SDS-PAGE getrennt. Nach der Autoradiographie erfolgte die Cerenkov-Messung der Gelbanden. Auch bei einem physiologischen Substrat ist kein Defekt in der Transferaseaktivität der Kinasemutante festzustellen. Der Phosphat-Transfer ist sogar größer als beim Wildtyp.

4.3 Der Einfluss der JM-Domäne auf die Kinaseaktivität

Zur Untersuchung des Einflusses der Juxtamembranregion auf die Aktivität der IR/IGFR Kinase sollten die JM-Domänen des Insulin- sowie IGF-1 Rezeptors in Auto- und Substratphosphorylierungen der Kinase eingesetzt werden. Dazu wurde das als autoinhibitorisch beschriebene Tyrosin, das in einer hydrophoben Bindungstasche gelegen ist (s. Abb. 4.20), einer rationalen Mutagenese unterzogen. Dies ist das Y984 beim IR, und im Falle des IGFR ist es das dem Y984 äquivalente Tyrosin Y957. Letzteres ist genauso in einer hydrophoben Region eingebettet wie das Y984 [Li et al., 2003]. Der Grundgedanke war, die Kontakte in der hydrophoben Tasche zwischen α C-Helix und den β -Faltblättern zum einen zu verstärken und zum anderen zu unterbinden. Eine der vorgenommenen Substitutionen sollte einen neutralen Effekt erreichen. Anhand des Strukturdarstellungsprogramms SwissPDB wurden *in silico* verschiedene Aminosäureaustausche mit der Kinasedomäne des Insulinrezeptors (PDB code 1p14; Li et al., 2003) durchgeführt.

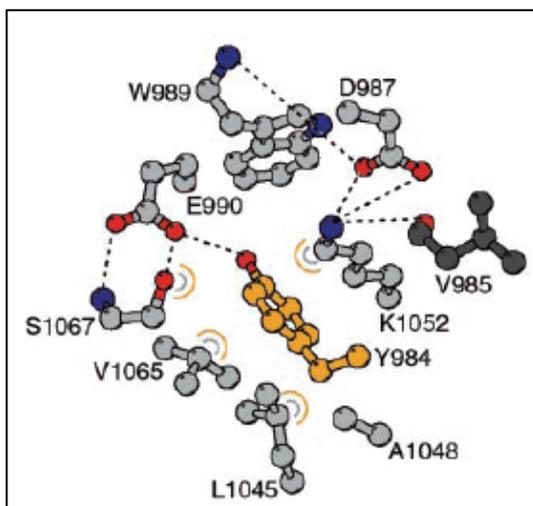


Abb. 4.20: Die Y984-Bindungstasche

Das schematische Diagramm veranschaulicht die invarianten Reste in der Insulinrezeptor-Familie, welche die Bindungstasche um das Y984 aufbauen. Nur V985 (in dunkelgrau) ist als einziger Rest nicht konserviert. Wasserstoff-Brücken sind als gepunktete Linien dargestellt. Abb. aus Li et al., 2003.

4.3.1 Herstellung und Expression der GST-JM-Konstrukte des IR und IGFR

Die Mutagenese-Simulation lieferte drei interessante Substitutionen: Glutamin (neutraler Effekt), Lysin (positiver Effekt) und Tryptophan (negativer Effekt). Mithilfe des *QuikChange*[®] *XL Site-Directed Mutagenesis* Kit wurde dann ein ortsgerichteter Aminosäuren-Austausch durchgeführt an der Stelle Y984 bzw. Y957 (s. 7.2). Ausgegangen wurde von den Wildtyp-Konstrukten der Juxtamembran-Domänen, die im pGEX3X-Vektor vorlagen (Al-Hasani, 1995; Baer, unveröffentlicht). Die Konstrukte umfassen je den gesamten JM-Bereich inklusive eines Teils der Kinasedomäne (s. Abb. 4.21)

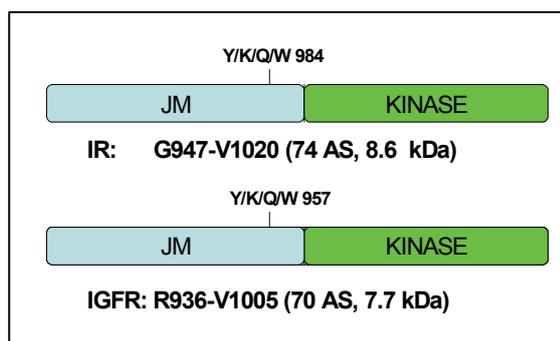


Abb. 4.21: Schema der JM-Konstrukte des IR und IGFR

Der Juxtamembranbereich des IR ist um fünf Aminosäuren länger, daher auch das höhere MW. N-terminal sind alle Konstrukte mit GST (26 kDa) fusioniert. Bedingt durch die Klonierung ohne Stopcodon nach V1005 sind die IGFR-Konstrukte C-terminal um sechs artifizielle Aminosäuren verlängert.

Eine stattgefundene Mutagenese konnte durch eine Einführung einer neuen, einzigartigen *KpnI*-Schnittstelle (*GGTACC*), die der Ausgangsvektor nicht besitzt (s. Anhang), an der relevanten Position bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurden alle Konstrukte über automatische DNA-Sequenzierung verifiziert (Daten nicht gezeigt).

Nach der erfolgreichen Klonierung der Konstrukte wurde die Proteinexpression in *E. coli* DH5 α -Zellen durchgeführt und im Anschluss eine GSH-Affinitätschromatographie (s. 7.4) gemacht. Die Abb. 4.22 zeigt exemplarisch die Aufreinigung von GST-IR-JM_{Y984Q} und GST-IGFR-JM_{Y957Q}. Auffällig ist, dass bei der Expression neben dem vollständigen Protein (Bande bei 35 kDa) noch mehrere Abbruchfragmente zu sehen sind. Außerdem sieht man, dass in *E. coli* ein Chaperon (mit * gekennzeichnet), hier aufgrund der Größe (~66 kDa) wahrscheinlich DnaK, mit exprimiert wird. Aber durch die Einführung eines zusätzlichen Waschschrilles mit ATP/Mg, wie er in der Literatur vorgeschlagen wird [Rial und Ceccarelli, 2002], lässt sich diese ATPase-Kontamination vollständig entfernen. Ältere Präparationen des GST-IGFR-JM_{WT} (Probe „STANDARD“) wurden noch ohne diesen zusätzlichen Waschschriff gereinigt, und dort sieht man tatsächlich noch diese Chaperonbande bei 66 kDa (s. Abb. 4.22). Die ATPase-Aktivität wurde schon vorher in unserer Arbeitsgruppe eindeutig dieser Proteinbande zugeordnet [Elhamine, 2004]. Die Ausbeute an Fusionsprotein war bei den IR-JM-Konstrukten immer doppelt so hoch wie beim IGFR (7 bzw. 3,5 mg/ L Zellkultur).

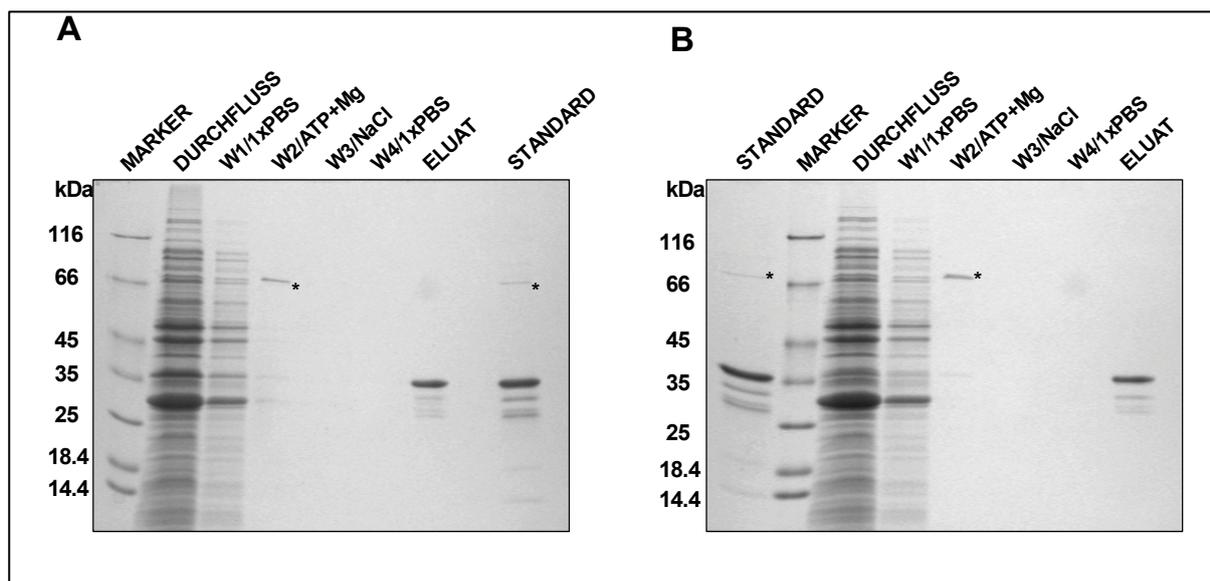


Abb. 4.22: Verlauf der Reinigung über GSH-Affinitätschromatographie, von (A) GST-IR-JM_{Y984Q} und (B) GST-IGFR-JM_{Y957Q}

W1= 1. Waschschriff mit 1x PBS; W2= 2. Waschschriff mit 2,5 mM ATP und 10 mM Mg²⁺; W3= 3. Waschschriff mit 1 M NaCl; W4= 4. Waschschriff mit 1x PBS; Eluat= 5 μ g Protein nach Konzentration über Centricon und Waschen mit 50 mM Tris/HCl (pH 7,5); Standard= 5 μ g GST-IGFR-JM_{WT}

Während der Reinigung wurden jeweils 50 μ l Aliquots entnommen und über eine SDS-PAGE (Trenngel 12%ig) aufgetrennt. Anschließend folgte die Färbung über Coomassie. Die gereinigten Fusionsproteine sind 34,9 kDa (IR) bzw. 35,9 kDa groß (IGFR). Der Stern (*) markiert die koexprimierte ATPase aus *E. coli*.

4.3.2 Die Autophosphorylierung der IGFR-VK Kinase wird durch die GST-IGFR-JM Proteine gehemmt

Ein orientierender Vorversuch mit den JM-Konstrukten des IR zeigte keinen wesentlichen Einfluss auf die Aktivität der IGFR-Kinase in der Autophosphorylierung (IGFR-VK). Somit habe ich mich in den weiteren Untersuchungen auf die JM-Domäne des IGFR konzentriert. Bei der IGFR-VK Kinase handelt es sich um die bereits erwähnte, N- und C-terminal verkürzte IGFR-Kinasedomäne (V956-K1256). Diese Kinase verfügt also nicht über die komplette JM-Domäne und ist zudem noch an dem Rest Y957 zu F mutiert, da man, bevor die Arbeit von Li et al. (2003) veröffentlicht wurde, nicht sicher war, ob es sich dabei um eine Autophosphorylierungsstelle handelt oder nicht. Um eine eventuelle Heterogenität in der Autophosphorylierung der Kinase zu vermeiden, wurde dementsprechend diese Substitution für sinnvoll erachtet.

Zunächst habe ich überprüft, analog wie im Versuch in Abb. 4.2 illustriert, ob die Zugabe von der JM-Domäne die Autophosphorylierung der IGFR-Kinase beeinträchtigt (s. Abb. 4.23). Tatsächlich verzögerten alle JM-Konstrukte die Autophosphorylierung bei einem Verhältnis Kinase zu JM-Domäne von 1:5. Während in den Kontrollen ohne JM-Protein die Kinase schon nach 30 bzw. 60 min. den Tris-phosphorylierten Zustand erreichte, kommt die Kinase in Anwesenheit der JM-Domäne nicht über die Bis-Form hinaus.

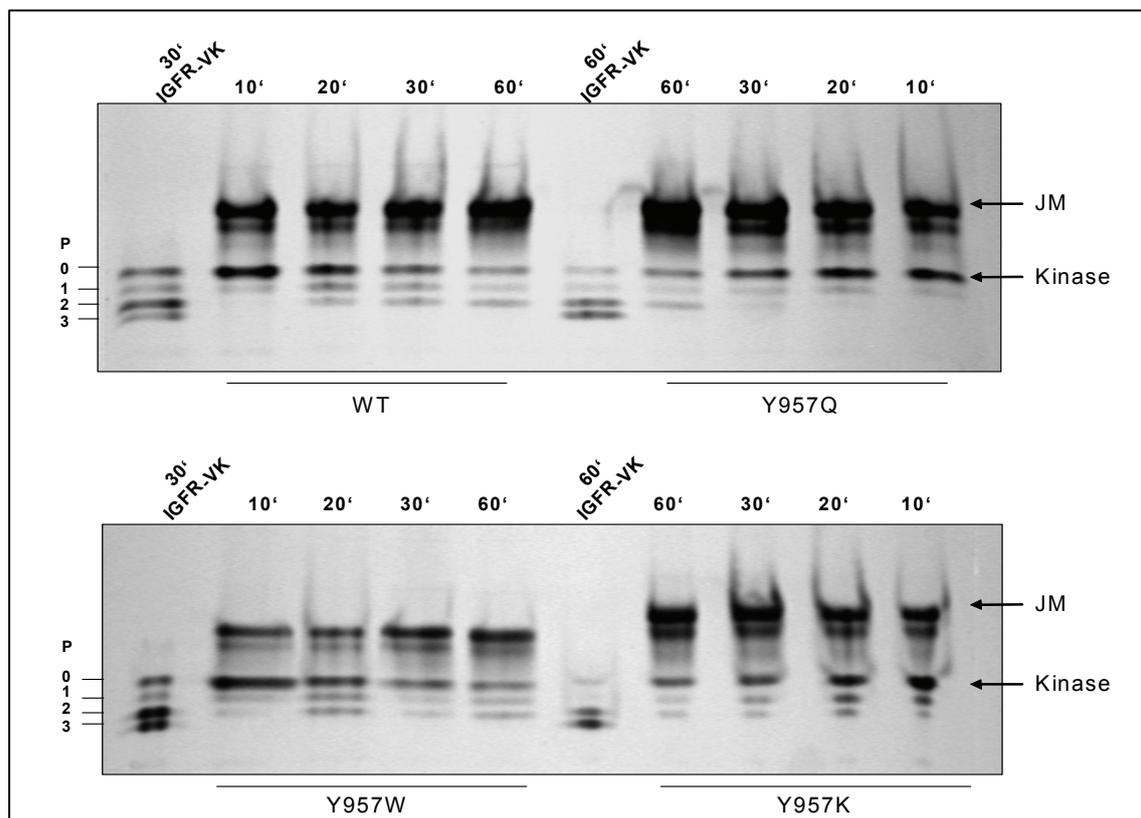


Abb. 4.23: Autophosphorylierung der IGFR-VK Kinase in Anwesenheit der JM-Proteine des IGFR

Die Autophosphorylierung ist über die native PAGE verfolgt. Aufgetragen sind die Zeitwerte 10, 20, 30 und 60 min. in Anwesenheit der IGFR-JM-Konstrukte: WT, Y957Q, Y957W und Y957K. Die Konzentration der Kinase betrug $2,3 \mu\text{M}$ und phosphoryliert wurde mit 30 mM Mg^{2+} und 10 mM ATP bei RT. Die JM-Konstrukte wurden in einer Konzentration von $11,5 \mu\text{M}$ eingesetzt, was einem Verhältnis von 1:5 entsprach. Die Inkubation mit der JM-Domäne erfolgte vor der Phosphorylierung bei 4°C und für 45 min. Als Kontrollen sind die Autophosphorylierungen der Kinase nach 30 und 60 min. ohne Protein aufgetragen. Phosphorylierungsstufen von 0 bis 3 (0P – 3P).

Es ist bekannt, dass die Autophosphorylierung der IR-Kinase in Anwesenheit von Substraten vermindert ist [Morrison und Pessin, 1987]. Damit dieser inhibitorische Effekt der JM-Domäne nicht bloß auf einen simplen Substrateffekt zurückzuführen ist, wurde versucht, das GST-IGFR-JM_{WT} Protein in einer Substratphosphorylierung, katalysiert von der IGFR-Kinase zu phosphorylieren. Das Ergebnis zeigte, dass die JM-Domäne ein schlechtes Substrat für die Kinase darstellt (Daten nicht gezeigt). Schon Al-Hasani (1995) wies nach, dass sich die JM-Domäne nur bei Zugabe eines Aktivators, dem Histon 2B, effizient von der IRKD-Kinase phosphorylieren ließ.

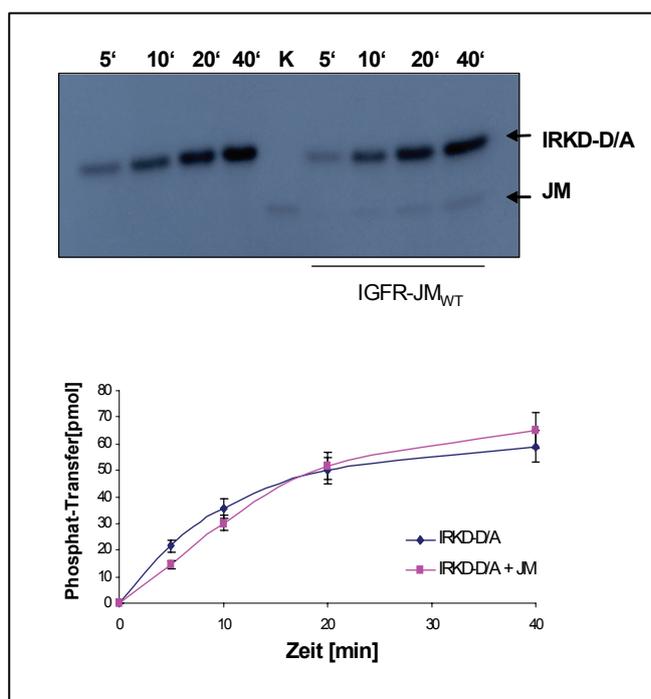


Abb. 4.24: Substratphosphorylierung von der IRKD-D/A durch die IGFR-VK Kinase ± JM-Domäne

Die Phosphorylierung lief standardgemäß mit $1 \text{ mM } [\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ bei RT. Das Verhältnis Kinase zu Substrat war 1:30 [$0,25 \mu\text{M}$ bzw. $7,5 \mu\text{M}$]. GST-IGFR-JM_{WT} wurde in einer Konz. von $2,5 \mu\text{M}$ zugesetzt (1:10). Bei den Reaktionszeiten 5, 10, 20 und 40 min. sind Proben entnommen und über SDS-PAGE getrennt. Oben ist die Autoradiographie des SDS-Gels abgebildet und unten ist der Einbau in das Substrat nach Cerenkov-Zählung der Gelbänder aufgetragen.

In Abb. 4.24 ist zu sehen, dass die Anwesenheit des mit GST fusionierten Wildtyp-JM-Proteins in der Substratphosphorylierung von IRKD-D/A nicht stört. Die Kinase IGFR-VK phosphoryliert in beiden Fällen das Substrat gleich mit einem maximalen Phosphat-Transfer

von ca. 60 pmol nach 40 min. Der Einbau an Phosphat in die JM-Domäne durch die Kinase ist vernachlässigbar gering.

4.3.3 Konstruktion und Isolierung von GST-freien IGFR-JM-6xHis Proteinen

Das nächste Ziel für mich hieß, die JM-Konstrukte als reine Peptide ohne den GST-Anteil isoliert zu untersuchen. Damit sollten eventuelle Artefakte ausgeschlossen werden.

Eine Strategie war, die JM-Domänen in einen anderen Expressionsvektor umzuklonieren, welcher ohne den GST-Tag auskommt. Als Vektor bot sich der pET21a(+)-Vektor an (s. Anhang). Dieser Vektor erlaubt es, das gewünschte Protein zwischen einen N-terminalen T7-Tag und einem C-terminalen 6xHis-Tag zu integrieren. Das zu klonierende Insert wurde über eine PCR-Reaktion passend amplifiziert und über *BamHI* und *EcoRI* in den Vektor hinein ligiert. Die Klonierung verlief ohne Probleme, und mit dem erhaltenen Vektor pET21a(+)-IGFR-JM_{WT} habe ich kompetente *E. coli* BL21(DE3)-Zellen transformiert. Eine im Anschluss versuchte Proteinexpression verlief leider erfolglos. In keinem der getesteten Klone konnte das 11 kDa große Protein IGFR-JM_{WT}-6xHis nachgewiesen werden (alle Daten nicht gezeigt.). Aus diesem Grund wurden alle Bemühungen, das Protein über diesen Weg zu erhalten, aufgegeben.

Eine Alternative, um an die isolierte JM-Domäne zu gelangen, war das Konstrukt im pGEX3X-Vektor C-terminal über eine PCR-Reaktion um einen 6xHis-Tag zu verlängern. Dann sollte das Protein nach Expression und Reinigung über GSH-Affinitätschromatographie mit der Protease Faktor Xa behandelt werden, so dass der GST-Teil abgespalten wird. Am Schluss der Prozedur kann dann das JM-Protein über eine Nickel-Chelat-Chromatographie isoliert werden. Wie in Abb. 4.25 zu erkennen ist, hat die Verlängerung des IGFR-JM_{WT} um einen 6xHis-Tag einwandfrei funktioniert. Auf einem 2%igen Agarosegel ist der Unterschied zwischen normaler (229 bp) und verlängerter (249 bp) JM-Domäne zu erkennen.

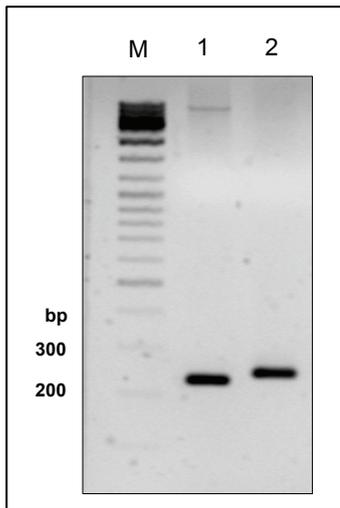


Abb. 4.25: 2%iges Agarosegel zur

Analyse der PCR von IGFR-JM_{WT}

Das Gel zeigt die gereinigten PCR-Produkte von normaler IGFR-JM_{WT} (1) und verlängerter IGFR-JM_{WT}-6xHis (2). Der Unterschied von 229 zu 249 bp ist deutlich zu sehen. In Spur 1 sind noch Spuren der Template-DNA zu sehen (obere Bande).

Daraufhin habe ich das neue PCR-Produkt über *Bam*HI und *Eco*RI in den pGEX3X-Vektor kloniert. Die erhaltenen positiven Klone sind dann auf Proteinexpression überprüft worden und der beste Klon ist für die Proteingroßexpression ausgewählt worden (Daten nicht gezeigt). Analog bin ich bei den Mutanten Y957K, Y957Q und Y957W vorgegangen.

Die Proteingroßexpression und Reinigung der GST-IGFR-JM Proteine über die GSH-Affinitätschromatographie verlief wie in 7.4 beschrieben. Auf einem SDS-Gel (Trenngel 12%) konnte man keinen Unterschied zum nicht-verlängerten Protein sehen, da beide Varianten ein Molekulargewicht von ~36 kDa besitzen (Daten nicht gezeigt).

Die Abb. 4.26 veranschaulicht das Ergebnis einer analytischen GST-Abtrennung mit der Protease Faktor Xa von dem GST-IGFR-JM_{WT}-6xHis Protein. Bei einem Verhältnis von Protease zu Substrat von 1:250 ist nach 8 h Reaktionszeit bei RT sämtliches Fusionsprotein umgesetzt worden. Die geschnittene IGFR-JM-Domäne weist ein ungewöhnliches Laufverhalten im 18%igen SDS-Gel auf. Bei einer errechneten Größe von 8,5 kDa hat die JM-Domäne ein apparentes MW von unter 6,5 kDa. Diesen Befund hat schon Al-Hasani (1995) in seiner Doktorarbeit für das normale JM-Peptid beobachtet. Wahrscheinlich nimmt die reine JM-Domäne eine sehr kompakte, globuläre Form an und läuft damit in der SDS-PAGE tiefer als erwartet.

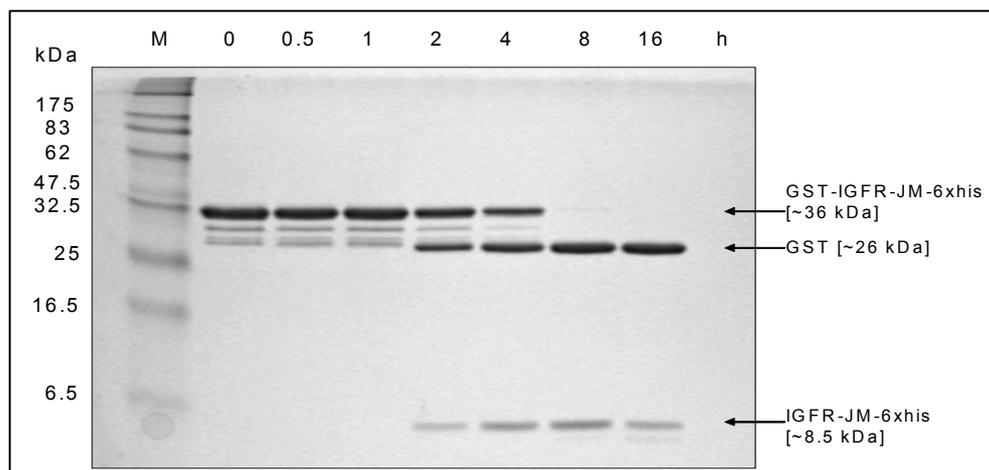
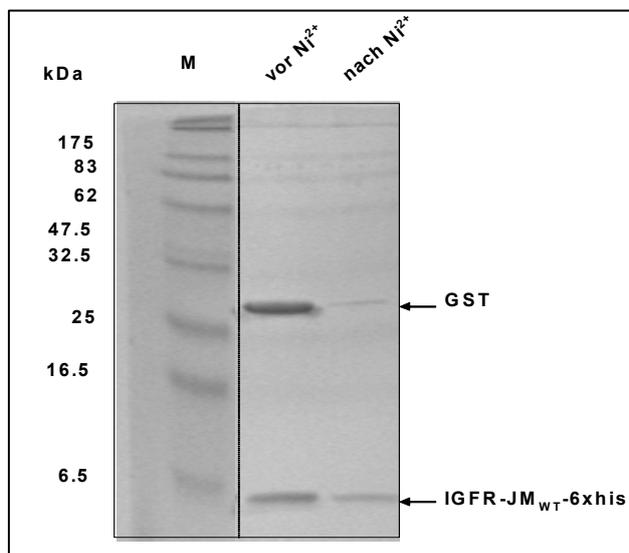


Abb. 4.26: Ergebnis der GST-Abtrennung von GST-IGFR-JM_{WT}-6xHis mit Faktor Xa

Das Verhältnis von Protease zu Substrat war 1:250. Die Reaktion lief bei Raumtemperatur und in 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂ und 50 mM Tris/HCl (pH 8,0) ab. Zu den angegebenen Zeiten wurden je 5 µg Proteingemisch entnommen und über ein 18%iges SDS-Gel getrennt. Nach 8h ist sämtliches Fusionsprotein gespalten worden.

Nachdem ich nun die optimalen Reaktionsbedingungen für die GST-Abspaltung bestimmt hatte, habe ich eine präparative Spaltung für alle JM-Konstrukte durchgeführt. Die Spaltungsansätze wurden dann über eine Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie aufgereinigt (s. 7.4.1).

**Abb. 4.27: Ergebnis der Nickel-Chelat-Aufreinigung von IGFR-JM_{WT}-6xHis**

Nach dem Spaltung mit Faktor Xa ist der gesamte Ansatz über eine Ni²⁺-Säule gegeben worden. Vor und nach Reinigung wurden Proben entnommen (je 5 µg) und über SDS-PAGE (TG 18%) separiert. Die JM-Domäne konnte bis zu 90 % rein isoliert werden.

Das Resultat dieser Aufreinigung ist exemplarisch für das IGFR-JM_{WT}-6xhis Protein in Abb. 4.27 dargestellt. Mithilfe der Nickel-Chelat-Chromatographie konnte das JM-Protein fast gänzlich von GST und Protease getrennt werden.

4.3.4 Die isolierten JM-Domänen sind hinreichend für die Inhibition der IGFR-VK Autophosphorylierung

Anschließend wurden die IGFR-JM-Peptide auf ihre Inhibitionsfähigkeit in der Autophosphorylierung der IGFR-VK Kinase überprüft. Das Ergebnis ist in Abb. 4.28 zu sehen. Alle JM-Peptide hemmen den Verlauf der Autophosphorylierung der IGFR-Kinase. Während die Kinase normalerweise die Tris-phosphorylierte Stufe nach 60 min. längst erreicht, dominiert bei Anwesenheit der JM-Peptide die Bis-Form nach 60 min. Das Verhältnis von 1:5 (Kinase:JM) scheint optimal zu sein (s. Abb. 4.28 A), denn eine Änderung

des Verhältnisses auf 1:10 erbrachte eine schwächere Inhibition und mehr Tris-Form der Kinase als beim 1:5 Verhältnis (s. Abb. 4.28 B). Die IGFR-JM_{Y957Q}-Mutante verhielt sich bei einem Verhältnis von 1:5 vergleichbar dem Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Am stärksten inhibierte die Y957W-Mutante. Die Peptide färben sich in der Coomassie-Färbung anscheinend nicht homogen an, wie das Bandenmuster oberhalb der unphosphorylierten Kinase (0P) aufweist. Wahrscheinlich bestehen Unterschiede im Laufverhalten zwischen den einzelnen JM-Mutanten.

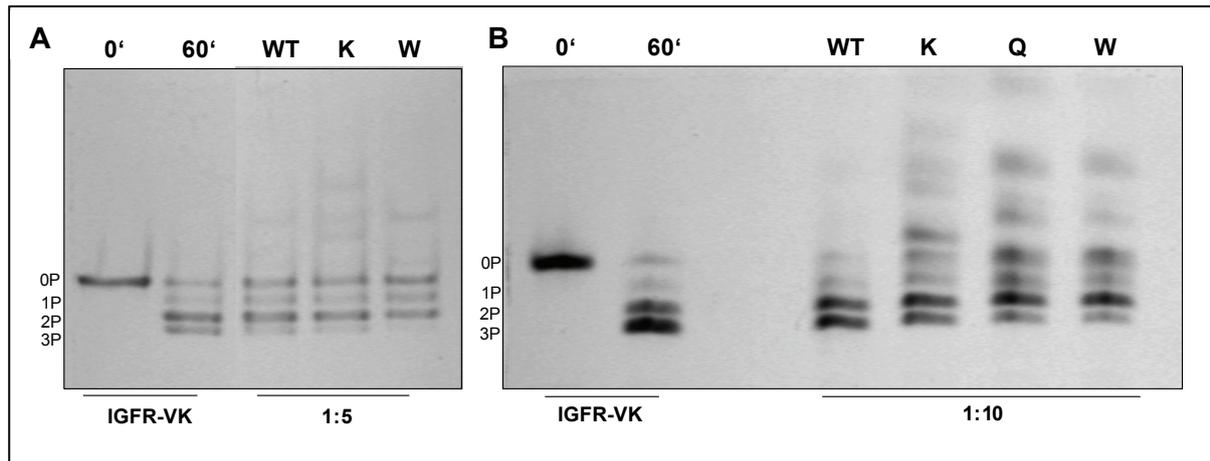


Abb. 4.28: Autophosphorylierung der IGFR-VK Kinase in Anwesenheit der JM-Peptide im Verhältnis 1:5 und 1:10 dokumentiert über native PAGE

Die Autophosphorylierung wurde standardmäßig mit 10 mM ATP und 30 mM Mg²⁺ bei RT durchgeführt. Die JM-Peptide des IGFR wurden vor Phosphorylierung mit der Kinase im Verhältnis 1:5 (A) bzw. 1:10 (B) für 45 min. bei 4°C vorinkubiert. Die Kinasekonzentration betrug 2,3 µM. Anschließend wurde für 60 min. phosphoryliert und die Proben über die native PAGE getrennt. Beim Verhältnis 1:5 ist die Inhibition über die JM-Peptide stärker ausgeprägt als bei 1:10. Die über der unphosphorylierten Kinase (0P) auftauchenden Banden erklären sich durch die Peptidzugaben. WT = IGFR-JM_{Y957}; K = IGFR-JM_{Y957K}; Q = IGFR-JM_{Y957Q}; W = IGFR-JM_{Y957W}

4.3.5 Der Einfluss der isolierten JM-Domäne auf die Substratphosphorylierung der IGFR-VK

Nach diesen Erkenntnissen sollte die Versuchsreihe der Substratphosphorylierung von IRKD-D/A in Anwesenheit der JM-Peptide auch auf die IGFR-VK Kinase ausgedehnt werden. Die Annahme war nun, dass durch die Anwesenheit von freier JM-Domäne (ohne GST) sich ein Effekt in der Substratphosphorylierung von der IGFR-VK Kinase, die N- und C-terminal verkürzt ist, nachweisen lässt.

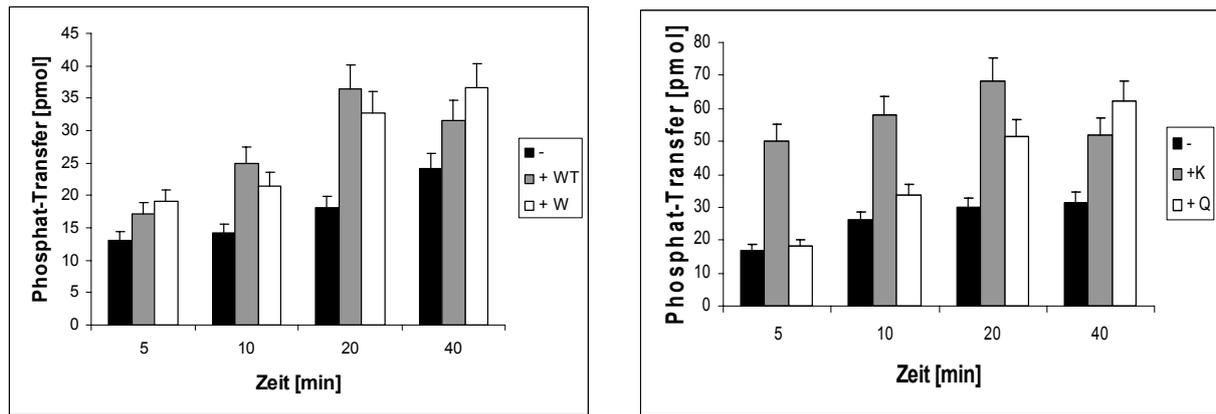


Abb. 4.29: Einfluss der JM-Peptide auf die Aktivität der IGFR-VK Kinase in der Substratphosphorylierung von IRKD-D/A

Die Durchführung und Reaktionsbedingungen des Experiments erfolgten analog zu 4.25, nur dass hier GST-freie JM-Peptide verwendet worden sind. Alle JM-Peptide wirken aktivierend auf das Enzym. Der Phosphattransfer auf das Substrat ist deutlich erhöht bei Anwesenheit der JM-Domänen. Am gravierendsten ist dies bei der K-Mutante zu sehen. WT= IGFR-JM_{Y957}; W= IGFR-JM_{Y957W}; K= IGFR-JM_{Y957K}; Q= IGFR-JM_{Y957Q}

Das Resultat, wie in Abb. 4.29 präsentiert, war überraschend. Die Zugabe von freier JM-Domäne führte nun zur Stabilisierung der IGFR-VK Kinase, was sich in einer Aktivierung des Phosphat-Transfers auf das Substrat äußerte. Die Effizienz dieser Aktivierung schwankt zwischen den einzelnen JM-Peptiden. Doch die stärkste Aktivierung erzielte das K-Peptid. Die Tabelle 4.2 fasst die Werte der Transferrate der Kinase auf das Substrat und die prozentuale Steigerung der Kinaseaktivität bei Anwesenheit der JM-Peptide zusammen.

Tab. 4.2: Phosphat-Transfer der IGFR-VK Kinase auf das Substrat IRKD-D/A ± JM-Peptide

JM-PEPTID	Transferierte Phosphate [pmol]	Durchschnittliche Steigerung in %
---	13-27,5	---
Y957	17-36,5	25
Y957W	19-36,7	25
Y957K	50-68	60
Y957Q	18,4-62	55,6

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die IGFR-VK Kinase in der Autophosphorylierung zwar durch alle JM-Konstrukte, sei es als GST- oder isoliertes Konstrukt, gehemmt wird, dies aber zu keinem inhibierenden Einfluss in der Substratphosphorylierung der inaktiven Kinase IRKD-D/A führt, sondern zur einer Steigerung des Phosphattransfers auf das Substrat, wenn

man nur die Experimente mit den isolierten JM-Domänen berücksichtigt. Es kann gut sein, dass man anfangs (vgl. Abb. 4.25) keinen Effekt in der Substratphosphorylierung der Kinase sehen konnte, da eine Maskierung durch den GST-Anteil vorhanden gewesen ist.

5 Diskussion

5.1 Die α D-Helix als neues Target für die Kinaseregulation

Da Proteinkinasen im Organismus Schlüsselereignisse wie Zellproliferation, Migration und Überleben regulieren, führen Defekte in der Regulation der Kinaseaktivität oft zur Bildung von Tumoren und nachfolgend zur Aufrechterhaltung der Tumorphysiologie [Blume-Jensen und Hunter, 2001]. Aus diesem Grund hat sich die zielgerichtete Inhibition von Proteinkinasen zur attraktiven Strategie in der Krebsbehandlung entwickelt und verspricht eine verbesserte Wirksamkeit, ohne die toxischen Nebenwirkungen von bisher gebräuchlichen Krebsmedikamenten [Cohen, 2002; Dancey und Sausville, 2003; Gschwind et al., 2004]. Gegenwärtig werden bei der Inaktivierung von Krankheits-relevanten Kinasen ATP-kompetitive, niedermolekulare Inhibitoren verwendet, welche die enzymatische Aktivität blockieren und dadurch mit der Phosphorylierung von zellulären Substraten interferieren. Dieser Ansatz hat aber zwei große Schwächen. Erstens ist die ATP-Bindestelle von Kinasen relativ gut konserviert und daher ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass ein Inhibitor mehrere Kinasen gleichzeitig hemmt, obwohl dieser aufgrund von Daten aus Kristallstrukturen hochspezifisch erscheint. Außerdem muss diese Art von Inhibitoren gegen millimolare ATP-Konzentrationen in der Zelle konkurrieren [Bain et al., 2003; Godl et al., 2003]. Der zweite Grund, warum diese Strategie ungeeignet ist, ist folgender. Früher oder später führt eine therapeutische Inaktivierung von essentiellen Proteinen (und das sind Kinasen meistens) zu einem selektiven Druck, analog wie in der natürlichen Selektion, der die Tumorzellen zwingt Mechanismen der Resistenz zu entwickeln. Diese können z.B. die Entwicklung von Inhibitor-resistenten Kinasevarianten, der Umleitung der zellulären Funktion in alternative Pfade und der Anstieg in der Expression von Transportern sein, welche den Efflux der Inhibitoren aus der Zelle steuern. Prominente Beispiele für diese Resistenzbildung sind die Kinaseinhibitoren Gleevec und Iressa. Gleevec bindet u. a. an Abl, c-Kit und den *platelet-derived growth factor receptor* (PDGF-R) [Capdeville et al., 2002]. Der Einsatz von Gleevec hat sich besonders in einer bestimmten Leukämie-Art (CML, chronic myeloid leukaemia) bewährt. CML wird durch das Onkogen Bcr-Abl, einem Fusionsprotein aus *breakpoint cluster region* und *abelson tyrosine kinase*, hervorgerufen [Faderl et al., 1999]. Bei Bindung bildet die Hydroxylgruppe des Thr 315, dem so genannten „Gatekeeper“-Rest von Bcr-Abl eine essentielle Wasserstoffbrücke mit Gleevec (s. Abb. 5.1a). Eine der am häufigsten vorkommenden Mutationen in Gleevec-resistenten CML-Patienten ist die T315I-Substitution. Durch die Einführung der großen Isoleucin-Seitenkette an dieser Position kann

Gleevec nicht mehr binden [Gorre et al., 2001]. Der EGFR-Inhibitor Iressa wurde zunächst zur Behandlung von *non-small-cell lung cancers* (NSCLCs) zugelassen [Muhsin et al., 2003], konnte aber keine signifikante lebensverlängernde Wirkung aufweisen. Auch im EGFR befindet sich ein dem Thr 315 äquivalenter Rest, Thr 766, welcher absolut notwendig ist für die Interaktion mit dem Inhibitor (s. Abb. 5.1b). Ein Austausch an dieser Position zu Methionin führt zur Aufhebung der Bindung und damit zur Entstehung von Resistenzen [Blencke et al., 2003].

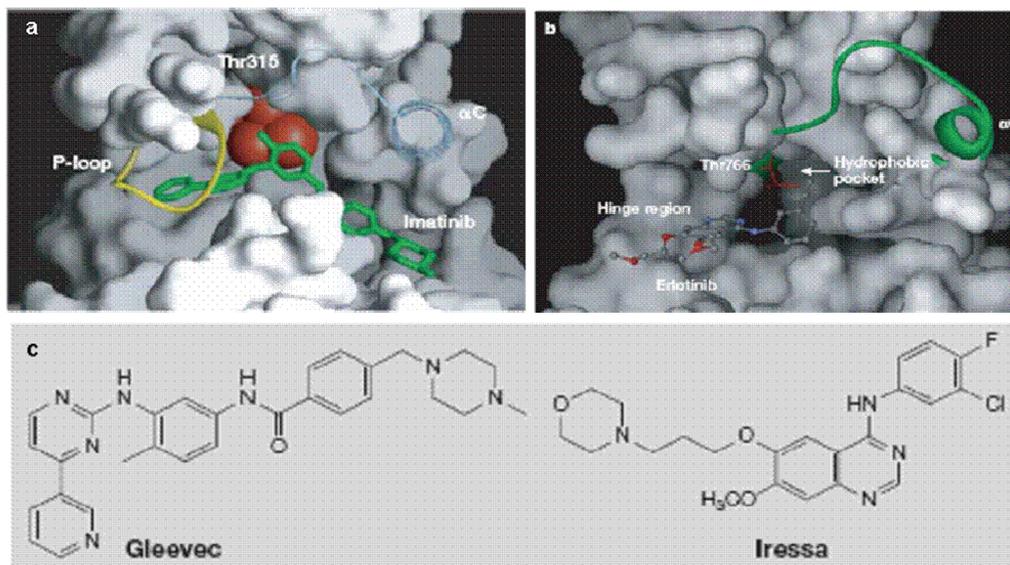


Abb. 5.1: Die Strukturen von Gleevec und Iressa im Komplex mit ihren Zielkinasen Bcr-Abl und EGFR

a, Gezeigt ist der Komplex aus Abl-Kinase und Gleevec (Imatinib). Thr 315 ist rot markiert, der P-loop ist gelb und die α C-Helix hellblau dargestellt. **b**, Abgebildet ist der Komplex aus EGFR und Erlotinib, einem Derivat von Iressa. Die Positionen von Thr 766, der hydrophoben Tasche und *hinge region* sind angedeutet. Die α C-Helix ist grün hinterlegt. **c**, Chemische Strukturen von Gleevec und Iressa. Abbildung modifiziert nach Daub et al. (2004).

Diese Beispiele verdeutlichen umso mehr, dass für eine spezifische und nachhaltige Regulation der Kinaseaktivität andere Wege eingeschlagen werden müssen. Dabei sollte sich der Fokus von der ATP-Bindestelle weg zu den intrinsischen und einzigartigen Regulationsmechanismen einer Proteinkinase hin bewegen.

Die Veröffentlichung von Schulte und Sefton (2003) ist für diese Arbeit ein Leitfaden gewesen. Die Autoren haben einen neuartigen, nicht mit ATP oder Substrat konkurrierenden Inhibitionsmechanismus bei den Kinasen der Src-Familie, verursacht durch ein kurzes Peptid (14-mer), beschrieben. Das Peptid entstammt aus einem natürlichen Interaktionspartner der Src-Kinase, dem WASP. Zwar konnte die Interaktion mit dem WASP-Peptid auf die Kinasedomäne von Src eingegrenzt werden, aber eine genaue Auskunft, welche Regionen der Kinasestruktur an der Bindung beteiligt sind, blieb aus.

Jedoch führt ein Sequenzvergleich von diesem WASP-Peptid mit den Sequenzen des Insulin- bzw. IGF-1 Rezeptor zu der überraschenden Beobachtung, dass das Peptid Identität zur α D-Helix der Kinase zeigt. 4 von den 14 Resten des WASP-Peptids sind in den Kinasen konserviert. Die α D-Helix ist Bestandteil der so genannten *hinge region*, dem Gelenk der Kinase, die den β -Faltblattreichen *N-lobe* mit dem α -helikalen *C-lobe* verknüpft. Diese Region ist äußerst flexibel und plastisch und dadurch maßgeblich an der Etablierung der katalytischen Spalte zwischen *N-* und *C-lobe* beteiligt. Munshi et al. (2003) konnten zum ersten Mal diesen Bereich der Kinase im IGF-1 Rezeptor hochauflösend in der Kristallstruktur darstellen, in dem sie die Glutamate 1067 und 1069 zu Alanin substituierten. Dies führte zu einer Versteifung dieses Bereiches. Ein weiterer Befund aus dieser Arbeit ist, dass die Kinasedomäne des IGFR über die α D-Helix zu dimerisieren neigt.

Obwohl diese Region unter den Proteinkinasen strukturell konserviert ist, bestehen wichtige Unterschiede im Detail. Abb. 5.2 zeigt ein Alignment von α D-Helices mit nachfolgender *hinge region* ausgewählter Proteinkinasen (IRK, IGFR, EGFR, c-Src, Csk und Akt). Die α D-Helix ist in einigen Resten durchweg konserviert wie im Falle des Leucin 1071 (IRK). Vergleicht man aber die Hydrophobizität der Helix im Gesamten, treten deutliche Differenzen auf. Diese ist noch innerhalb einer Kinasesubfamilie (IR/IGFR) identisch, aber je weiter man sich in der Kinasefamilie fortbewegt, desto deutlicher werden die Unterschiede sichtbar. An der Akt-Kinase, einem Vertreter der Ser/Thr-Kinasen, lässt sich das besonders gut demonstrieren (s. Abb. 5.2). Nach diesem Befund lässt sich eine Arbeitshypothese formulieren, nach der es für jede Proteinkinase spezifische Bereiche gibt, die eventuell für eine selektive Interaktion mit Kinaseregulatoren in Frage kommen.

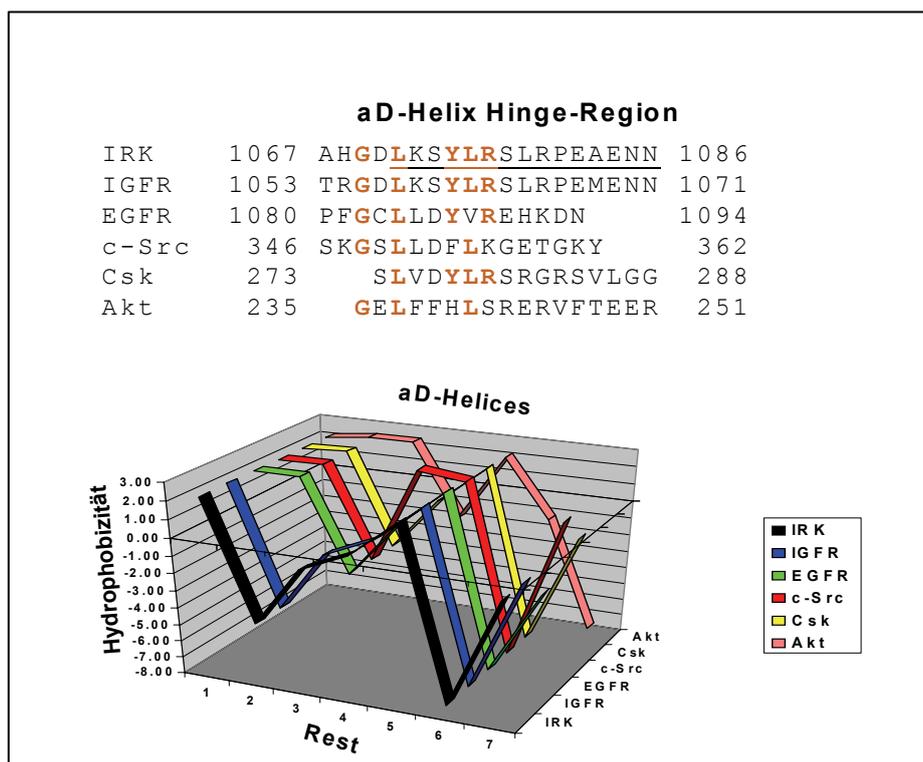


Abb. 5.2: Vergleich der α D-Helices und *hinge region* von ausgewählten Proteinkinasen

Das Alignment zeigt die Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der α D-Helix und der *hinge region* zwischen verschiedenen Kinasen: IRK= Insulinrezeptorkinase; IGFR= IGF-1 Rezeptorkinase; EGFR= EGF-Rezeptorkinase; c-Src= zelluläre Src-Tyrosinkinase; Csk= C-terminale Src-Kinase; Akt= Proteinkinase B. Das 3D-Diagramm stellt die Hydrophobizität der α D-Helices von den betrachteten Kinasen dar – Skala von maximal hydrophob (+3) bis maximal hydrophil (-8).

In der Tat konnte ich mit einem von der α D-Helix des IR abgeleiteten Peptid (AS 1067-1086) die Autophosphorylierung der N- und C-terminal trunkierten Kinase des IGFR signifikant inhibieren. Während ohne Peptidzugabe die Kinase nur noch zu ca. 25 % unphosphoryliert vorliegt, sind es mit dem Peptid > 70 %. Die eingesetzten Peptidkonzentrationen von max. 210 μ M lagen weit unter der, die Schulte und Sefton (2003) für ihr WASP-Peptid [1 – 3 mM] verwendet haben. Leider geben die Autoren nicht an, in welcher Konzentration sie die Src-Kinase im Assay vorlag, so dass man keine Rückschlüsse auf das Verhältnis von Kinase zu Inhibitor machen kann. Dennoch war das von mir gewählte Verhältnis von 1:50 mehr als ausreichend, um den IC_{50} -Wert zu überschreiten. Das Kontrollpeptid mit einer randomisierten Sequenz vermochte keine Inhibition hervorzurufen, hatte sogar einen leicht aktivierenden Einfluss in der Autophosphorylierung der IGFR-VK Kinase. Dies ist aber konform mit der Arbeit von Schulte und Sefton (2003), von der ich die Zufallssequenz übernommen habe, die auch einen leicht aktivierenden Effekt des Kontrollpeptids feststellten.

Das Inhibitionsvermögen des α D-Peptids äußerte sich auch sehr stark in Substratphosphorylierungen, die von den dimeren Kinasekonstrukten des IR und IGFR, welche für ihre gesteigerte Aktivität bekannt sind [Baer et al., 2001], katalysiert werden. Hier konnte bereits mit einer Peptidkonzentration von 25 μ M der IC_{50} -Wert erreicht werden. Es ist nicht verwunderlich, dass das Peptid beide Kinasen mit der gleichen Wirksamkeit inhibiert. Der IR unterscheidet sich in dieser Region (AS 1067-1086) von dem IGFR nur in einer Aminosäure (vgl. Abb. 4.1). Das verwendete artifizielle Substrat polyGluTyr ist ein zufälliges Kopolymer von Glu und Tyr im Verhältnis 4:1. Es besitzt keine definierte Phosphorylierungsstellen oder eine hoch geordnete Struktur und wird als typisches Substrat für Tyrosinkinasen benutzt. Die Aktivität gegenüber polyGluTyr wird als generelle Kinaseaktivität betrachtet [Lee et al., 2003]. Allerdings gibt es bis heute noch keinen Befund darüber, wie oder wo genau dieses artifizielle Substrat bindet. Jedoch zeigte Al-Hasani (1995), dass polyGluTyr im Vergleich zu physiologischen Substraten wie z.B. IRS-1-p30 oder dem isolierten C-Terminus des IR, einen fast 20-fachen höheren K_M -Wert aufweist. Trotz erhöhter Einbaurrate stellte polyGluTyr das „ineffizienteste“ Substrat dar. Ein möglicher Grund dafür könnte eine unspezifische Bindung von polyGluTyr an die Kinase sein.

Die Autophosphorylierung der GST-Kinasen wurde im Gegensatz zur monomeren IGFR-VK Kinase von dem α D-Peptid sehr wenig oder gar nicht beeinträchtigt (Daten nicht gezeigt). Es stellt sich deshalb die Frage, warum die Autophosphorylierung der monomeren Kinase in Gegenwart des α D-Peptids so drastisch inhibiert ist und bei den dimeren GST-Konstrukten nicht. Dies lässt sich nur mit einer fehlenden Zugänglichkeit der GST-Kinasen für das α D-Peptid erklären. Der GST-stimulierende Effekt und die damit verbundene produktive Dimerformation scheint „resistent“ gegen die perturbierende Wirkung des Peptids zu sein, wenn man nur die Autophosphorylierung betrachtet. Es kann aber auch sein, dass durch die GST-Dimerisierung es zu fixierten Kinasedimeren kommt, die dann jeglicher Regulation von Außen widerstehen.

Dennoch ist die Transferaseaktivität der GST-Kinasen auf das Substrat polyGluTyr beeinträchtigt. Wenn man annimmt, dass für die Bindung von Substraten nur die von Hubbard (1997) beschriebene α D-Helix / *hinge region* in Frage kommt und dort auch die Interaktion des α D-Peptids stattfindet, dann kann man postulieren, dass die Peptidwirkung direkt auf das Kinasegelenk Einfluss nimmt. Die Folgen daraus wären eine Konformationsänderung der Kinase. Aber auch eine Destabilisierung der katalytischen Spalte und damit des aktiven Zentrums wäre denkbar. Im Falle der GST-Kinasen wirkt sich dies nur negativ auf die Substratphosphorylierung aus. Im Kontrast zu der GST-Kinase, welche ihren Interaktionspartner und zugleich ihr „Substrat“ aufgrund der künstlichen Dimerisierung schon vorliegen hat, muss die monomere Kinase in der Autophosphorylierung ihren Interaktionspartner erst einmal in der Lösung treffen, erkennen und binden, also „klassisch“ mit ihrem Substrat interagieren. Wenn man annimmt, dass bei diesem Prozess die α D-Helix involviert ist, dann lässt sich die beobachtete Inhibition so erklären. Die freie α D-Helix würde dann entweder mit der Kinasedomäne um Interaktionsstellen konkurrieren oder die Kinase über die α D-Helix so binden, dass eine für Dimerisierung ungünstige Konformation eingenommen wird. In beiden Fällen wäre als Konsequenz eine Retardierung der Autophosphorylierung zu erwarten. Und genau dies ist der Fall. Interessanterweise konnte das α D-Peptid nur seine Wirkung entfalten, nachdem es mit der Kinase vor Beginn der Phosphorylierung 45 min. bei 4°C vorinkubiert wurde. Ohne diese Vorinkubation konnte man keinen Effekt feststellen. Auch in der Arbeit von Schulte und Sefton (2003) wurde mit dem inhibitorischen WASP-Peptid lange (1h) vorinkubiert. Dieser Tatbestand spricht nicht für eine direkte Konkurrenz der Peptide um freie Interaktionsstellen, sondern eher eine nachhaltige Wirkung auf die Konformation der Kinase, welche dann das Enzym unproduktiv und inaktiv hält.

Die spezifische Wirkung des α D-Peptid konnte ich ebenfalls aufzeigen, indem ich eine vergleichbare Substratphosphorylierung mit einer Ser/Thr-Kinase (GST- Δ PH Akt2; Baer et al., 2005) durchführte. Die Anwesenheit des Peptids störte nicht den Phosphat-Transfer in

ein physiologisches Substrat. Jedoch muss erwähnt werden, dass für die Akt-Kinase bis heute keine Proteinkomplexe beschrieben, welche über die α D-Helix vermittelt werden. Stattdessen kennt man bei der Akt Kinase die Oligomerisierung über die PH (*pleckstrin homology*)-Domäne [Datta et al., 1995; Kunstle et al., 2002]. Datta und Mitarbeiter fanden die Ausbildung von Akt-Proteinkomplexen, die sehr spezifisch über die PH-Domäne ausgebildet worden sind und *in vitro* die Akt Kinase aktivierten. Interessant zu vermerken ist, dass die Interaktion auf den C-terminalen Teil der PH-Domäne begrenzt werden konnte. Dieser formt eine amphipatische Helix.

Zurückkommend auf die monomere IGFR-VK Kinase ergab die Bestimmung des IC_{50} -Wertes einen Wert von 30 μ M für das α D-Peptid. Die Art der bzw. der Mechanismus der Inhibition konnte auch aufgeklärt. Die Bestimmung der K_M -Werte für ATP und das Substrat polyGluTyr demonstrierte, dass der Inhibitionsmechanismus ein nicht-kompetitiver sein musste. Der K_M -Wert für ATP lag ohne Peptid bei 240 μ M und mit bei 155 μ M, somit kann man von keinem signifikanten Unterschied sprechen. Während für polyGluTyr die K_M -Werte mit 0,51 (ohne Peptid) und 0,6 μ g/ μ l (mit Peptid) nahezu identisch waren. In der Tab. 4.1 sind die kinetischen Daten zusammengefasst.

Aufgrund der Ergebnisse lässt sich postulieren, dass das α D-Peptid die Kinasedomäne bindet und dadurch die Aktivität beeinträchtigt. Nun ist die Aktivität der IR- bzw. IGFR-Kinase abhängig von der Dimerisierung. Unsere Arbeitsgruppe zeigte, dass die Aktivität bereits mit Dimerisierung der Kinasedomänen induziert wird [Baer et al., 2001]. Die über GST-dimerisierten Kinasen sind um den Faktor 100 aktiver als ihre monomeren Gegenstücke. Allerdings lassen sich die monomeren Kinasekonstrukte allein durch Erhöhung der Konzentration (> 10 μ M) in ihrer Aktivität steigern [Schmolz, 2002]. Falls das α D-Peptid mit dem produktiven Dimerisierungsprozess wechselwirkt und das ist sehr wahrscheinlich auch aufgrund von Strukturdaten vom IGFR [Munshi et al., 2003], dann wird damit auch die Aktivität der Kinase beeinträchtigt. Um diese Frage zu beantworten wurde das Experiment so durchgeführt, dass die monomere IGFR-VK Kinase vor Inkubation mit dem α D-Peptid und Substratzugabe in hoher Konzentration vorphosphoryliert wurde. Bei diesem Procedere war die inhibitorische Wirkung des Peptids in der Substratphosphorylierung von polyGluTyr aufgehoben. Nun kann man nicht sagen, wo das artifizielle Substrat mit der Kinase interagiert und ob die α D-Region dafür benötigt wird. Jedenfalls bei Wiederholung des Experiments mit einem physiologischen Substrat, hat sich die α D-Helix als Substraterkennungsregion entlarvt. Wie durch verschiedene Arbeitsgruppen beschrieben ist, kann es neben der Homodimerisierung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu Hybriden, bestehend aus Monomeren des IR und IGFR kommen [Treadway et al., 1989; Chin et al., 1991; Seely et al., 1995]. Somit fiel die Wahl des Substrats auf die inaktive Kinasemutante IRKD-D/A. Diese Kinasemutante beinhaltet mehrere Phosphorylierungsstellen, die von einer

aktiven Wildtyp-Kinase in trans phosphoryliert wird. Zuvor muss aber eine Dimerisierung erfolgen wie oben erwähnt, damit anschließend eine Phosphorylierung stattfindet. Die Phosphorylierung der IRKD-D/A Kinase zeigt Michaelis-Menten-Kinetik und erreicht eine Initialgeschwindigkeit im Phosphateinbau, die vergleichbar der des aktiven Enzyms ist; die aktive Kinase wird dabei nicht durch die IRKD-D/A inhibiert [Kessler, 1998]. Der Austausch der katalytischen Base führte somit zu einer inaktiven Kinase, die ein „perfektes“ physiologisches Substrat der aktiven Kinase darstellt. Mit der Zugabe an α D-Peptid in steigender Konzentration bei der Substratphosphorylierung von der IRKD-D/A stieg die Inhibition direkt proportional. Der IC_{50} -Wert erhöhte sich aber um das Fünffache auf 150 μ M. In der Literatur wird die α D-Helix und *hinge region* von Kinasen als Erkennungs- und Bindestelle für Substrate beschrieben [Hubbard, 1997; Lee et al., 2003]. Die bislang höchste Substratspezifität findet sich bei der C-terminalen Src-Kinase (Csk). Die Csk phosphoryliert nur das Tyrosin im C-Terminus von Src-Kinasen, welches in der Konsensussequenz TATEXQYQXQ/G liegt. Peptide die nur dieses Motiv enthalten, werden mit 1/1000stel der Aktivität, verglichen mit dem gesamten Src-Substrat, von der Csk phosphoryliert [zusammengefasst in Roskoski, 2004]. Sondhi et al. (1998) haben über eine Peptidbibliothek ein optimales Substrat für die Csk mit der Sequenz EEEIYFFF ermittelt. Dieses Substrat wird fast genauso gut wie Src von der Csk phosphoryliert, aber hat nur noch wenig Ähnlichkeit zum physiologischen Substrat. Diese Studien drängen den Verdacht auf, dass außer dem C-Terminus von Src zusätzliche Kontakte zwischen Csk und Src für die Substraterkennung wichtig sind. Lee und Mitarbeiter haben für die Csk-Kinase diese Region über Alanin-Scanning untersucht und festgestellt, dass für eine Bindung und effiziente Phosphorylierung des physiologischen Substrats, der Src-Kinase, sechs Aminosäuren in dieser Region (α D-Helix und *hinge region*) essentiell sind. Diese waren S273, R279, S280, R281, R283 und F382. Die meisten dieser Reste sind zwischen Csk und Chk (Csk-homologe Kinase) konserviert, einer weiteren Kinase, die nur den C-Terminus der Src-Kinase phosphoryliert. Eine davon, das Arg 281, ist sogar in der IRK-Sequenz zu finden (s. Abb. 5.2). Die katalytische Aktivität der Csk in der Phosphorylierung von Src reduzierte sich drastisch nach Austausch dieser Aminosäuren zu Alanin, was sich in einer 20-fachen Erniedrigung des Verhältnisses von k_{cat}/K_M im Vergleich zum Wildtyp äußerte. Im Gegensatz dazu war bei allen Csk-Kinasevarianten die Phosphoryltransferase-Aktivität gegenüber polyGluTyr nicht beeinträchtigt. Diese Resultate bestätigten die in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese, dass die α D-Helix (und nachfolgende *hinge region*) für eine Erkennung und Dimerisierung mit dem physiologischen Substrat auch bei den IR/IGFR Kinasen notwendig ist. Diese Hypothese wird noch bekräftigt, indem die Autoren mithilfe von GST-*pull down* assays den Komplex zwischen Csk und Src, der 1:1 vorlag, isolieren konnten. Analog zu meiner Vorgehensweise haben Lee et al. (2003) bei Verwendung eines Peptids, welches der

α D-Helix von Csk entsprach, in Substratphosphorylierungen mit Src-Substrat, eine Inhibition der Katalyse beobachtet mit einem IC_{50} -Wert von 21 μ M.

Unerwarteterweise stellte sich daraus, dass bei den Csk-Mutanten der k_{cat} stärker betroffen war als der K_M . Lee und Mitarbeiter gehen davon aus, dass die Interaktion über die α D-Helix kritisch ist für die Erhaltung des Übergangszustandes des Csk-Src-Komplexes in der Phosphorylierungsreaktion, was in Endeffekt eine Herabsetzung des ΔG^* -Wertes bedeuten würde. Schlussfolgernd betonen die Autoren die Feststellung, dass aufgrund von Vergleichen von Kinasen in der Primär- und Tertiärstruktur der α D-Helix diese hochvariabel ist und als eine Schlüsselstruktur für eine Substratspezifität in Frage kommt.

Der Vergleich der Inhibition der IGFR-VK Autophosphorylierung über die Peptide WASP 81-94, α D-IGFKD-EE/AA und dem Original α D-Peptid (IR) wies eine geringfügige Modulierbarkeit über die Sequenz des Peptids auf. Es zeigte sich, dass auch das Peptid WASP 81-94 inhibierend wirkte, und dass die Doppelmutation in der α D-Helix E1067/E1069 [Munshi et al., 2003] zu Alanin den wirksamsten Inhibitor lieferte. WASP 81-94 ist zum Teil mit der α D-Helix konserviert (s. Abb. 4.1), was auf ähnliche Eigenschaften im Effekt auf die Kinase hinweist. Spekulativ könnte man sich auch auf eine bisher noch nicht bekannte Interaktion des WASP Proteins und der IR/IGFR Kinase vorstellen. Bei der Doppelmutation führte der Austausch zu einer Versteifung bzw. Ordnung in der *hinge region*. Die Autoren führen dies auf eine Aufhebung von Ladungsabstoßungen zurück. Die Wirksamkeit aller Peptide in der Inhibition ist auch die größte Schwierigkeit, die es noch zu lösen gilt. Es kann zur Zeit nicht zwischen dem IR und dem IGFR differenziert werden aufgrund der nahezu 100 %igen Identität in der α D-Helix und *hinge region*.

Mehrere Experimente deuteten auf eine schwache Wechselwirkung der α D-Helix mit der Kinasedomäne. Beispielsweise führte eine Erwärmung des Peptids auf 37°C für 20 min. und anschließender Inkubation mit der Kinase zu keiner Inhibition, was auf eine Thermolabilität hinweist. Die Wechselwirkung scheint eine geordnete Struktur des Peptids zu benötigen.

Mithilfe von CD-Messungen konnte ich feststellen, dass das α D-Peptid Struktur besaß und nicht wie das Kontrollpeptid ein Signal ergibt, welches auf Zufallsknäuel zurückzuführen ist. Bedauerlicherweise lies sich aber eine eindeutige helikale Struktur nicht ableiten, da Hintergrundsignale eine genaue Interpretation unmöglich machten. Versuche diese Störfaktoren mit weiteren Aufreinigungen über *Reversed-phase* HPLC und Umpufferung des Peptids in reines Wasser schlugen fehl. Allerdings beschreibt eine andere Arbeitsgruppe, die einen ähnlichen Ansatz mit α -helikalen CDK-inhibierenden Peptiden verfolgt, dass deren Peptide im reinen Wasser nicht gefaltet waren [Gondeau et al., 2005]. Die Autoren verwendeten bei ihren CD-Messungen PBS-Puffer. Ich schließe diese Fehlerquelle aus, da ich bei dem α D-Peptid kein Signal, was auf Zufallsknäuel hin deutet, gesehen habe. Sehr

wahrscheinlich sind die Peptide von der Synthese her mit Schutzgruppen behaftet wie z.B. der Trityl-Gruppe, die im Fern-UV-CD-Spektrum (185 bis 250 nm) sehr stark absorbieren.

Eine andere Begründung für das nicht eindeutige helikale Signal bei der CD-Spektroskopie könnte auch darin bestehen, dass sich die Struktur des α D-Peptids erst durch Bindung an die Kinasedomäne ganz ausbildet, also man von induzierter Faltung ausgehen muss.

Die in meiner vorgestellte Strategie eine effektive Kinaseregulation zu etablieren, indem man bekannte physiologisch relevante Protein-Protein-Wechselwirkungen gebraucht, um eine spezifische Inhibition der Kinaseaktivität zu erlangen, findet auch in der Literatur mehr und mehr Anklang. So ist dieses Jahr eine Arbeit publiziert worden, in der die Inhibition der CDK2 Kinase vorgestellt wird [Gondeau et al., 2005]. Die Autoren stellen ein 22-mer Peptid vor, das sich von der α 5-Helix von Cyclin A ableitet. Die Funktion von Cyclin A ist durch Interaktion mit der CDK2-Kinase eine strukturelle Reorganisation der Kinase zu induzieren. Dies umfasst die Neuordnung der PSTAIRE-Helix (α C-Helix) von der CDK2-Kinase und eine Neupositionierung der *N*- und *C*-lobes der Kinase zueinander. Die α 3- und α 5-Helices des Cyclin A wirken dabei wie eine Klemme auf die PSTAIRE-Helix, welche so für eine produktive Bindung von ATP festgehalten wird. Die dafür relevanten Wechselwirkungen sind von hydrophober Natur, aber auch Wasserstoffbrücken spielen eine wichtige Rolle.

Dieses inhibitorisch wirkende Peptid bildet einen stabilen Komplex mit CDK2-Cyclin2 und ist ein Prototyp eines CDK-Inhibitors, der nicht mit ATP konkurriert. Zusätzlich hat dieser Inhibitor sein therapeutisches Potential *in cellulo* bewiesen. Durch Kupplung mit dem Zell-durchdringenden Tat-Peptid wurde die Proliferation der Tumorzellen in einer Dosis-abhängigen Weise blockiert. Allerdings wissen die Autoren nicht genau, wo dieses helikale Peptid mit dem CDK2-Cyclin A-Komplex interagiert. Da aber der Inhibitor mit physiologischen Substraten konkurriert, vermuten sie zumindest, dass einige Bereiche der Substratbindestelle in Frage kommen.

Gamboni et al. (1998) haben für die Proteinkinase A (PKA) bereits synthetische Peptide entwickelt, die der der N-terminalen A-Helix entsprechen. Diese A-Helix ist allerdings nicht durchweg in den Kinasen vorhanden. Im Falle der PKA aber scheint sie aber auch eine Rolle bei der Determinierung der physiologischen Substrate zu haben, wie die Autoren in ihrer Arbeit postulieren. Nach einem Substrat-kompetitiven Mechanismus inhibieren diese Peptide die PKA Kinase aber das mit einem sehr hohen IC_{50} -Wert von 650 μ M. Die Autoren nehmen an, dass die A-Helix, welche über einen flexiblen Linker mit dem restlichen *N*-lobe verbunden ist, so rotieren kann, dass sie in Kontakt mit dem aktiven Zentrum der Kinase kommt. Nach Competition mit *bona fide* Substraten kann die A-Helix aber leicht verdrängt werden. Eine mögliche Bedeutung dieses Mechanismus könnte in der Prävention der Bindung von unspezifischen Substraten an das aktive Zentrum liegen. Jedoch sind bis heute Strukturdaten, die diesen Mechanismus bekräftigen, ausgeblieben.

Erst kürzlich ist ein Review erschienen, indem eine Antwort auf die Frage gesucht wird, wie Proteinkinasen es schaffen können, ihre Substrate spezifisch zu erkennen und zu phosphorylieren [Biondi und Nebreda, 2003]. Anhand von Beispielen aus der Ser/Thr-Kinasefamilie werden Mechanismen erläutert, die eine Substratspezifität gewährleisten. Die vorgestellten Kinasen sind auf direkte „*docking*“ Interaktionen angewiesen, welche außerhalb der Phosphoakzeptorsequenz liegt. Viele Substrate der MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) wie das c-Jun besitzen eine *kinase-docking* Domäne (D-Domäne), die etwa 100 AS von der zu phosphorylierenden Stelle entfernt gelegen ist. Die Substrate der PDK1 (*3-phosphoinositide dependent protein kinase-1*) verfügen über ein hydrophobes Motiv, mit denen sie spezifisch an die PDK1 binden können. Die Interaktion findet in der PIF-Tasche (*PDK1-interacting fragment*) von der PDK1 statt. Diesen „*docking sites*“ ist gemeinsam, dass sie in N- und C-terminalen Ausdehnungen von dem aktiven Zentrum der Kinase liegen, und dass sie für eine effiziente und spezifische Phosphorylierung der Substrate unerlässlich sind. Dieses Prinzip der spezifischen Substraterkennung und –bindung ist keinesfalls auf Kinasen beschränkt. Auch bei der dualen Phosphatase Cdc25B spielen solche *docking sites* bei der Substraterkennung eine wichtige Rolle. So stellten Sohn et al. (2004) fest, dass zwei Reste Arg 488 und Tyr 497, die über 20 Å von dem aktiven Zentrum der Cdc25B Phosphatase entfernt liegen, essentiell sind für eine spezifische Erkennung ihrer Substrate, den CDK Kinasen. Bei Substitution dieser *hot spots*, wie von den Autoren bezeichnet, kommt es zu einer signifikanten Steigerung des K_M -Wertes ohne die Aktivität des Enzyms gegenüber Peptidsubstraten zu beeinträchtigen.

5.2 Darstellung und Charakterisierung der R1092Q-Kinase

Die Funktionen der α D-Helix und der *Hinge*-Region sind wie bereits erwähnt u.a. die Erkennung und Bindung von Substraten [Hubbard, 1997; Lee et al., 2003]. Dabei fällt auf, dass in dieser Region ein Cluster von basischen Aminosäuren vorhanden ist, der exponiert vorliegt. Die Abb. 5.3 stellt die betroffenen Regionen für die IR Kinase (Abb. 5.3A) und der Csk Kinase (Abb. 5.3B) dar.

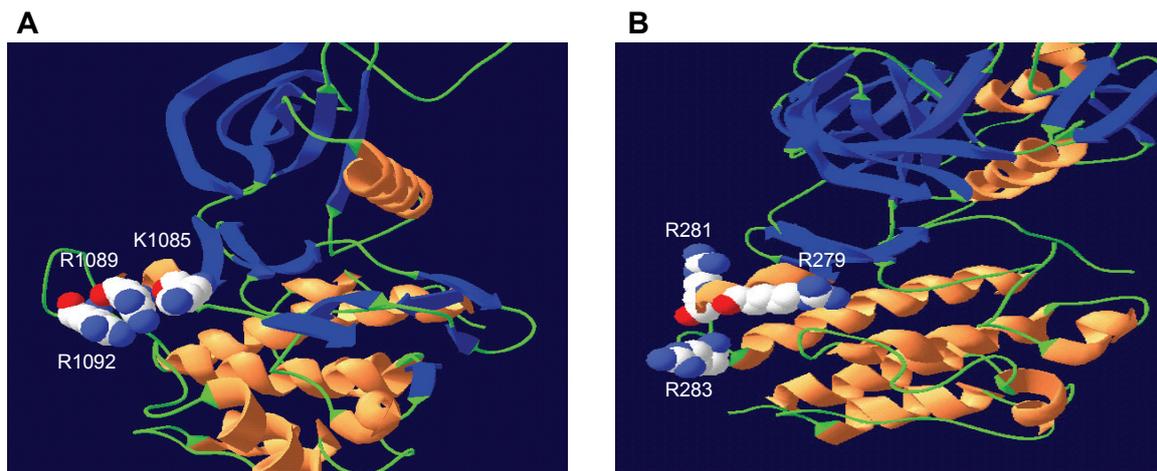


Abb. 5.3: Vergleich des basischen Cluster in der *hinge region* der Kinasen IRK und Csk

(A) Struktur der IRK (Insulinrezeptorkinase; PDB code 1IR3; Hubbard, 1997) mit den Resten K1085, R1089 und R1092 der *hinge region*. (B) Das Bild zeigt die *hinge region* der Csk Kinase mit den Resten R279, R281 und R283 (PDB code 1K9A; Ogawa et al., 2002).

Bei der IRK sind die Reste K1085, R1089 und R1092 wie auf einer Stange hintereinander angeordnet, während der basische Cluster (R279, R281 und R283) in der Csk in einer Dreiecksform angeordnet ist. In der IRK wird die Mutation R1092 zu Tryptophan oder Glutamin mit einer schweren Form der Insulinresistenz in Verbindung gebracht [Desbois-Mouthon et al., 1996; Takahashi et al., 1997]. Insbesondere Takahashi und Mitarbeiter zeigten, dass die R1092Q-Substitution zu einer erheblichen Reduzierung der Kinaseaktivität und nicht zur Phosphorylierung von IRS-1 nach Insulin-Stimulierung führte.

Um diese Untersuchungen auch *in vitro* durchzuführen, habe ich diese Kinasemutante (GST-IRK Δ 72C-R1092Q) hergestellt und aufgereinigt. Die von Takahashi et al. (1997) beschriebene Aktivitätsminderung konnte ich in der Autophosphorylierung der R1092Q-Kinasemutante bestätigen, wenn niedrige Konzentrationen [1 – 2 μ M] an Kinase verwendet worden sind (vgl. Abb. 4.14). Die Initialgeschwindigkeit ist mit 1 mol Phosphat/min*mol Kinase nur halb so schnell wie beim Wildtyp. Aber der eigentliche verblüffende Befund war, dass die Mutante mit 1 mol/mol insgesamt weniger Phosphat eingebaut hatte als der Wildtyp (~2,5 mol/mol). Damit schien es, dass mindestens eine Phosphorylierungsstelle in der Kinasemutante nicht mehr zugänglich war.

Dies wurde auch in einem Vergleich der Autophosphorylierung mit einer der Y972F-Kinasemutante (GST-IRK Δ 72C-Y972F; Karau, 2004) bestätigt. Bei der Y972F-Mutante ist eine Autophosphorylierungsstelle in der Juxtamembran-Domäne entfernt worden und somit unterscheidet sie sich markant in ihrem Phosphateinbau von der Wildtyp-Kinase. Mit maximal 1,3 mol/mol erreichen die beiden Kinasemutanten den gleichen Phosphateinbau. Aufgrund von unterschiedlichen Konzentrationen der Kinasen (WT, R1092Q und Y972F) im Assay, ist eine Aussage über die Initialgeschwindigkeit nicht möglich (vgl. Abb. 4.15). Um

eventuelle Artefakte über die GST-Dimerisierung auszuschließen, wurden dann die drei Kinasen (s.o.) nach Thrombinbehandlung von GST getrennt und die monomerisierten Kinasen anschließend über Ionenaustauscher aufgereinigt (s. 7.7.3). Der Vergleich der konzentrationsabhängigen Autophosphorylierung von IRKΔ72C und IRKΔ72C-R1092Q in der native PAGE demonstrierte, dass in der Mutante eine Phosphorylierungsstelle weniger vorhanden ist. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die R1092Q-Mutante sehr viel höhere Konzentrationen [4-8 μM] als der Wildtyp benötigt, um alle Phosphorylierungsstufen zu erreichen und damit maximal aktiv zu werden. In einer weiteren Autophosphorylierung mit hoher Kinasekonzentration [8 μM] stellte sich unerwartet heraus, dass die Initialgeschwindigkeiten des Wildtyps und der R1092Q-Kinase sich diesmal gleichen. Außer bei der Y972F-Mutante wurde auch derselbe Phosphateinbau mit max. 1 mol/mol erreicht. Dies war ein starkes Indiz dafür, dass die vorher beobachteten Defekte in der Autophosphorylierung auf ein konzentrationsabhängiges Phänomen zurückzuführen sind und die R1092Q-Kinase eine intrinsische Dimerisierungsschwäche besitzt. Sogar der sonst stark aktivierende Einfluss der GST-Dimerisierung konnte die Defekte in der Aktivität der R1092Q-Kinase nicht aufheben. Somit kann das GST-Dimer mit dem funktionslosen Holorezeptor bei Takahashi et al. (1997) verglichen werden, wo auch ein präformiertes Dimer vorliegt. Ein Vergleich der Substratphosphorylierung *in vitro* von Wildtyp- und R1092Q-Kinase zeigt, dass bei Verwendung eines physiologischen Substrates (IRKΔD/A; Corona, 1999), welches vor Phosphorylierung erst dimerisieren muss, der Phosphat-Transfer bei der R1092Q-Kinase dramatisch vermindert ist (bis zu 80 %). Somit scheint eine Transphosphorylierung zwischen den Kinasen behindert zu sein. Gleichzeitig konnte ich aber keine Defekte in der Substratphosphorylierung der R1092Q-Mutante *in vitro* feststellen, wenn als Substrate entweder polyGluTyr oder ein physiologisches Substrat (GST-IRS1p30; Siemeister et al., 1995), welches sich vom IRS-1 ableitet, verwendet wurden. Beim Substrat GST-IRS1p30 war sogar die R1092Q-Mutante die effizientere Kinase. Takahashi et al. (1997) konnten demnach eine IRS-1 Phosphorylierung *in vivo* nicht nachweisen, da sie es mit defekten Holorezeptoren zu tun hatten, die sich nicht mehr aktivieren ließen. Das von mir verwendete GST-IRS1p30 ist nicht mit dem Volllängen-IRS-1 Protein zu vergleichen, da es unter anderem nicht über wichtige Bereiche, wie der PTB (Phosphotyrosin-bindende)-Domäne, die zur Interaktion mit der Kinase notwendig sind [Gustafson et al., 1995], verfügt. Dessen ungeachtet sind aber Studien bekannt, die eine Interaktion des IRS-1 mit der Kinase dokumentieren, die nicht über die PTB-Domäne vermittelt werden [Siemeister et al., 1995; McGettrick et al., 2005].

In einer Studie von McHarg et al. (1999) mit der Phosphoglyceratkinase (PGK) von *S. cerevisiae* wurde auch die *hinge region* über eine Punktmutation verändert. Die Autoren haben die Funktion des Prolins 205 untersucht, indem sie diesen Rest zu Histidin

substituierten. Sie stellten fest, dass dadurch dieses Enzym im Gelenkmechanismus beeinträchtigt war. Der Umsatz und die Effizienz dieser Kinasemutante waren vermindert und zudem war die Faltung des Enzyms gestört. McHarg und Mitarbeiter folgern aus ihren Ergebnissen, dass die *hinge region* maßgeblich an der Stabilität und Katalyse der Kinase beteiligt ist. Zwar besitzt der Insulinrezeptor kein Prolin in dieser Position, aber die generelle Funktion der *hinge region* ist übertragbar. Die R1092Q-Mutation hat ambivalente Konsequenzen. Zum einen ist die Kinasemutante immer noch fähig, Substrate zu binden und zu phosphorylieren, aber hat große Defizite als Interaktionspartner sich selbst oder die IRKD-D/A zu erkennen und zu phosphorylieren. Dies weist auf eine gestörte und zumindest schwache nicht für eine Katalyse ausreichende Dimerisierung hin. Selbst die künstliche Dimerisierung über GST führte nicht zu einem voll aktivierbaren Enzym im Vergleich zum Wildtyp. Es wäre natürlich sehr interessant, die Konformation dieser Mutante zu kennen. Eventuell muss in diesem Fall ausgehen, dass das GST-Konstrukt unter Umständen eine ungünstigere Konformation annimmt als die monomere R1092Q Kinase. Der Mangel im Dimerisierungsprozess und damit in der Autophosphorylierung kann im Falle der monomeren Kinase durch den Einsatz hoher Konzentrationen (ab 8 μM) an der R1092Q-Kinase in Phosphorylierungsreaktionen ausgeglichen werden. Ein möglicher Effekt der R1092Q-Substitution wäre dann eine Erhöhung der Dissoziationskonstante K_D der Kinase.

5.3 Der Einfluss der JM-Domäne auf die Kinaseaktivität

Die Mutagenese der invarianten Bindetasche in der JM-Domäne des IR und IGFR konnte erfolgreich durchgeführt werden. Das Y984 (IR) bzw. Y957 (IGFR) wurde zu Glutamin, Lysin und Tryptophan substituiert. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, ist in dieser Region anderer Rezeptortyrosinkinasen wie dem FGF-Rezeptor I, dem EphB2-Rezeptor oder dem FLT3-Rezeptor ebenfalls ein Tyrosin oder ein hydrophober Rest vorhanden, der die hydrophobe Tasche ausfüllt. Dies alles deutet auf einen allgemein vorhandenen autoinhibitorischen Mechanismus in der JM-Domäne hin. In der Abbildung 5.4 sind die exemplarisch hydrophoben Taschen des Insulinrezeptorkinase (IRK) und der FMS-like Tyrosinkinase 3 (FLT3) superpositioniert.

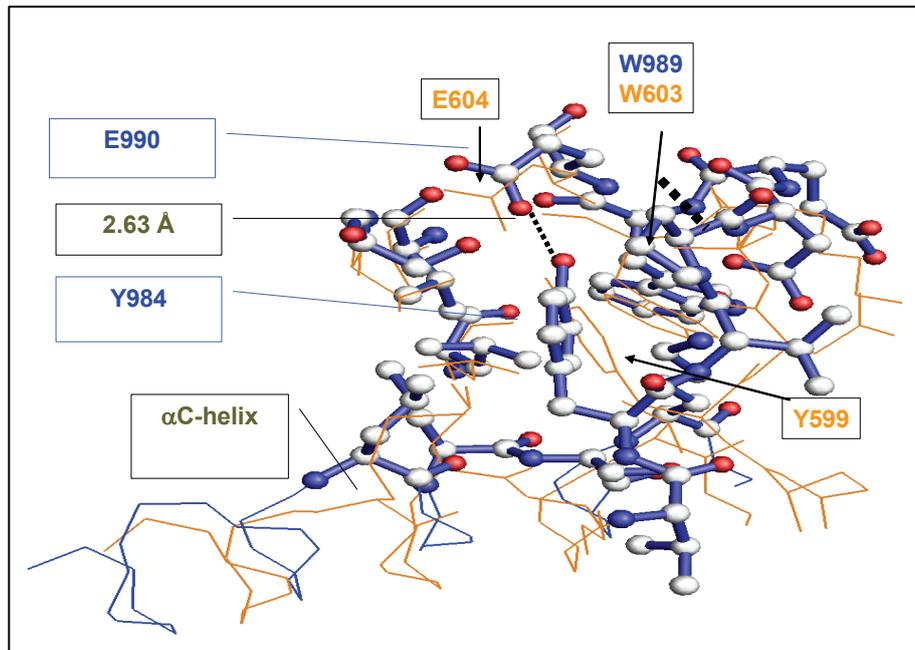


Abb. 5.4: Superposition der hydrophoben Bindungstasche in der JM-Domäne von IRK und FLT3

Die Superposition der hydrophoben Tasche um Y984 (blau) mit der äquivalenten Tasche von FLT3 um Y599 (orange) zeigt eine hohe Identität. Wie bei der IRK ist Y599 über eine Wasserstoffbrücke mit dem ebenfalls konservierten E604 verbunden. Das W603 (W989 in der IRK) wirkt als hydrophober „Verstärker“ dieser Interaktion. Die Koordinaten sind aus der PDB-Datenbank: (IRK) PDB code 1P14; Li et al., 2003; (FLT3) PDB code 1RJB; Griffith et al., 2004. Abbildung freundlicherweise von Arne Rufer zur Verfügung gestellt.

Griffith et al. (2004) postulieren für das Y599, welches keine Autophosphorylierungsstelle ist, eine Funktion, in der das Tyrosin wie eine Anstecknadel die JM-Domäne an den *N-lobe* der Kinase anheftet und somit die Kinase in einer inaktiven Form gehalten wird. Die betrifft insbesondere die unproduktive Konformation der α C-Helix. Auch im PDGF-Rezeptor ist das Y599 konserviert und eine Mutation an dieser Position führt zu einem konstitutiv aktiven Enzym [Irusta et al., 2002].

Bei einer Substitution des Tyrosins an dieser Stelle zu Glutamin sollte immer noch die Wasserstoffbrücke, wie zwischen dem Tyrosin und Glutamat zu sehen ist, bestehen bleiben (neutraler Effekt). Der Austausch zu Lysin könnte in Bildung einer stärkeren Salzbrücke resultieren (positiver Effekt) und schließlich würde eine Mutation zu einem Tryptophan nur hydrophobe Interaktionen in der Tasche erlauben (negativer Effekt). Die Vorlage dafür lieferten Gonfloni et al. (1999), indem sie durch gezielte Austausche des Leucins 255 in der hydrophoben Tasche von Src, die dort auf der Rückseite der Kinase platziert ist, eine unterschiedliche Regulation der Kinaseaktivität induzierten.

Alle JM-Konstrukte des IR/IGFR sind als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und über GSH-Affinitätschromatographie aufgereinigt worden. Ich konnte durch Einführung eines

zusätzlichen Waschschrilles mit ATP/Mg²⁺ während der Reinigung die koexprimierte *E. coli* ATPase vollständig entfernen. Vorherige Standardaufreinigungen des GST-IR/IGFR-JM Proteins zeigten immer eine ATPase-Kontamination auf [Elhamine, 2004].

Während die GST-IR-JM Konstrukte die Autophosphorylierung der IGFR-VK Kinase nicht signifikant beeinflusst haben, haben alle GST-IGFR-JM Proteine die Autophosphorylierung der Kinase stark inhibiert, wenn die JM-Proteine mindestens im 1:5 Verhältnis zur Kinase vorlagen. Sogar nach 60 min. erreichte die Kinase nicht den Tris-phosphorylierten Zustand. Dies war ein Indiz für eine sehr spezifische Interaktion zwischen der JM-Domäne und der Kinase, obwohl die JM-Konstrukte des IR und IGFR zu 70 % homolog sind. Im Falle der IGFR-VK handelt es sich um eine Kinase, welche nicht über den gesamten N-Terminus und damit der JM-Domäne verfügt. Zusätzlich wurde das Tyr 957 mit einem Phe ersetzt. Li et al. (2003) beschreiben für den IR (Y984), dass allein diese Substitution hinreichend ist, um eine schnellere Autophosphorylierung der Kinase zu induzieren, was sich in einer Steigerung des k_{cat} auf das Vierfache äußerte. Denkbar wäre nun, dass die zugegebene JM-Domäne bei der Autophosphorylierung der Kinase wieder den fehlenden Autoinhibitionsmechanismus etabliert und somit sich die beobachtete Inhibition erklärt.

Der inhibitorische Effekt der JM-Domäne beruht keinesfalls auf einen Substrateffekt. Morrison und Pessin (1987) haben beschrieben, dass die Autophosphorylierung der IR-Kinase in Anwesenheit von Substraten verzögert und abgeschwächt wird. Dies konnte aber ausgeschlossen werden, da Versuche die JM-Domäne *in vitro* von der Insulinrezeptorkinase zu phosphorylieren ohne Aktivatoren wie Histon2B oder poly-L-Lysin fehl schlugen [Al-Hasani, 1995]. In der Substratphosphorylierung der inaktiven IRKD-D/A katalysiert von der IGFR-VK Kinase störte die Präsenz des GST-IGFR-JM_{WT} Proteins nicht.

Um genauere Aussagen über den Einfluss der JM-Domäne auf die Kinaseaktivität in Auto- und Substratphosphorylierung zu treffen, wurden die verschiedenen JM-Konstrukte zuerst in den pET21a(+)-Vektor, welcher einen C-terminalen 6xHis-Tag bereitstellt, umklontiert. Allerdings konnte man keine Expression des JM-Proteins mit diesem Vektor feststellen. Der Grund dafür konnte nicht gefunden werden. Stattdessen wurde anhand einer alternativen Strategie die JM-Konstrukte im pGEX3X-Vektor C-terminal um einen 6xHis-Tag verlängert. Hier gelang die Expression der Konstrukte in guter Ausbeute. Die so erhaltenen Fusionsproteine konnten dann über die GSH-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden und über eine Inkubation mit der Protease Xa vollständig von GST abgetrennt werden. Isoliert wurden dann die JM-Peptide über eine im Anschluss durchgeführte Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie. Auffällig war, wie schon Al-Hasani (1995) beobachtete, dass die ~8,5 kDa großen JM-Peptide in der SDS-PAGE ein ungewöhnliches Laufverhalten aufwiesen. Diese haben ein geringeres apparentes MW von etwa 6,5 kDa. Es kann sein,

dass die reine JM-Domäne eine sehr kompakte Form annimmt und unterhalb des Markers (6,5 kDa) im SDS-Gel erscheint.

Mit den so isolierten JM-Peptiden des IGFR konnte ebenfalls die Autophosphorylierung der IGFR-VK Kinase signifikant inhibiert werden. Es traten diesmal auch sichtbare Unterschiede im Inhibitionspotential der verschiedenen JM-Peptide auf. Die W-Mutante inhibierte am stärksten und der Wildtyp am schwächsten. So kann man davon ausgehen, dass die unterschiedlichen JM-Konstrukte mit verschiedenen Dissoziationskonstanten an die Kinase binden. Allerdings konnte man keine Verstärkung der Inhibition durch Erhöhung des Kinase/Peptid-Verhältnis auf 1:10 feststellen. Eine mögliche Begründung für diesen Umstand könnte darin bestehen, dass die JM-Domäne nicht als einziger Regulationsweg von der Kinase genutzt wird und für ein weitreichenderes Beeinflussen der Kinaseaktivität viel größere Bereiche notwendig sind [vgl. Munshi et al., 2002]. Auch bei der Src-Kinase wird die Regulation der Kinaseaktivität durch ein komplexes und großflächiges Zusammenspiel von SH3- und SH2-Domäne und dem SH2-Kinase-Linker bestimmt [Gonfloni et al., 1997].

In der Substratphosphorylierung der IGFR-VK Kinase in Anwesenheit der JM-Peptide konnte jetzt, wo GST-freie Peptide vorlagen, auch ein aktivierender Effekt beobachtet werden. Der Phosphat-Transfer auf das Substrat IRKD-D/A war signifikant gesteigert. Das K-Peptid wirkte mit einer Steigerung der Transferrate des Enzyms von 60 % als starker Aktivator. In den vorherigen Experimenten konnte sehr wahrscheinlich kein Effekt beobachtet werden, weil eine Maskierung über GST vorlag. Es ist auch sehr interessant, dass die Peptide in der Autophosphorylierung inhibierend wirken, aber bei der Katalyse auf das Substrat wie Poly-L-Lysin, als Aktivator dienen. Der Mechanismus der Aktivierung über Poly-L-Lysin ist bis heute ungeklärt. Manche Autoren führen die gesteigerte Aktivität auf eine durch die Poly-Kationen induzierte Molekülaggregation zurück, die eine intermolekulare Phosphorylierung zwischen Monomeren steigert [Kohanski, 1989; Li et al., 1992; Yan et al., 1993]. In diesem Zusammenhang belegen die experimentellen Daten von Baer et al. (2001), dass eine künstliche Dimerisierung der IR/IGFR-Kinase einen ähnlichen Effekt wie eine Poly-L-Lysin-Stimulation bewirkt. So kann die Anwesenheit der freien JM-Domäne sich positiv auf die Interaktion der IGFR-VK Kinase, die keine JM-Domäne hat, mit dem Substrat IRKD-D/A, welches über eine JM-Domäne verfügt, auswirken. In gewisser Weise könnte die isolierte JM-Domäne die im Katalysator zum Teil fehlende Dimerisierungsfläche [vgl. Munshi et al., 2002] ersetzen und so nachhaltig eine verbesserte Interaktion mit dem Substrat bewirken. Warum aber die Autophosphorylierung der IGFR-VK in Anwesenheit der JM-Domäne beeinträchtigt ist, muss anders diskutiert werden. Dort scheint die Interaktion der JM-Domäne mit der Kinase, die keine vollständige JM-Domäne besitzt und den Austausch Y957F in sich trägt, direkt auf die hydrophobe Tasche zwischen der α C-Helix und den β -Faltblättern des *N-lobes*, welche eine autoinhibitorische Rolle besitzt [Li et al., 2003], Einfluss

zu nehmen. Alle JM-Konstrukte zeigten daher eine Verstärkung (oder Rekonstitution) dieser intrinsischen Autoinhibition und somit eine Retardierung in der Autophosphorylierung. Laut diesen Hypothesen würde der JM-Domäne eine duale Rolle zukommen. Zum einen dient die JM-Domäne der Dimerisierung der Kinase und zum anderen beinhaltet die JM-Domäne negativ regulierende Mechanismen. Die Bereitstellung von Kontaktflächen bei der Dimerisierung über die JM-Domäne hilft eindeutig bei der Aktivierung und Substratbindung der Kinase, während die hydrophoben Kontakte um das Y957 der JM-Domäne die Kinase in einem basalen (inaktiven) Zustand halten. Wie beim EphB2- oder TGF β -Rezeptor könnte aber die Phosphorylierung der JM-Domäne die inhibitorischen Eigenschaften aufheben und somit den Übergang zum aktiven Enzym erleichtern.

Weiterhin implementierte sich eine neue Frage, wie die freien JM-Peptide sich in Auto- und Substratphosphorylierungen mit einer Kinase, welche über einen kompletten N-Terminus und somit einer vollständigen JM-Domäne verfügt, aber wieder an der Stelle Y957 bzw. Y984 zu F substituiert war, auswirken würden. So wurde die Kinase IRKD Δ 72C [Wieber, 1998] verwendet, die nur C-terminal deletiert ist. Es zeigte sich, dass die JM-Konstrukte die Substratphosphorylierung der IRKD-D/A verschiedenartig beeinflusst haben. Die Wildtyp-Domäne verhielt sich neutral, während das W-Peptid inhibitorische Eigenschaften aufwies. Dagegen wurde bei den K- und Q-Peptiden wieder eine Aktivierung beobachtet. In der Auswertung der Autophosphorylierung der IRKD Δ 72C Kinase offenbarte sich, dass nach Inkubation mit dem W-Peptid die Kinase am geringsten phosphoryliert war und mit dem K- bzw. Q-Peptid sich am besten phosphorylierte. Der Wildtyp hatte wieder keinen Effekt aufgewiesen (alle Daten nicht gezeigt). Es ist denkbar, dass nun eine viel ausgedehntere Interaktion der JM-Peptide mit der Kinase über den gesamten N-Terminus stattfand. Hierbei wäre die hydrophobe Tasche nur ein Ort der Interaktion und auch bisher nicht mögliche Interaktionen könnten die Aktivität der Kinase durchaus in anderer Weise beeinflusst haben. Es bleibt zu folgern, dass nach Inkubation mit dem jeweiligen Peptid unterschiedlich aktive Enzyme vorlagen und dies sich direkt auf die Effizienz in der Substratphosphorylierung bemerkbar machte. In der Substratphosphorylierung der Vollängen-Kinase ist sogar nun eine Konkurrenz zwischen den JM-Domänen des Substrats und denen der freien Peptide vorstellbar. Da Katalysator und Substrat sich beide vom IR herleiten, könnte eine homologe Interaktion bzw. Dimerisierung präferiert werden.

6 Material

6.1 Bakterienstämme, Viren, Kulturmedien und –zusätze

<i>Autographa californica</i> Nuclear Polyhedrosis Virus	Pharmingen, San Diego, CA, USA
<i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf9) Zellen	Dr. S. Stabel, Max-Delbrück-Laboratorien, Köln
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Dr. S. Stabel, Max-Delbrück-Laboratorien, Köln
<i>Escherichia coli</i> BL21	Dr. S. Stabel, Max-Delbrück-Laboratorien, Köln
Amphotericin B (Fungizone®)	Life Technologies, Eggenstein
Ampicillin, Natriumsalz	Fluka, Buchs, Schweiz
Fötale Kälberserum (FCS)	Life Technologies, Eggenstein
Gentamycinsulfat (G418)	Life Technologies, Eggenstein
Grace's Insektenzellenmedium	Life Technologies, Eggenstein
LB-Broth Base Medium	Life Technologies, Eggenstein
LB-Agar	Life Technologies, Eggenstein
Neutralrot (3-Amino-7-dimethylamino-2-Methylphenazin-Hydrochlorid)	Sigma, Taufkirchen
Trypanblau (1,2-bis(-Amidino-2-benzofuranyl)-ethylen (0,5 % (w/v) Trypanblau in 0,9 % (w/v) NaCl)	Serva, Heidelberg

6.2 Chemikalien

A

Acetonitril, <i>gradient grade</i>	Merck, Darmstadt
Acrylamid, p.a.	Serva, Heidelberg
Adenosin-5'-diphosphat	Boehringer, Mannheim
Adenosin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
[γ - ³² P]-Adenosin-5'-Triphosphat, > 5000 Ci/mmol	NEN, Zantentem, Belgien
Agarose, <i>electrophoresis grade</i>	Seakem, Hameln
Ammoniumacetat	Fluka, Buchs, Schweiz
Ammoniumper(oxodi)sulfat	Serva, Heidelberg
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt

B

Borsäure	Merck, Darmstadt
Bradford-Färbereagenz	BioRad, München
5-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphat (BCIP)	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau, Natriumsalz, <i>research grade</i>	Serva, Heidelberg

C

(Coomassie Brilliant) Blue G-250	Serva, Heidelberg
(Coomassie Brilliant) Blue R-250	Serva, Heidelberg

D

N, N'-Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Taufkirchen

E

Essigsäure, >97%, p.a.	Roth, Karlsruhe
Ethanol, absolut, p.a.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (2,7-Diamino-10-ethyl-9-phenyl-phenanthridiumbromid)	Sigma, Taufkirchen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt

G

Glutathion, oxidiert	Serva, Heidelberg
Glutathion, reduziert	Boehringer, Mannheim
Glycerin	Serva, Heidelberg
Glycin, <i>electrophoresis grade</i>	ICN, Aurora, OH, USA

H

Harnstoff	Biomol, Hamburg
-----------	-----------------

I

Imidazol	Merck, Darmstadt
Isopropanol, p.a.	Merck, Darmstadt

Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG)

Biomol, Hamburg

K

Kaliumchlorid-hexahydrat, p.a.

Merck, Darmstadt

Kaliumhydrogenphosphat, p.a.

Merck, Darmstadt

di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, p.a.

Merck, Darmstadt

Kaliumhydroxid

Merck, Darmstadt

L

Leupeptin

Sigma, Taufkirchen

M

Magnesiumchlorid-Hexahydrat, p.a.

Merck, Darmstadt

Mangan(II)chlorid-Tetrahydrat, p.a.

Merck, Darmstadt

Methanol, p.a.

Roth, Karlsruhe

N,N'-Methylenbisacrylamid, *research grade*

Serva, Heidelberg

N

Natriumacetat, wasserfrei, p.a.

Merck, Darmstadt

Natriumazid, reinst

Merck, Darmstadt

Natriumchlorid p.a.

Roth, Karlsruhe

Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat, p.a.

Merck, Darmstadt

Natriumdodecylsulfat (SDS)

Serva, Heidelberg

di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat

Merck, Darmstadt

Natriumhydroxid

Merck, Darmstadt

Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)

Sigma, Taufkirchen

P

PCR-Nucleotidmix

Boehringer, Mannheim

Perchlorsäure, 70%

Merck, Darmstadt

Phenylmethylsulfonylfluorid

Sigma, Taufkirchen

Polyethylenglykol 35000 (PEG-35000)

Serva, Heidelberg

Poly-L-Lysin Hydrobromid, 15-30 kDa

Sigma, Deisenhofen

Poly(Glu₄Tyr₁) Natriumsalz, 20-50 kDa

Sigma, Deisenhofen

i-Propanol, p.a.

Merck, Darmstadt

S

D(+)-Saccharose, p.a.	Roth, Karlsruhe
Salzsäure, 37 %	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure, 98 %	Merck, Darmstadt

T

N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Trichloressigsäure (TCA), kristallin	Sigma, Deisenhofen
Trifluoressigsäure (TFA), f. d. Spektr.	Sigma, Deisenhofen
Triton-X-100®, p.a.	Boehringer, Mannheim
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Sigma, Taufkirchen
Trypanblau (1,2-bis(-Amidino-2-benzofuranyl)- ethylen (0,5 % (w/v) Trypanblau in 0,9 % (w/v) NaCl)	Serva, Heidelberg
Tween-20 (Polyoxyethylensorbitmonolaureat)	BioRad, München

X

Xylencyanol FF (XC)	Sigma, Taufkirchen
---------------------	--------------------

6.3 Chromatographie**Matrixmaterial:**

Glutathion-Sepharose-4B	Pharmacia, Freiburg
-------------------------	---------------------

Fertigsäulen:

<i>Resource Q</i>	Pharmacia, Freiburg
Superdex 75	Pharmacia, Freiburg
ET 250/8/4 Nucleosil 300-7 C8 (250 x 4 mm)	Machery-Nagel, Düren

6.4 Kit-Systeme

BaculoGold™ -Transfection Kit	PharminGen, San Diego (USA)
GenElute™ Plasmid Miniprep Kit	Sigma, Steinheim
GenElute™ Plasmid Midiprep Kit	Sigma, Steinheim
Nucleobond® AX 100 Plasmid Kit	Macherey & Nagel, Düren
QIAquick™ PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange® Kit	Stratagene, La Jolla (USA)
QuikChange® XL Kit	Stratagene, La Jolla (USA)

6.5 Laborgeräte

A

Autoklaven:

Tischautoklav Tuttnauer 2540 EL

Tuttnauer, Jerusalem, Israel

Varioklav Dampfsterilisator

H+P Labortechnik, München

B

BioLogic Workstation

BioRad, München

(inkl. Molecular Analyst Software)

C

CD-Spektropolarimeter Jasco J 715

Tokyo (Japan)

E

Elektrophorese-Apparaturen:

Mighty Small II

Hoefler, San Francisco, CA, USA

Novex EI 9001-XCELL 2 Mini-Cell

Novex, San Diego, CA, USA

Bio-Rad Mini Protean II

BioRad, München

Elektroporator 2510

Eppendorf, Hamburg

F

FPLC:

Autoinjection Valve AV7-3 und AV8

BioRad, München

BioLogic Controller

BioRad, München

BioLogic Workstation

BioRad, München

Model 2128 Fraction Collector

BioRad, München

G

Geltrockner:

Model 543

BioRad, München

Phero-Temp

Biotec Fischer, Reiskirchen

H

Heizblock HB-130

Unitek

Homogenisator	Braun, Melsungen
HPLC:	
Pumpen LC-6A, Controller SCL-6B	Shimadzu, Kyoto (Japan)
Photometer LKB Uvicord SD	Pharmacia, Freiburg
I	
Inkubatoren:	
EB 28	WTB Binder, Tuttlingen
FD 53	WTB Binder, Tuttlingen
L	
Leuchttisch	Nonius, Delft, NL
M	
<i>Microplate Reader Model 550</i>	BioRad, München
Mikroskop Wilovert S	Hund, Wetzlar
P	
PCR-Gerät:	
Mastercycler 5330	Eppendorf, Hamburg
Peristaltikpumpe Minipuls 2	Gilson, Arnouville Les Gonesse, Frankreich
Photometer DU 7400	Beckman, München
R	
Rühr- Schüttel- und Mischgeräte:	
Ikamag Magnetrührer mit Heizplatte	Janke&Kunkel, Staufen
Ikamag Magnetrührer Reverstir Model RS 8	Toyo Kagaku Sangyo Co., Japan
IKA-Vibrax-VXR	Janke&Kunkel, Staufen
Rollschüttler RM-5	Braun, Melsungen
Inkubator Shaker innova 4000	New Brunswick Sci., USA

Rotoren:

HFA 12.500, HFA 22.50

Heraeus, Düsseldorf

TI 70, TI 45

Beckmann, München

S**Spannungsquellen:**

EPS 3.500

Pharmacia, Feiburg

3000 Xi

BioRad, München

PowerPac 3000

BioRad, München

Sterilbank LB-48-C Lamin Air®

Heraeus, Düsseldorf

T

Thermomixer 5436

Eppendorf, Hamburg

U

Ultraschallquelle

Branson Instruments, Danbury,

(ink. Branson Sonifier Power Supply)

USA

V

Vakuumpumpe

Vakuubrand, Wertheim

W**Waagen:**

Analysewaage

Sartorius, Göttingen

Feinwaage

Sartorius, Göttingen

Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q Plus

Millipore, Bedford, PA,USA

Wasserbäder:

Julabo 13A

Julabo, Seelbach

Julabo F10

Julabo, Seelbach

Western Blot-Apparatur:

Novablot Electrophoretic Transfer Kit

LKB/Pharmacia, Freiburg

Z**Zentrifugen:**

Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
EBA 12 R	Hettich, Tuttingen
Mikrozentrifuge Hf-120 Capsule	Qualitron, Korea
Variofuge 20 RS, 3.0 RS	Heraeus, Düsseldorf
Ultrazentrifuge Beckmann XL-70	Beckmann, München

6.6 Molekulargewichts- und Längenstandards

<i>Prestained SDS-PAGE Molecular Weight Marker</i>	MBI Fermentas, Wilna, Litauen
<i>Prestained Protein Marker Broad Range</i>	NEB, Frankfurt a. M.
<i>SDS Molecular Weight Marker (Broad Range)</i>	MBI Fermentas
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	MBI Fermentas
MassRuler™ DNA Ladder Mix	MBI Fermentas
Gene Ruler™ 50bp DNA Ladder	MBI Fermentas

6.7 Nucleinsäuren**Plasmidvektoren**

pAcG2T-IRKΔ72C	Rogon (2004)
pGEX3X-JM (IR)	Al-Hasani (1995)
pGEX3X-JM (IGFR)	Baer (unveröffentlicht)
pET21a(+)	Novagen, Bad Soden

Oligonucleotide

Sämtliche Primer wurden von der Firma Sigma (Deisenhofen) bezogen. Der typische Reinheitsgrad war HPLC-Standard.

Primer für die Konstruktion der JM-Mutanten des Insulinrezeptors

Y984K fw: 5'-GTTTCCATGCTCTGTGAAGGTACCGGACGAGTGGG-3'
 Y984K re: 5'-CCCACTCGTCCGGTACCTTCACAGAGCATGGAAAC-3'
 Y984Q fw: 5'-GTTTCCATGCTCTGTGCAGGTACCGGACGAGTGGG-3'
 Y984Q re: 5'-CCCACTCGTCCGGTACCTGCACAGAGCATGGAAAC-3'
 Y984W fw: 5'-GTTTCCATGCTCTGTGTGGGTACCGGACGAGTGGG-3'
 Y984W re: 5'-CCCACTCGTCCGGTACCCACACAGAGCATGGAAAC-3'

Primer für die Konstruktion der JM-Mutanten des IGF-1 Rezeptors

Y957K fw: 5'-CTTCAGCGCTGCTGATGTGAAGGTACCTGATGAGTG-3'

Y957K re: 5'-CACTCATCAGGTACCTTCACATCAGCAGCGCTGAAG-3'

Y957Q fw: 5'-CTTCAGCGCTGCTGATGTGCAGGTACCTGATGAGTG-3'

Y957Q re: 5'-CACTCATCAGGTACCTGCACATCAGCAGCGCTGAAG-3'

Y957W fw: 5'-CTTCAGCGCTGCTGATGTGTGGGTACCTGATGAGTG-3'

Y957W re: 5'-CACTCATCAGGTACCCACACATCAGCAGCGCTGAAG-3'

Primer für die Umklonierung der IGFR-JM-Konstrukte in den pET21a(+)-Vektor

Primer IGFR-JM up (pET21a) 5'-CCATGGATCCCGGCTGGGGAATGGAGTG-3'

Primer IGFR-JM low (pET21a) 5'-CCCCGAATTCCTGTTTTAATGGCCACTCTGG-3'

Primer für die C-terminale Verlängerung von den JM-Mutanten des IGF-1 Rezeptors um einen 6xHis-Tag

IGFR-JM fw: 5'- CCATGGATCCCGGCTGGGGAATGGAGTG-3'

IGFR-JM re 6xhis 5'-CGAATTCTCAATGATGATGATGATGATGCACTGTTTTAAT
GGCCACTCTGGTTTCA-3'**Primer für die Generierung der Substitution R1092Q in der IRKD**

5'-IRKD-R1092Q 5'-TACCTCCGTTCTCTGCAGCCAGAGGCTGA-3'

3'-IRKD-R1092Q 5'-CTCAGCCTCTGGCTGCAGAGAACGGAGGT-3'

6.8 Antikörper und Enzyme**Antikörper:**

α -GST Rabbit 095880	Sigma, Deisenhofen
α -Rabbit IgG-Alkalische Phosphatase (AP)	Roche Diagnostics, Mannheim
α -GST-Exon20	Lehr (1995)
α -GST-JM	Al-Hasani (1995)

DNA-modifizierende Enzyme und zugehörige Puffer:

PNK	MBI Fermentas, Wilna, Litauen
Puffer A	MBI Fermentas, Wilna, Litauen
SAP	Roche Diagnostics, Mannheim
SAP-Puffer	Roche Diagnostics, Mannheim

T4-DNA-Ligase	Roche Diagnostics, Mannheim
T4-DNA-Ligase-Puffer	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
Cloned <i>Pfu</i> Buffer	Promega, Mannheim

Restriktionsenzyme und zugehörige Puffer:

<i>Bam</i> HI	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Eco</i> RI	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Xho</i> I	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Kpn</i> I	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Xma</i> I	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Pst</i> I	Roche Diagnostics, Mannheim
Puffer B	Roche Diagnostics, Mannheim
Puffer H	Roche Diagnostics, Mannheim

Sonstige:

Faktor Xa	Roche Diagnostics, Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Rinderserumalbumin (BSA), Fraction V, <i>pure</i> (Protease- und Phosphatase-frei)	Serva, Heidelberg
Thrombin	Pharmingen, San Diego (USA)

6.9 Peptide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligopeptide wurden von der Firma Thermo Electron GmbH (Ulm) kommerziell bezogen. In Tab. 6.1 sind alle gebrauchten Peptide aufgelistet.

Tab. 6.1: Liste der benutzten Oligopeptide

NAME	SEQUENZ ¹	REINHEIT
<i>IRKDaD</i>	LKSYLRSLRPEAENN	immunograde, typ.>50%
<i>Scrambled</i>	RLIGNLRFYASGFK	immunograde, typ.>50%
<i>WASP (81-94)</i>	KSYFIRLYGLQAGR	immunograde, typ.>50%
<i>IGFKDaD</i>	LKSYLRSLRPAMANN	immunograde, typ.>50%

¹Aminosäuresequenz im Ein-Buchstaben-Code

6.10 Puffer und Lösungen

Alle Lösungen und Puffer wurden, soweit nicht anders angegeben, mit MQ-Wasser angesetzt.

Ampicillin (1000x):

50 mg/ ml Ampicillin, steril filtriert über 0,2 µm Spritzenfilter

ATP-Stocklösung:

100mM ATP in 50 mM Tris/ HCl, pH 7,0

Blockierungspuffer:

1% (w/v) BSA in PBS (0,5 g BSA, 50 ml 1x PBS, 0.04 ml NaN₃ (nur, wenn der Puffer mehrfach verwendet werden soll)

alternativ: 5 % (w/v) Milchpuffer in PBS

Bradford-Färbereagenz:

1,9 % (v/v) Perchlorsäure, 0,06 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250

DC-Laufpuffer:

25% (w/v) Ammoniumhydroxid, 2,19 Teile Ethanol

Destain:

10 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure

DNA-Probenpuffer(10X):

67 % (w/v) Saccharose; 0,4 % (w/v) Bromphenolblau bzw. Xylencyanol FF.

Der Puffer kann mit Wasser oder mit TE-Puffer angesetzt werden

EDTA-Lösung:

0,5 M EDTA/ NaOH, pH 7,5

Elutionspuffer:

Der Elutionspuffer muß frisch angesetzt werden, weil das reduzierte Glutathion sonst oxidiert.

10 mM red. L-Glutathion (GSH); 50 mM Tris/ HCl, pH 8,

Ethidiumbromid-Lösung:

5,25 mg/ml Ethidiumbromid

FPLC-Puffer für Anionenaustauschchromatographie (IEX):

Die Puffer müssen vor Gebrauch steril filtriert und entgast werden.

- **IEX A (Äquilibration, Waschen):**

1 mM DTT; 50 mM Tris/ HCl; pH 7,5

- **IEX B (Elution):**

1 M NaCl; 1 mM DTT ; 50 mM Tris/ HCl; pH 7,5

Kolloidale Peptid-Färbelösung:

0,8 g Coomassie Brilliant Blue G250 in 400 ml MQ unter Rühren lösen, 400 ml 1 M H_2SO_4 (= 21,3 ml 95 % H_2SO_4 ; $M_r = 98,08$; $D = 1,82 \text{ g/cm}^3$) zugeben, 3 h rühren, über Faltenfilter filtrieren, 88 ml 10 M KOH zugeben, 124 ml 100 % (w/v) TCA hinzufügen.

Kulturmedium:

Grace's Insektenmedium, 10% FCS
Fungizone (Endkonzentration: 2,5 $\mu\text{g/ml}$)
Gentamycin, steril filtriert (Endkonzentration: 50 $\mu\text{g/ml}$)

Leupeptin-Stammlösung (1000X):

10 mg/ml Leupeptin

Lysispuffer für Kinasen ohne GST:

250 mM Saccharose; 1 mM DTT; 1 Complete Tablette/50 ml Lysispuffer; 20 mM TRIS/HCl; pH 7,5

Nativer Laufpuffer:

50 mM Tris/HCl (pH 8.3); 384 mM Glycin

Nativer Probenpuffer (5x):

250 mM EDTA pH 7,5, 100mM DTT, 15% Saccharose, 50 mM TRIS/HCl pH 7.5, 0,5% Bromphenolblau

Natriumacetat-Lösung:

3 M NaOAc/AcOH, pH 5,2

PBS-Puffer:

140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na_2HPO_4 ; 1,8 mM KH_2PO_4 , pH 7,5

Phosphorylierungs-Puffer (10X), Standardbedingungen:

500 mM Mg^{2+} ; 500mM Mn^{2+} ; 50 mM DTT; in 0,5 M TRIS/ HCl pH 7,5

PMSF-Stammlösung (100X):

0,1 M PMSF in 100 % (v/v) i-Propanol oder Ethanol

Puffer für DNA-Midipräparation***Puffer S1:***

50 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 μg RNAse A/ ml

Puffer S2:

200 mM NaOH, 1% SDS

Puffer S3:

2,8 M KAc pH 5,1

Puffer N2:

100 mM Tris, 900 mM KCl, 15% Ethanol, pH 6,3 mit H_3PO_4 einstellen,
0,15% Triton X100

Puffer N3:

100 mM Tris, 1150 mM KCl, 15% Ethanol, pH 6,3 mit H₃PO₄ einstellen

Puffer N5:

100 mM Tris, 1000 mM KCl, 15% Ethanol, pH 8,5 mit H₃PO₄ einstellen

Regenerationspuffer 1:

0,5 M NaCl; 0,1 M Tris/ HCl, pH 8,5

Regenerationspuffer 2:

0,5 M NaCl; 0,1 M NaOAc/ HOAc, pH 4,5

SDS-Laufpuffer (1X):

0,1 % (w/v) SDS; 384 mM Glycin; 50 mM TRIS/ HCl, pH 8,3

SDS-Probenpuffer (10X):

20 % (w/v) SDS; 60 % (w/v) Saccharose; 1 M DTT (fakultativ); 0,1 % (w/v) Bromphenolblau ;
0,5 M TRIS/ HCl, pH 6,8

SOC-Medium :

2 % (w/v) Bacto Trypsine; 0,5 % (w/v) Bacto Yeast Extract; 10 mM NaCl₂; 2,5
mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM Glucose

Spot-Test-Färbelösung:

0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250; 10% (v/v) Methanol; 7 % (v/v) Essigsäure

Spot-Test-Entfärbelösung:

10% (v/v) Methanol; 7 % (v/v) Essigsäure

TBE-Puffer (10X):

0,89 M Tris; 0,89 M Borsäure; 20 mM EDTA

TBS-Puffer:

150 mM NaCl; 0,05 % (v/v) Tween-20 (fakultativ); 100 mM Tris/ HCl, pH 7,5

TBS/Tween:

0,1 % Tween-20 in TBS (150 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl, pH 7.5); immer frisch ansetzen

TE-Puffer:

1 mM EDTA; 10 mM Tris/ HCl pH 8,0

TNES-Puffer:

0,1N NaOH / 0,5% SDS in TE-Puffer

TE-RNase-Puffer:

TE-Puffer mit RNase (0,1 mg/ml)

Tris-Puffer (1)

50 mM Tris/ HCl, pH 7,5

Tris-Puffer (2, Sammelgel):

0,5 M Tris/ HCl, pH 6,8

Tris-Puffer (3, Trenngel):

3 M Tris/ HCl, pH 8,8

Western Blot Blot-Puffer (5x):

50 mM Tris, 40 mM Glycin

Western Blot Entwicklungspuffer:100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 100 mM Tris/ HCl, pH 9,5**Wet Blot Puffer:**

192 mM Glycin; 25 mM Tris/ HCl; 20% Methanol; 0,02% SDS

6.11 Verbrauchsmaterial**C**

Centrikon®-Mikrokonzentrator

Milipore, Bedford, USA

Centrikon Centrx UF2 (10/ 30 kDa)

Schleicher & Schuel, Bioscience
GmbH, Dassel

Complete Protease Inhibitor Tabletten

Roche Diagnostics, Penzberg

F**Filtermaterial**

0,2 µm Dyngard ME Sterilfilter

Microgon, California, USA

0,22 µm Type GS (Ø 4,9 cm)

Millipore, Bedford, USA

0,45 µm Type GS (Ø 4,9 cm)

Millipore, Bedford, USA

Filterpapier

Munktell Grade 1F

LKB, Pharmacia, Freiburg

Whatman 3T

Whatman, Maidstone, GB

K

Quarzküvetten

Hellma, Mannheim

Typ 105.200-QS

Schichtdicke 10 mm

Zentrum 8,5 mm

P

PVDF-Membran Immobilon P

Millipore, Bedford, PA, USA

7 Methoden

7.1 Molekularbiologische Methoden

Folgende molekularbiologischen Methoden wurden gemäß Standardprotokollen nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt: Agarose-Gelelektrophorese, Fällung von DNA, Restriktionsendonukleolytische Spaltung, Ligation, Konzentrationsbestimmung von DNA. Plasmid-„Mini“-Präparationen für Restriktionsanalysen erfolgten nach Zhou et al. (1990) bzw. mit dem Sigma-Kitsystem nach Herstellerangaben. Die Präparation großer Plasmidmengen („Midi“) aus *E.coli*-Bakterienkulturen erfolgte über das Nucleobond® Plasmid Kit von Macherey-Nagel.

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAEX II-Kitsystem (Qiagen). Die Sequenzierung von DNA wurde vom ZMMK-ServiceLabor durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte auf einem ABI PRISM 377 DNA Sequencer der Firma Applied Biosystems über die *Taq FS BigDye-terminator cycle sequencing* Methode. Zellen des *E. coli* Stammes DH5 α wurden bei 37 °C in Luria-Bertani-Medium (LB Medium) und auf LB-Agarplatten kultiviert [Sambrook et al., 1989].

Chemisch-Kompetente Bakterien wurden nach Chung et al. (1989) mit TSS Puffer (85 % LB Medium, 10 % (w/v) Polyethylenglykol, 5 % (v/v) DMSO, 50 mM MgCl₂, pH 6,5) hergestellt und bei -80 °C gelagert. Elektrokompente Bakterien wurden nach Dower et al. (1988) hergestellt. Die Transformation von Bakterienzellen erfolgte durch Hitzeschock (1,5 min, 42 °C) oder durch Elektroporation [Dower et al., 1988]. Die Kultivierung von *E. coli* DH5a BL21 und XL2-Blue in LB Medium und LB-Agarplatten wurde nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Zur langfristigen Aufbewahrung von (transformierten) Bakterienstämmen eignen sich Glycerolstocks, welche aus 85% (v/v) Bakterienkulturen (Absorption $A_{600nm} = 0,5$) und 15% (v/v) Glycerol (steril) bestehen.

7.2 Herstellung der *E. coli* Expressionsvektoren GST-JM_{Mutanten}

Zur Generierung der JM-Mutanten des Insulinrezeptors Y984K, Y984Q und Y984W bzw. im Falle des IGF-1 Rezeptors Y957K, Y957Q und Y957W wurde das *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis* Kit der Firma Stratagene verwendet. Dazu wurden die unter 6.7 beschriebenen Oligonukleotidprimer verwendet, die zu einem Austausch des Tyrosins 984 (IR) bzw. 957 (IGFR) gegen Lysin, Glutamin oder Tryptophan führen. Ferner bewirkt das Einführen einer stillen Mutation die Erzeugung der neuen Schnittstelle für die

Restriktionsendonuklease KpnI, für die im 5173 bp (IR) bzw. 5162 bp (IGFR) großen Ausgangsvektoren. Die zusätzliche Schnittstelle erzeugt daher in der Restriktionsanalyse eines mutierten Plasmids ein charakteristisches DNA-Fragment, welches im Agarosegel eindeutig identifiziert werden kann. Als Ausgangsvektor dienten die Expressionsvektoren pGEX3X-JM_{IR} [Al-Hasani, 1995] und pGEX3X-JM_{IGFR} [Baer, unveröffentlicht], die die kodierenden Sequenzen der Juxtamembran-Domäne des Insulin- bzw. IGF-1 Rezeptors enthält (IR: G947-V1020; IGFR: R936-V1005).

Das Verfahren basiert auf eine PCR gestützte Mutagenese. Dazu wird der Ausgangsvektor zusammen mit den entsprechenden Oligonukleotiden in einer PCR eingesetzt und der Reaktionsansatz anschließend durch einen Restriktionsverdau mit der Endonuklease DpnI inkubiert. DpnI spaltet spezifisch methylierte und hemi-methylierte parentale DNA, nur neusynthetisierte Moleküle bleiben erhalten. Diese, die gewünschte Mutation enthaltene einzelsträngigen, zirkulären Plasmide werden im nächsten Schritt in *E. coli* XL2-Blue ultrakompetente Zellen transformiert. Durch die niedrige Fehlerrate beim Nukleotideinbau der *Pfu* DNA Polymerase und eine niedrige Zyklenzahl in der PCR wird eine hohe Mutationseffizienz erreicht (bis 98 %) und gleichzeitig die Möglichkeit zufälliger Mutationen während der Reaktion verringert. Die PCR und die Transformation von *E. coli* XL2-Blue Zellen erfolgten nach den Angaben des Herstellers. Nach Durchführung der Mutagenesereaktion wurde die Plasmid-DNA der erhaltenen Klone hinsichtlich ihrer neuen Restriktionsschnittstelle überprüft und die Einführung der Mutationen durch DNA-Sequenzierung verifiziert.

Zwecks Reinigung und Isolierung hochreiner JM-Peptide des IGF-1 Rezeptors wurde diesen Mutanten C-terminal ein 6xHis-Tag ebenfalls über PCR angehängt. Die dazu benötigten Primer sind unter 6.7 verzeichnet.

7.3 Konstruktion des Transfervektors pAC-G2T-IRKΔ72C_{R1092Q}

Der Austausch der Aminosäure Arginin zu Glutamin an der Position 1092 in der Insulinrezeptorkinasedomäne wurde mithilfe des *QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis* Kit der Firma Stratagene durchgeführt. Das XL-Kit ist im Gegensatz zum normalen Kit geeignet für große Plasmide (> 8 kb). Als Ausgangsvektor wurde pAC-G2T-IRKΔ72C verwendet. Dieses Kinasekonstrukt umfasst die Aminosäuren R941-K1271 der IRKD und ist N-terminal mit GST fusioniert [Rogon, 2004]. Die Primer für diese Substitution sind unter 6.7 zu finden.

7.4 Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen aus *E. coli*

Zur Expression der GST-Fusionsproteine GST-JM_{Y984K/Y984Q/Y984W} (IR) und GST-JM_{Y957K/Y957Q/Y957W} (IGFR) wurden die entsprechenden Expressionsvektoren verwendet. Der Wirtstamm war *E. coli* DH5 α oder BL21. Die Anzucht der Bakterien, die Induktion der Proteinexpression und die Reinigung der GST-Fusionsproteine durch Affinitätschromatographie erfolgten nach Smith und Johnson (1988).

Benötigte Puffer: PBS: 140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl, 1,8 mM KH₂PO₄
 Elutionspuffer: 10 mM reduziertes Glutathion, 50 mM Tris/HCl, pH 8,0;
 50 mM Tris/HCl, pH 7,5

Expression der Fusionsproteine in *E. coli*

- Transformierte *E. coli* DH5a oder BL21 in LB-Medium animpfen, ü.N. inkubieren (37°C, 220 rpm)
- ÜNK 1:10 mit LB-Medium (37 °C) verdünnen
- Inkubation 1h, bei 37 °C und 180 rpm
- Induktion mit IPTG (Endkonzentration 1 mM) bei einer OD_{600nm} von 0,6
- Inkubation bei 37 °C und 180 rpm für 4 h
- Bakterien abzentrifugieren (10 min, 5.000 g, 4 °C)

Aufschluß der Bakterien

- Zellen mit 1/50 Kulturvolumen eiskaltem PBS waschen
- Bakterien erneut abzentrifugieren (10 min bei 5.000 g, 4 °C)
- Zellen in 1/100 Kulturvolumen eiskaltem PBS (1 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin) resuspendieren
- Aufschluß durch Ultraschall (5 x 5 sec, 80 Watt, auf Eis)
- Zugabe von Triton X-100 auf 1 % (v/v)
- Unlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugation entfernen (20 min, 10.000 g, 4 °C)

Reinigung der Fusionsproteine durch Glutathion-Affinitätschromatographie

- Glutathion Sepharose-Säule mit 10 Bettvolumen PBS äquilibrieren
- Säule mit dem Überstand nach Zellaufschluß beladen (Flußrate: 1ml/min)
- Säule mit 10 Bettvolumen PBS waschen
- Säule mit 10 Bettvolumen 50 mM Tris/HCl pH 7,5 (1 M NaCl) waschen
- Säule mit 10 Bettvolumen 50 mM Tris/HCl pH 7,5 (2,5 mM ATP, 10 mM MgCl₂) waschen
- Säule mit 10 Bettvolumen PBS waschen

-
- Elution mit 5 Bettvolumen Elutionspuffer
 - Eluat in Mikrokonzentrator (Amicon® Ultra) einengen und in Tris/HCl, pH 7,5 umpuffern (nach Herstellerangaben)
 - SDS-PAGE und Proteinbestimmung der Eluate durchführen

7.4.1 Proteolytische Spaltung der GST-JM_{Mutanten-6xhis} (IGFR) und Reinigung der erhaltenen JM-Peptide

Proteolytische Spaltung mit Faktor Xa

Die Fusionsproteine GST-JM_{WT/Y957K/Y957Q/Y957W}-6xhis wurden für die Spaltung in einer Proteinkonzentration zwischen 0,2 - 6 mg/ml eingesetzt.

Spaltungspuffer: 0,1 M NaCl, 1 mM CaCl₂, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5

- Zugabe von Spaltungspuffer
- Zugabe der Protease (Faktor Xa) im Verhältnis 1:250 (w/w)
- Inkubation bei RT für 8 h

Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie

- Ni-NTA-Agarose-Säule mit 10 Bettvolumen Puffer A (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0) äquilibrieren
- Säule mit dem Spaltungsansatz beladen (Flußrate: 1ml/min)
- Säule mit 10 Bettvolumen Puffer B (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 25 mM Imidazol, pH 8,0) waschen
- Elution mit 5 Bettvolumen Puffer C (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0)
- Eluat in Mikrokonzentrator (Amicon® Ultra) einengen und in Tris/HCl, pH 7,5 umpuffern (nach Herstellerangaben)
- SDS-PAGE und Proteinbestimmung der Eluate durchführen

7.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

7.5.1 Bestimmung nach MINAMIDE und BAMBURG (1990) – „Spot-Test“

1 µl der Proteinlösung, deren Konzentration zu bestimmen ist, sowie jeweils 1 µl von BSA-Lösungen einer Eichreihe (0,1-10 µg/µl) wird auf Munktell Grade 1F Filterpapier aufgetragen.

Nachdem die Probe eingetrocknet ist, wird das Filterpapier für 30 s in *Spot-Test-Färbelösung* gelegt (s. 6.10), anschließend in Entfärbelösung (s. 6.10) entfärbt, so dass keine unspezifische Hintergrundfärbung sichtbar bleibt. Höhere Konzentration der zu untersuchenden Proteinlösung resultiert in eine intensivere Blaufärbung an dem entsprechenden Auftragsort. Die Konzentration wird durch Vergleich mit den Farbtintensitäten der Eichreihe abgeschätzt.

7.5.2 Bestimmung nach BRADFORD (1976)

Die Proteinkonzentration wird bei dieser Methode photometrisch bei einer Analysenwellenlänge von $\lambda=595$ nm gemessen, wobei als Referenzwellenlänge zusätzlich bei 470 oder 650 nm noch gemessen wird. Dazu werden 100 μ l der Proteinlösung unbekannter Konzentration und jeweils 100 μ l von BSA-Eichlösungen (10⁻³ bis 5 · 10⁻² μ g/ μ l) mit jeweils 100 μ l Bradford-Färbereagenz (s. 6.10) in einer Mikrotiterplatte für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wird in einem „*Microplate Reader*“ die Absorption des Komplexes aus Protein und Färbereagenz bestimmt. Mithilfe der BSA-Eichgrade kann die Konzentration der zu analysierenden Proteinprobe ermittelt werden.

7.5.3 Bestimmung durch Absorptionsspektroskopie

Es wird ein Absorptionsspektrum von 230 bis 340 nm aufgenommen. Mit dem Absorptionswert bei 280 nm kann die Proteinkonzentration nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet werden. Danach gilt:

$$A_{280} = {}^{0,1\%} A_{280} \cdot c \cdot d$$

$$\rightarrow c = \frac{A_{280}}{({}^{0,1\%} A_{280} \cdot d)}$$

A_{280} :	Absorption bei 280 nm
c:	Konzentration [mg/ml]
d:	Schichtdicke der Küvette [cm]
${}^{0,1\%} A_{280}$:	spezifischer Extinktionskoeffizient bei 280 nm [cm ² /mg]

Aus der Aminosäuresequenz eines Proteins kann sein molarer Extinktionskoeffizient (ϵ_{280}) berechnet werden [Pace et al., 1995]. Zusammen mit der relativen Molmasse (MW) kann daraus wiederum der spezifische Extinktionskoeffizient (${}^{0,1\%} A_{280}$) berechnet werden:

$$\epsilon_{280} = \Sigma Trp \cdot 5500 + \Sigma Tyr \cdot 1490 + \Sigma Cystine \cdot 125$$

$${}^{0,1\%}A_{280} = \frac{\epsilon_{280}}{MW}$$

ϵ_{280} : molarer Extinktionskoeffizient [$M^{-1}cm^{-1}$]

${}^{0,1\%}A_{280}$: spezifischer Extinktionskoeffizient [cm^2/mg]

MW: Molekulargewicht [g/mol]

Das Absorptionsmaximum eines Proteins sollte bei 280 nm liegen. Außerdem sollte der Quotient A_{280}/A_{250} mindestens 1,8 betragen. Eine signifikante Absorption bei Wellenlängen größer als 300 nm deutet auf Lichtstreuung hin, die eventuell auf Aggregatbildung zurückzuführen ist.

7.6 Protein-Biochemische Methoden

Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen (SDS-PAGE) wurden modifiziert nach Laemmli (1970) und Wilson und Goulding (1991) durchgeführt. Proteinbanden wurden durch Peptidfärbung [Blakesley und Boezi, 1977] sichtbar gemacht.

7.6.1 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE)

Im Gegensatz zur SDS-PAGE werden bei der nativen PAGE die Proteine nicht denaturiert. Die native PAGE ermöglicht somit die Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Größe und Eigenladung. Durch negative Ladungen erhöht sich die Laufstrecke des Proteins im Gel. Diese Methode erlaubt eine Trennung der verschiedenen Phosphorylierungsstufen von Kinasen. Die Phosphorylierungsansätze werden in 5x Probenpuffer (Quenching Buffer) aufgenommen, wodurch die Phosphorylierungsreaktion abgestoppt wird. Die Durchführung erfolgt ähnlich wie die SDS-PAGE. Unterschiede bestehen im Fehlen eines Detergenz wie SDS und dass die Elektrophorese im gekühlten System bei 4°C durchgeführt wird. Die Auftrennung erfolgt mit 150 mV (konstant) für ein Gel und mit 200 mV für zwei Gele. Nach erfolgter Trennung wird das Gel der Peptidfärbung unterzogen.

Tab. 7.1: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die native PAGE

Natives Trenngel (8,5 %)			Natives Sammelgel (5 %)		
	Σ 10 ml	Σ 100 ml		Σ 10 ml	Σ 100 ml
40% Acrylamid	2,1 ml	21 ml	40% Acrylamid	1,2 ml	12 ml
3M TRIS pH 8.8	1,85 ml	18,5	0.5M TRIS pH 6.8	2,5 ml	25 ml
60% Saccharose	1,15 ml	11,5 ml	MQ	6,3 ml	63 ml
MQ	4,9 ml	49 ml	pro 10 ml 12,5 μ l APS und 10 μ l TEMED zum Polymerisieren dazugeben		
pro 10 ml 10,4 μ l APS + 4,4 μ l TEMED zum Polymerisieren dazugeben					

7.6.2 Transfer und immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membran

Der Transfer von Proteinen erfolgte im Semi-Dry-Blot- oder Wet-Blot-Verfahren nach der SDS-PAGE auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF, 0,22 μ m) Membran mit kontinuierlichem Puffersystem. Vor dem Proteintransfer wurde die Membran für 30 sec. in Methanol aktiviert und anschließend in dem jeweiligen Blotpuffer äquilibriert.

Semi-Dry-Verfahren

Blotpuffer: 50 mM Tris, 40 mM Glycin

Im Semi-Dry-Verfahren erfolgte der Transfer je nach Molekulargewicht des zu analysierenden Proteins für 15-30 min bei einer Stromstärke von 2 mA/cm².

Der immunologische Nachweis der Proteine erfolgte anschließend durch Antikörper gebundener Alkalischer Phosphatase-Reaktion mit Hilfe von zwei Antikörpern. Dabei ist der erste Antikörper gegen das nachzuweisende Protein gerichtet, der Zweitantikörper, welcher mit Alkalischer Phosphatase kovalent gekoppelt ist, erkennt das Fc-Fragment des ersten Antikörpers.

Puffer: TBS: 150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 7,4
 TBST: TBS mit 0,05 % (v/v) Tween 20 (Polyoxyethylsorbitmonolaureat)

Antikörper: α -GST-JM bzw. α -GST-Exon20 : polyklonaler Antikörper gegen GST-JM bzw. GST-Exon20 aus Kaninchen

GαR-AP: polyklonaler Antikörper gegen Kaninchen IgG gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase

- PVDF-Membran 30 min blocken in 1 % (w/v) Rinderserumalbumin (BSA) in 1 x TBS
- Membran 1 h bei RT inkubieren mit ersten Antikörper inkubieren
- 5 x 5 min mit TBST waschen
- Membran 1 h bei RT inkubieren mit zweiten Antikörper inkubieren
- 5 x 5 min in TBST waschen
- PVDF-Membran mit 5 ml Entwicklungspuffer überschichten, bis Banden sichtbar, stoppen in H₂O

Entwicklungspuffer: 10 ml: 100 mM Tris/HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂
66 µl: NBT: 50 mg/ml in 70 % (v/v) Dimethylformamid
33 µl: BCIP: 50 mg/ml in 100 % (v/v) Dimethylformamid

α-GST-JM bzw. α-GST-Exon20 wurde 1:1000 in TBS mit 1 % BSA, GαR-AP 1:2000 in TBS mit 1 % BSA verdünnt.

Wet-Blot-Verfahren

Hierbei wird der Transfer in einer Mini-Blot-Apparatur („*Tank-Blot*“, BioRad) im Wet-Blot-Puffer über Nacht bei 30 mA und 4°C durchgeführt. Der Vorteil ist, dass die Proteine komplett auf die PVDF-Membran übertragen werden. Der immunologische Nachweis findet wie oben beschrieben statt.

Wet-Blot-Puffer: 25 mM Tris/HCl, 190 mM Glycin, 0,02% SDS, 20% Methanol

7.7 Expression und Reinigung der GST-IRKΔ72C-R1092Q

7.7.1 Zellkultur

Die Kultivierung von *Spodoptera frugiperda* (*Sf9*) Zellen erfolgte in Grace's Insektenmedium (10 % fötales Kälberserum (hitzeinaktiviert, v/v), 50 µg/ml Gentamycinsulfat, 2,5 µg/ml Amphotericin B) als Suspensionskultur oder in Gewebekulturflaschen bei 27 °C. Um eine Zelldichte von 1 x 10⁶ Zellen/ml Kulturmedium zu gewährleisten, wurde dreimal pro Woche passagiert. Die Herstellung und Lagerung von gefrorenen *Sf9*-Zellen erfolgte nach Summers und Smith (1987). Eine aufgetaute Zellcharge wurde nicht länger als drei Monate verwendet. Infektionen wurden ausschließlich mit Kulturen durchgeführt, deren Generationszeit 18-24 h

betrug und eine Vitalität von > 97 % aufwiesen. Die Kotransfektion von Transfervektor und AcNPV-DNA, die Isolation rekombinanter Baculoviren durch Plaque-Assay, Virusamplifikation, Titerbestimmung und Bestimmung des Expressionsmaximums erfolgte nach Summers und Smith (1987) und den Herstellerangaben des verwendeten BaculoGold™ Transfection Kit (Pharmingen).

7.7.2 Infektion, Proteinexpression und Ernte von Sf9-Zellen

Für die Proteinexpression der löslichen Kinasen wurden Sf9-Zellen mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 5-10 für 72 h infiziert. MOI bezeichnet die Anzahl von Plaque-bildenden Einheiten (*plaque forming units, pfu*) pro Zelle.

- Sf9-Zellen (1×10^6 Zellen/ml) aus Suspensionskultur abzentrifugieren (1000 x g, 27 °C)
- Zellsediment in virushaltigem Medium resuspendieren (1×10^7 Zellen/ml, MOI 5-10)
- Inkubation bei 27 °C für 1h
- Zugabe von neuem Medium (1×10^6 Zellen/ml) und für 48 h inkubieren
- Zellen abzentrifugieren (2300 rpm, 4 °C, 10 min)
- Zellpellet in PBS Lösung resuspendieren und erneut abzentrifugieren (2300 rpm, 10 min, 4 °C)

Die Zellen wurden bei -80 °C eingefroren oder direkt weiterverwendet.

Der Aufschluß der Zellen und alle weiteren Reinigungsschritte erfolgten bei 4 °C. Die angegebenen pH-Werte der Puffer beziehen sich auf Raumtemperatur (22 °C).

Aufschlußpuffer: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 0,25 M Saccharose, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin

- Zellen in Aufschlußpuffer resuspendieren (10^7 Zellen/ml)
- Im Glas/Teflonpotter 10 x pottern
- 5 x 5 sec. sonifizieren (80 Watt, auf Eis)
- unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation entfernen (10 min, 10000 x g)
- Überstand bzw. Lysat abnehmen (auf Eis lagern)
- Ultrazentrifugation des Lysats mit 40.000 rpm für 45 min bei 4°C

Das Lysat wurde nach Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert oder direkt weiterverwendet. Die Reinigung der Kinase erfolgte analog nach 7.4, wo die Reinigung

von GST-Fusionsproteinen beschrieben ist. Der Waschschrift mit ATP und Mg entfällt hierbei.

7.7.3 GST-Abtrennung über Proteaseverdau (Thrombin) und anschließende Ionenaustauschchromatographie der IRKΔ72C Kinasen

GST-Abspaltung über Thrombin

Die GST-IRKΔ72C Kinasen verfügen über eine intrinsische Thrombinspaltestelle (G/R↓G), die genau zwischen dem GST-Anteil und der Kinase liegt. Bei Bedarf ist es also möglich die isolierte Kinase über Thrombinverdau herzustellen. Die Reaktionsbedingungen sind wie folgt:

- 1U Thrombin für 75 µg GST-Fusionsprotein
- Reaktion bei RT für 3h
- Reaktion findet in 10 mM Tris-Puffer (pH 8,0) mit 1 mM EDTA
- DTT-Konzentrationen über 1 mM sind störend
- Anschließend wird der gesamte Spaltungsansatz über die FPLC getrennt

Ionenaustauschchromatographie mittels FPLC

Bei der Anionenaustauschchromatographie (IEX) besteht die Matrix der Säule aus substituierten quarternären Aminogruppen, an welche Proteine mit einem Überschuss an negativen Ladungen binden. Durch Anlegen eines Salzgradienten werden die gebundenen Proteine entsprechend der Stärke ihrer Interaktion mit dem Säulenmaterial sukzessiv eluiert. Das Eluat wird über einen Fraktionssammler aufgefangen, die Identität der Proteine in den jeweiligen Fraktionen wird mittels SDS-PAGE und Western-Blot bestimmt. Die Reinigung erfolgt bei 14°C, weil bei dieser Temperatur die maximale Trennschärfe der Resource Q-Säule erreicht wird.

Die Chromatographiesäule ist in ein BioLogic FPLC-Chromatographiesystem (Firma BioRad) integriert. Dieses besteht aus einer Steuereinheit, einem System zur Probeninjektion, Pumpen zum Transport der mobilen Phase, einem Photometer, einer Apparatur zur Messung der Leitfähigkeit sowie einem Fraktionssammler.

ResourceQ 1 ml

Die ResourceQ 1 ml (Amersham Pharmacia Biotech) ist ein starker Anionenaustauscher. Die Säulenmatrix besteht aus monodispersen Polystyren und Divinylbenzen. Die Flussrate beträgt $\Phi = 0,5-1$ ml/min. Aufgetragen auf die Säule wurden der gesamte Spaltungsansatz. Der Ansatz wird aber vorher auf 1 mM DTT und 10% Puffer B eingestellt. Anschließend wird

die Probe über einen 0,45 µm Luer-Filter filtriert und dann in die Probenschleife des Chromatographiesystems eingebracht. Nach Äquilibrierung der Säule mit 90 % (v/v) Puffer A / 10% (v/v) Puffer B (Flussrate 1 ml/ min, für 20 ml) wird der Inhalt der Probenschleife in das Chromatographiesystem über eine 2 ml Probenschleife injiziert (Flussrate 0,5 ml/ min).

Nach vollständiger Beladung der Säule wird mit 90 % (v/v) Puffer A / 10 % (v/v) Puffer B (isokratischer Fluss, Flussrate 1 ml/ min) gewaschen und dadurch der GST-Anteil entfernt. Durch kontinuierliche Erhöhung des Anteils an Puffer B in der mobilen Phase (auf 30 %, wird ein linearer Salzgradient angelegt. Dies führt zur Elution der Kinase von der Säule; das Elutionsprofil der an die Säule gebundenen Proteine wird durch photometrische Messung der Absorption A_{280} nm erstellt. Die Kinase eluiert bei 23 % Puffer B und 25 mS/cm. Die Kinase-enthaltenden Fraktionen wurden über SDS-PAGE überprüft. Zur vollständigen Freisetzung auf der Säule verbliebener Proteine wird der Anteil an Puffer B nach der Elution auf 100 % (v/v) gebracht; diese Pufferkonzentration wird bei einer Flussrate von 2 ml/ min für mindestens 5 min beibehalten. Zur Aufbewahrung der Säule wurde nach erfolgter Chromatographie diese mit MQ/0,02 % (w/v) NaN_3 entsalzt (Flussrate 2 ml/ min, für mindestens 5 min) und in 20% Ethanol gelagert.

7.8 Reversed-phase-HPLC

Die α D-Peptide wurden vor der CD-Spektroskopie über die *Reversed-phase-HPLC* noch zusätzlich gereinigt. HPLC steht für High Performance Liquid Chromatography. Es handelt sich um ein chromatographisches Trennverfahren, bei dem die zu untersuchende Substanz zusammen mit einem flüssigen Laufmittel, der "mobilen Phase" (auch "Eluent" genannt) auf eine sog. Trennsäule, die die "stationäre Phase" darstellt, gegeben wird. Wechselwirkt ein Bestandteil der zu untersuchenden Substanz stark mit der stationären Phase, verbleibt er relativ lange in der Säule. Wechselwirkt er hingegen schwach mit der stationären Phase, verlässt er die Säule früher. Je nach Stärke dieser Wechselwirkungen erscheinen die Bestandteile der Substanz zu verschiedenen Zeiten (den "Retentionszeiten") am Ende der Trennsäule, wo sie dann mit einem geeigneten Detektor nachgewiesen werden können. Es werden zwei Methoden unterschieden: Normal Phase (NP) und Reversed Phase (RP). Bei der NP-HPLC wird eine polare stationäre Phase (z.B. Silikagele/Kieselgel) und eine unpolare mobile Phase (z.B. Hexan) genutzt. Polare Moleküle werden auf der Säule länger retardiert als unpolare Moleküle und verlassen deshalb später die Säule. Die RP-HPLC ist in der Praxis die gängigste Methode. 70% aller analytischen HPLC-Trennungen sind RP-Trennungen. Hier wird eine unpolare stationäre Phase verwendet und eine polare mobile Phase. Die stationäre Phase wird hergestellt indem man Silane welche mit langkettigen Kohlenwasserstoffen substituiert wurden, mit Silicagel reagieren lässt. Dabei wird die polare Oberfläche der Silicagel-Partikel mit einer apolaren Schicht aus Alkanen überzogen, also die

Polarität umgekehrt (engl.: "Reversed"). Als mobile Phase werden meist Mischungen aus Wasser oder Puffer und Acetonitril, Tetrahydrofuran oder Methanol eingesetzt. Bei isokratischen Trennungen bleibt die Zusammensetzung der Mobilphase während der gesamten Zeit gleich. Bei Gradiententrennungen wird der unpolare Anteil während der Analyse erhöht. Besondere Anwendung findet die RP-HPLC bei der Auftrennung von polaren Analyten die auf Normalphasen zu hohe Retentionszeiten aufweisen würden. Die Detektion erfolgt mittels UV- Detektor bei 206 nm.

Durchführung:

- Zugabe von TFA (Trifluoressigsäure) auf 0,1 % (v/v)
- 5 min. bei 14000 rpm zentrifugieren
- Überstand abnehmen und auf die Säule auftragen

Bedingungen:

Trennsäule: ET 250/8/4 Nucleosil 300-7 C₈ (250 x 4 mm)

Flussrate: 0,5 ml/min

Puffer A: 0,1 % TFA

Puffer B: 0,1 % TFA, 80 % CH₃CN

Gradient:	Zeit [min.]	%B
	0	0
	15	30
	30	45
	40	50
	54	100

Die Peptide wurden bei ca. 35 % B von der Säule eluiert.

- peptidhaltige Fraktionen vereinigen
- Lösungsmittel im Vakuum (Speed-Vac) abziehen
- Rückstand 2x mit MQ resuspendieren und erneut abziehen
- Peptide in MQ aufnehmen
- Proteinkonzentrationsbestimmung über Absorptionsspektroskopie durchführen

7.9 Phosphorylierungsreaktionen

Es sei darauf hingewiesen, dass die offizielle SI-Einheit für die radioaktive Zerfallsrate das Becquerel (Bq [s⁻¹]), das Curie (Ci [s⁻¹]) aber die in der Literatur gebräuchliche Einheit ist (es gilt: 1 Ci = 3,7 · 10¹⁰ Bq).

7.9.1 Autophosphorylierung mit anschließender nativer PAGE

Die Autophosphorylierung erfolgte standardmäßig mit 1-10 mM ATP, 5 mM DTT, 30 mM Mg^{2+} in TRIS/ HCl, pH 7.5 für die angegebenen Zeiten bei Raumtemperatur. Zu den entsprechenden Zeitpunkten werden 20-30 μ l des Reaktionsansatzes entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 5x Probenpuffer mit EDTA gestoppt. Nach dem Abstoppen der Reaktion werden die Proben auf Eis gelagert. Die Proben werden mittels nativer PAGE (s. 7.7.1) aufgetrennt. Anschließend wird das Gel in Proteinfärbelösung angefärbt.

Die Autophosphorylierungen wurden in Anwesenheit und Abwesenheit der α D-Peptide bzw. der JM-Peptide durchgeführt.

Phosphorylierungsansatz

- 10 x Kinasepuffer
- 1 - 10 μ M Kinase
- 100-10 mM ATP (E.K. 10-1 mM)
- aufgefüllt auf Endvolumen mit 50 mM TRIS/ HCl pH 7.5
- Beimengung der α D- bzw. JM-Peptide in der gewünschten Konzentration

10x Kinasepuffer:

- 300 mM $MgCl_2$
- 100-10 mM ATP
- 50 mM DTT
- 0,5 M TRIS/ HCl pH 7,5

7.9.2 Radioaktive Auto- und Substratphosphorylierungen

Bei der Auto- und Substratphosphorylierung der in dieser Arbeit beschriebenen Kinasen wurde [$\gamma^{32}P$]-ATP mit einer spezifischen Aktivität von 150-300 cpm/pmol als Kosubstrat der Reaktion eingesetzt, so dass sich in einem Zeitwert 1-2 μ Ci Radioaktivität befinden. Der Start der Reaktion wird entweder durch Zugabe von Kinase oder 10X Kinasepuffer (s. 7.9.1) eingeleitet. Zu den gewählten Zeitpunkten werden dem Reaktionsansatz Aliquots entnommen und durch Zugabe von EDTA oder 10X SDS-Probenpuffer abgestoppt. Zur Bestimmung der inkorporierten Radioaktivität nach Auto- oder Substratphosphorylierungsreaktionen wurden zwei Methoden angewendet. Die Radioaktivität des inkorporierten radioaktiven Phosphates wurde durch Messung der Cerenkovstrahlung im Tritium-(3H)-Fenster des β -Szintillationszählers ermittelt.

Dot-Blot auf Phosphozellulose-Papier [Sahal und Fujita-Yamaguchi, 1987]

Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration 50 mM) beendet und 5 μ l auf Whatman P81-Papier aufgetragen. Das Papier wurde anschließend viermal für 15 min mit eiskalter 10 % (w/v) TCA/10 mM Natriumpyrophosphat und abschließend für 10 min mit Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurden die Probenfelder ausgeschnitten und die Radioaktivität durch Messung der Cerenkov-Strahlung bestimmt.

SDS-PAGE

Die Reaktion wurde durch Zugabe von SDS-Probenpuffer (100 mM DTT) beendet. Die Proben wurden 5 min bei 95 °C denaturiert und danach durch SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde 20 min fixiert (50 % Methanol, 7 % Essigsäure) und auf einem Geltrockner zwischen einer Zellulosefolie unter Vakuum getrocknet. Durch Autoradiographie des getrockneten Gels wurden die radioaktiven Proteinbanden lokalisiert und die Banden ausgeschnitten. Die Radioaktivität der Gelstücke wurde durch Messung der Cerenkov-Strahlung bestimmt.

7.10 Circular Dichroismus (CD)-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie beruht auf der Wechselwirkung von zirkular polarisiertem Licht mit optisch aktiven Substanzen. In linear polarisiertem Licht bewegt sich das elektromagnetische Feld wellenförmig senkrecht zur Ausbreitungsrichtung. Linear polarisiertes Licht besteht im Prinzip aus zwei zirkular polarisierten Komponenten, deren elektromagnetisches Feld helixartig um die Ausbreitungsrichtung rotiert. Dem Umlaufsinn entsprechend werden sie als rechts- bzw. linkszirkular polarisiert bezeichnet.

Bei der CD-Spektroskopie wird die unterschiedliche Absorption des rechts- bzw. linkszirkular polarisierten Lichts durch ein optisch aktives Molekül ausgenutzt. Es wird die Differenz der Absorptionskoeffizienten der beiden Komponenten gemessen und als Elliptizität angegeben. Da alle Aminosäuren außer Glycin ein chirales Zentrum besitzen, eignet sich die CD-Spektroskopie besonders zur Strukturanalyse von Proteinen [Schmidt, 1997].

Spektren im Bereich von 185 bis 250 nm (Fern-UV-CD-Spektroskopie) beruhen auf der Absorption der Peptidbindungen, die sehr empfindlich von der Konformation der Bindungen abhängt. Wellenlänge und Absorptionskoeffizient von α -Helix, β -Faltblatt und Zufallsknäuel unterscheiden sich deutlich [Johnson, 1990]. Das Spektrum eines Proteins setzt sich charakteristisch aus verschiedenen Anteilen der Sekundärstrukturen zusammen.

Im Nah-UV Bereich (250-310 nm) basiert das Spektrum auf der Absorption aromatischer Aminosäuren, insbesondere Tryptophan. Ein ausgeprägtes Nah-UV-CD-Spektrum belegt,

dass die Tryptophanreste sich in einer asymmetrischen Umgebung befinden und ist somit ein sehr empfindlicher Nachweis für eine definierte Tertiärstruktur.

Bei Fern-UV-CD-Messungen mit Proteinen wird die Elliptizität pro Aminosäure bezogen auf das durchschnittliche Molekulargewicht angegeben [Schmidt, 1997]:

$$\Theta_{MRW} = \frac{\Theta_{obs} \cdot MRW}{c \cdot d} = \frac{\Theta_{obs} \cdot M_r}{c \cdot d \cdot N_A \cdot 10}$$

Θ_{MRW} : durchschnittliche Elliptizität pro Aminosäure [Grad • cm²/dmol]

Θ_{obs} : gemessene Elliptizität [mGrad]

MRW: mittleres Molekulargewicht der Aminosäuren [Da]

c: Konzentration der Proteinlösung [mg/ml]

d: Schichtdicke der Küvette [cm]

M_r : Molekulargewicht des Proteins [g/mol]

N_A : Anzahl der Aminosäuren im Protein

7.11 Datenauswertung und –darstellung

Alle in dieser Arbeit gezeigten Abbildungen wurden mit MS Office™ 2003 Pro, SigmaPlot™ und Prism™ erstellt.

8 Literaturverzeichnis

- Adams, T. E., Epa, V. C., Garrett, T. P., and Ward, C. W. *Cell Mol. Life Sci.* 2000; **57**(7):1050-1093
- Al-Hasani, H. (1995) *Dissertation an der Universität zu Köln*
- Backer, J. M., Kahn, C. R., Cahill, D. A., Ullrich, A., and White, M. F. *J. Biol. Chem.* 25-9- 1990; **265**(27):16450-16454
- Baer, K. Al-Hasani, H., Parvaresh, S., Corona, T., Rufer, A., Noelle, V., Bergschneider, E., and Klein, H. W. *Biochemistry* 27-11-2001; **40**(47):14268-14278
- Baer et al. (2005) in press *Biochimica et Biophysica Acta*
- Bain, J., McLauchlan, H., Elliott, M., and Cohen, P. *Biochem J.* 01-04-2003; **371**(Pt 1):199-204
- Biondi, R. M. and Nebreda, A. R. *Biochem. J.* 15-5-2003; **372**(Pt 1):1-13
- Blakesley, R. W. and Boezi, J. A. *Anal. Biochem.* 1977; **82**(2):580-582
- Blencke, S., Ullrich, A., and Daub, H. *J. Biol. Chem.* 25-4-2003; **278**(17):15435-15440
- Blume-Jensen, P. and Hunter, T. *Nature* 17-5-2001; **411**(6835):355-365
- Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* 7-5-1976; **72**(248-254)
- Brown, M. T. and Cooper, J. A. *Biochim. Biophys. Acta* 7-6-1996; **1287**(2-3):121-149
- Canagarajah, B. J., Khokhlatchev, A., Cobb, M. H., and Goldsmith, E. J. *Cell* 5-9-1997; **90**(5):859-869
- Cann, A. D., Bishop, S. M., Ablooglu, A. J., and Kohanski, R. A. *Biochemistry* 11-8-1998; **37**(32):11289-11300
- Capdeville, R., Buchdunger, E., Zimmermann, J., and Matter, A. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2002; **1**(7):493-502
- Chin, J. E., Tavaré, J. M., Ellis, L., and Roth, R. A. *J. Biol. Chem.* 25-8-1991; **266**(24):15587-15590
- Cohen, P. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2002; **1**(4):309-315
- Corona, T. (1999) *Diplomarbeit an der Universität zu Köln*
- Dancey, J. and Sausville, E. A. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003; **2**(4):296-313
- Datta, K., Franke, T. F., Chan, T. O., Makris, A., Yang, S. I., Kaplan, D. R., Morrison, D. K., Golemis, E. A., and Tsichlis, P. N. *Mol. Cell Biol.* 1995; **15**(4):2304-2310
- Daub, H., Specht K., and Ullrich A. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004; **3**(12):1001-1010
- Desbois-Mouthon, C., Danan, C., Amselem, S., Blivet-Van Eggelpoel, M. J., Sert-Langeron, C., Goossens, M., Besmond, C., Capeau, J., and Caron, M. *Metabolism* 1996; **45**(12):1493-1500

- Dodelet, V. C. and Pasquale, E. B. *Oncogene* 20-11-2000; **19**(49):5614-5619
- Dower, W. J., Miller, J. F., and Ragsdale, C. W. *Nucleic Acids Res.* 11-7-1988; **16**(13):6127-6145
- Ebina, Y., Ellis, L., Jarnagin, K., Edery, M., Graf, L., Clauser, E., Ou, J. H., Masiarz, F., Kan, Y. W., Goldfine, I. D., et al. *Cell* 1985; **40**(4):747-758
- Eckhart, W., Hutchinson, M. A., and Hunter, T. *Cell* 1979; **18**(4):925-933
- Elhamine, F. (2004) *Diplomarbeit an der Universität zu Köln*
- Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., O'Brien, S., Kurzrock, R., and Kantarjian, H. M. *N. Engl. J. Med.* 15-7-1999; **341**(3):164-172
- Gamboni, S., Chaperon, C., Friedrich, K., Baehler, P. J., and Reymond, C. D. *Biochemistry* 1-9-1998; **37**(35):12189-12194
- Godl, K., Wissing, J., Kurtenbach, A., Habenberger, P., Blencke, S., Gutbrod, H., Salassidis, K., Stein-Gerlach, M., Missio, A., Cotton, M., and Daub, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 23-12-2003; **100**(26):15434-9
- Gondeau, C., Gerbal-Chaloin, S., Bello, P., drian-Herrada, G., Morris, M. C., and Divita, G. J. *Biol. Chem.* 8-4-2005; **280**(14):13793-13800
- Gonfloni, S., Williams, J. C., Hattula, K., Weijland, A., Wierenga, R. K., and Superti-Furga, G. *EMBO J.* 15-12-1997; **16**(24):7261-7271
- Gonfloni, S., Frischknecht, F., Way, M., and Superti-Furga, G. *Nat. Struct. Biol.* 1999; **6**(8):760-764
- Gorre, M. E., Mohammed, M., Ellwood, K., Hsu, N., Paquette, R., Rao, P. N., and Sawyers, C. L. *Science* 3-8-2001; **293**(5531):876-880
- Griffith, J., Black, J., Faerman, C., Swenson, L., Wynn, M., Lu, F., Lippke, J., and Saxena, K. *Mol. Cell* 30-1-2004; **13**(2):169-178
- Gschwind, A., Fischer, O. M., and Ullrich, A. *Nat. Rev. Cancer* 2004; **4**(5):361-370
- Gustafson, T. A., He, W., Craparo, A., Schaub, C. D., and O'Neill, T. J. *Mol. Cell Biol.* 1995; **15**(5):2500-2508
- Hirota, S., Isozaki, K., Moriyama, Y., Hashimoto, K., Nishida, T., Ishiguro, S., Kawano, K., Hanada, M., Kurata, A., Takeda, M., Muhammad, Tunio G., Matsuzawa, Y., Kanakura, Y., Shinomura, Y., and Kitamura, Y. *Science* 23-1-1998; **279**(5350):577-580
- Hubbard, S. R. *EMBO J.* 15-9-1997; **16**(18):5572-5581
- Hubbard, S. R., Mohammadi, M., and Schlessinger, J. *J. Biol. Chem.* 15-5-1998; **273**(20):11987-11990
- Hubbard, S. R. *Nat. Struct. Biol.* 1999; **6**(8):711-714
- Hunter, T., *J. Biol. Chem.* 10-05-1982; **257**(9):4843-4848
- Hunter, T. *Cell* 10-4-1987; **49**(1):1-4

- Hunter, T. and Pines, J. *Cell* 18-11-1994; **79**(4):573-582
- Huse, M., Muir, T. W., Xu, L., Chen, Y. G., Kuriyan, J., and Massague, J. *Mol. Cell* 2001; **8**(3):671-682
- Huse, M. and Kuriyan, J. *Cell* 3-5-2002; **109**(3):275-282
- Irusta, P. M., Luo, Y., Bakht, O., Lai, C. C., Smith, S. O., and DiMaio, D. *J. Biol. Chem.* 11-10-2002; **277**(41):38627-38634
- Jeffrey, P. D., Russo, A. A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J., and Pavletich, N. P. *Nature* 27-7-1995; **376**(6538):313-320
- Johnson, W. C., Jr. *Proteins* 1990; **7**(3):205-214
- Karau, D. (2004) *Diplomarbeit an der Universität zu Köln*
- Kessler, D. (1998) *Diplomarbeit an der Universität zu Köln*
- Knighton, D. R., Zheng, J. H., Ten Eyck, L. F., Ashford, V. A., Xuong, N. H., Taylor, S. S., and Sowadski, J. M. *Science* 26-07-1991; **253**(5018):407-414
- Kohanski, R. A. *J. Biol. Chem.* 15-12-1989; **264**(35):20984-20991
- Kunstle, G., Laine, J., Pierron, G., Kagami, Si S., Nakajima, H., Hoh, F., Roumestand, C., Stern, M. H., and Noguchi, M. *Mol. Cell Biol.* 2002; **22**(5):1513-1525
- Kuriyan, J. and Cowburn, D. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1997; **26**(259-288)
- Laemmli, U. K. *Nature* 15-8-1970; **227**(5259):680-685
- Levinson, A. D., Oppermann, H., Levintow, L., Varmus, H. E., and Bishop, J. M. *Cell* 1978; **15**(2):561-572
- Li, S., Covino, N. D., Stein, E. G., Till, J. H., and Hubbard, S. R. *J. Biol. Chem.* 11-7-2003; **278**(28):26007-26014
- Li, S. L., Yan, P. F., Paz, I. B., and Fujita-Yamaguchi, Y. *Biochemistry* 15-12-1992; **31**(49):12455-12462
- Lee, S., Lin, X., Nam, N. H., Parang, K., and Sun, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 9-12-2003; **100**(25):14707-14712
- Lehr S. (1995) *Diplomarbeit an der Universität zu Köln*
- McGettrick, A. J., Feener, E. P., and Kahn, C. R. *J. Biol. Chem.* 25-2-2005; **280**(8):6441-6446
- McHarg, J., Kelly, S. M., Price, N. C., Cooper, A., and Littlechild, J. A. *Eur. J. Biochem.* 1999; **259**(3):939-945
- Minamide, L. S. and Bamberg, J. R. *Anal. Biochem.* 1990; **190**(1):66-70
- Mohammadi, M., Schlessinger, J., and Hubbard, S. R. *Cell* 23-8-1996; **86**(4):577-587
- Morgan, D. O. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1997; **13**(261-291)
- Morrison, B. D. and Pessin, J. E. *J. Biol. Chem.* 25-2-1987; **262**(6):2861-2868
- Muhsin, M., Graham, J., and Kirkpatrick, P. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003; **2**(7):515-516

- Munshi, S., Kornienko, M., Hall, D. L., Reid, J. C., Waxman, L., Stirdivant, S. M., Darke, P. L., and Kuo, L. C. *J. Biol. Chem.* 11-10-2002; **277**(41):38797-38802
- Munshi, S., Hall, D. L., Kornienko, M., Darke, P. L., and Kuo, L. C. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 2003; **59**(Pt 10):1725-1730
- Nada, S., Okada, M., MacAuley, A., Cooper, J. A., and Nakagawa, H. *Nature* 2-5-1991; **351**(6321):69-72
- Noelle, V., Tennagels, N., and Klein, H. W. *Biochemistry* 20-6-2000; **39**(24):7170-7177
- Ogawa, A., Takayama, Y., Sakai, H., Chong, K. T., Takeuchi, S., Nakagawa, A., Nada, S., Okada, M., and Tsukihara, T. *J. Biol. Chem.* 26-4-2002; **277**(17):14351-14354
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. *Protein Sci.* 1995; **4**(11):2411-2423
- Pavletich, N. P. *J. Mol. Biol.* 16-4-1999; **287**(5):821-828
- Pawson, T. *Nature* 16-2-1995; **373**(6515):573-580
- Rajagopalan, M., Neidigh, J. L., and McClain, D. A. *J. Biol. Chem.* 5-12-1991; **266**(34):23068-23073
- Rial, D. V. and Ceccarelli, E. A. *Protein Expr. Purif.* 2002; **25**(3):503-507
- Rogon, C. (2004) *Diplomarbeit an der Universität zu Köln*
- Roskoski, R., Jr. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 26-11-2004; **324**(4):1155-1164
- Rubin, G. M., Yandell, M. D., Wortman, J. R., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C. R., Hariharan, I. K., Fortini, M. E., Li, P. W., Apweiler, R., Fleischmann, W., Cherry, J. M., Henikoff, S., Skupski, M. P., Misra, S., Ashburner, M., Birney, E., Boguski, M. S., Brody, T., Brokstein, P., Celniker, S. E., Chervitz, S. A., Coates, D., Cravchik, A., Gabrielian, A., Galle, R. F., Gelbart, W. M., George, R. A., Goldstein, L. S., Gong, F., Guan, P., Harris, N. L., Hay, B. A., Hoskins, R. A., Li, J., Li, Z., Hynes, R. O., Jones, S. J., Kuehl, P. M., Lemaître, B., Littleton, J. T., Morrison, D. K., Mungall, C., O'Farrell, P. H., Pickeral, O. K., Shue, C., Vossell, L. B., Zhang, J., Zhao, Q., Zheng, X. H., and Lewis, S. *Science* 24-3-2000; **287**(5461):2204-2215
- Sahal, D. and Fujita-Yamaguchi, Y. *Anal. Biochem.* 15-11-1987; **167**(1):23-30
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., und Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Schmolz K. (2002) *Diplomarbeit an der Universität zu Köln*
- Schmidt, F.X. *Proofs for Protein Structure: A Practical Approach* Optical Spectroscopy to Characterize Protein Conformations and Conformational Changes, chapter 11, pages 259-95. Creighton TE, IRL Press, Oxford 2nd edition (1997)
- Schulte, R. J. and Sefton, B. M. *Biochemistry* 12-8-2003; **42**(31):9424-9430
- Seely, B. L., Reichart, D. R., Takata, Y., Yip, C., and Olefsky, J. M. *Endocrinology* 1995; **136**(4):1635-1641

- Siemeister, G., Al-Hasani, H., Klein, H. W., Kellner, S., Streicher, R., Krone, W., and Muller-Wieland, D. *J. Biol. Chem.* 3-3-1995; **270**(9):4870-4874
- Smith, D. B. and Johnson, K. S. *Gene* 15-7-1988; **67**(1):31-40
- Sohn, J., Kristjansdottir, K., Safi, A., Parker, B., Kiburz, B., and Rudolph, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 23-11-2004; **101**(47):16437-16441
- Sondhi, D., Xu, W., Songyang, Z., Eck, M. J., and Cole, P. A. *Biochemistry* 6-1-1998; **37**(1):165-172
- Stamos, J., Sliwkowski, M. X., and Eigenbrot, C. *J. Biol. Chem.* 29-11-2002; **277**(48):46265-46272
- Summers M. D. und Smith G. E. (1987) *A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures*, Texas Agricultural Experimental Station, Bulletin No. **1555**
- Sun, X. J., Rothenberg, P., Kahn, C. R., Backer, J. M., Araki, E., Wilden, P. A., Cahill, D. A., Goldstein, B. J., and White, M. F. *Nature* 4-7-1991; **352**(6330):73-77
- Superti-Furga, G. and Courtneidge, S. A. *Bioessays* 1995; **17**(4):321-330
- Takahashi, Y., Kadowaki, H., Momomura, K., Fukushima, Y., Orban, T., Okai, T., Taketani, Y., Akanuma, Y., Yazaki, Y., and Kadowaki, T. *Diabetologia* 1997; **40**(4):412-420
- Treadway, J. L., Morrison, B. D., Goldfine, I. D., and Pessin, J. E. *J. Biol. Chem.* 25-12-1989; **264**(36):21450-21453
- Ullrich, A., Gray, A., Tam, A. W., Yang-Feng, T., Tsubokawa, M., Collins, C., Henzel, W., Le, Bon T., Kathuria, S., Chen, E., et al. *EMBO J.* 1986; **5**(10):2503-2512
- Ullrich, A. and Schlessinger, J. *Cell* 20-4-1990; **61**(2):203-212
- Wei, L., Hubbard, S. R., Hendrickson, W. A., and Ellis L. *J. Biol. Chem.* 07-04-1995; **270**(14):8122-8130
- Wieber, A. (1998) *Diplomarbeit an der Universität zu Köln*
- Wieser, R., Wrana, J. L., and Massague, J. *EMBO J.* 15-5-1995; **14**(10):2199-2208
- Williams, J. C., Weijland, A., Gonfloni, S., Thompson, A., Courtneidge, S. A., Superti-Furga, G., and Wierenga, R. K. *J. Mol. Biol.* 19-12-1997; **274**(5):757-775
- Wilson K. und Goulding, K. H. (1991) *Methoden der Biochemie*, 3. Auflage, Thieme-Verlag
- Wybenga-Groot, L. E., Baskin, B., Ong, S. H., Tong, J., Pawson, T., and Sicheri, F. *Cell* 21-9-2001; **106**(6):745-757
- Xu, W., Harrison, S. C., and Eck, M. J. *Nature* 13-2-1997; **385**(6617):595-602
- Yan, P. F., Li, S. L., Liang, S. J., Giannini, S., and Fujita-Yamaguchi, Y. *J. Biol. Chem.* 25-10-1993; **268**(30):22444-22449
- Zhou, C., Yang, Y., and Jong, A. Y. *Biotechniques* 1990; **8**(2):172-173

9 Anhang

9.1 GST-Abtrennung und Purifikation der IRKDA72C Kinasen

Nach der Expression und Reinigung der GST-IRKDA72C Kinasen, wurden die Proteine über Thrombinbehandlung (1U pro 360 µg Fusionsprotein) über Nacht bei 4°C vom GST abgespalten. Die Abb. 9.1 zeigt das Ergebnis der Spaltung musterhaft für die R1092Q-Mutante. Man kann erkennen, dass fast alles an vorhandenem Protein geschnitten worden ist.

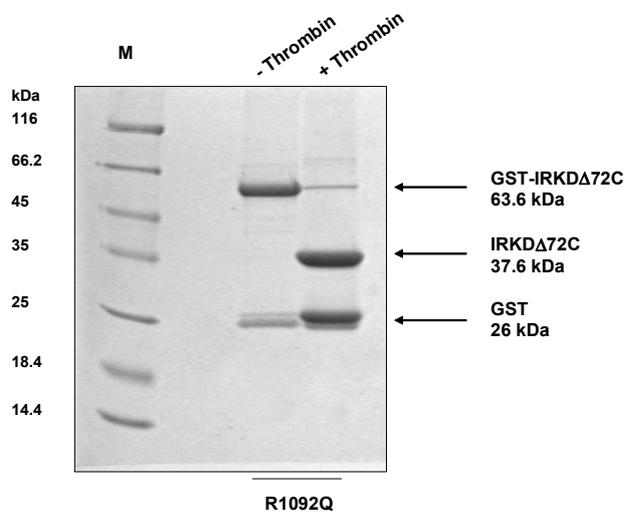


Abb. 9.1: GST-Abtrennung über Thrombin von GST-IRKDA72C

Die Reaktionsbedingungen wurden wie folgt gewählt: 1U Thrombin pro 360 µg GST-Protein über Nacht bei 4°C. Die Reaktion lief in 50 mM Tris/HCl pH 8,0 und 1 mM EDTA ab. Dargestellt ist das Coomassie-gefärbte Gel nach 12% SDS-PAGE. Aufgetragen sind je 5 µg Protein vor und nach Spaltung

Anschließend wurde der Spaltungsansatz wie in 7.7.3 über Anionenaustauschchromatographie (IEX) mittels FPLC aufgetrennt. Das Elutionsprofil ist photometrisch bei $\lambda = 280$ nm gemessen worden (Abb. 9.2). Wieder ist repräsentativ nur für die R1092Q-Kinase mutante das Resultat gezeigt.

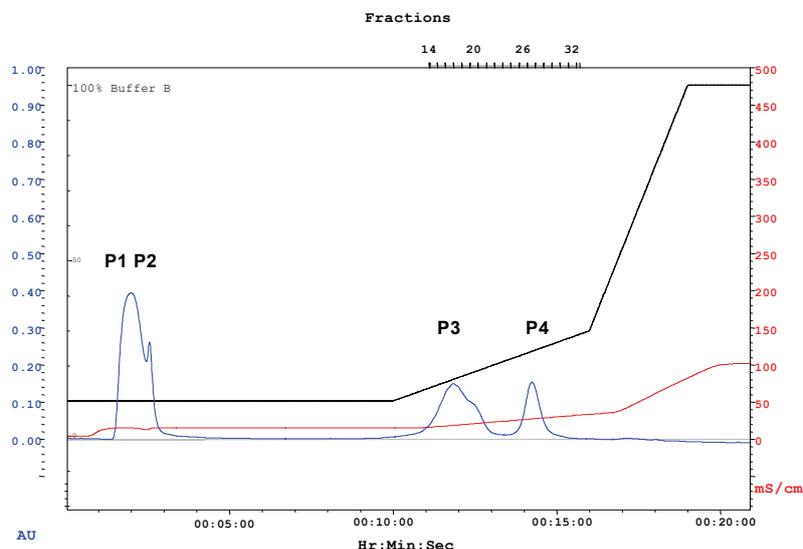
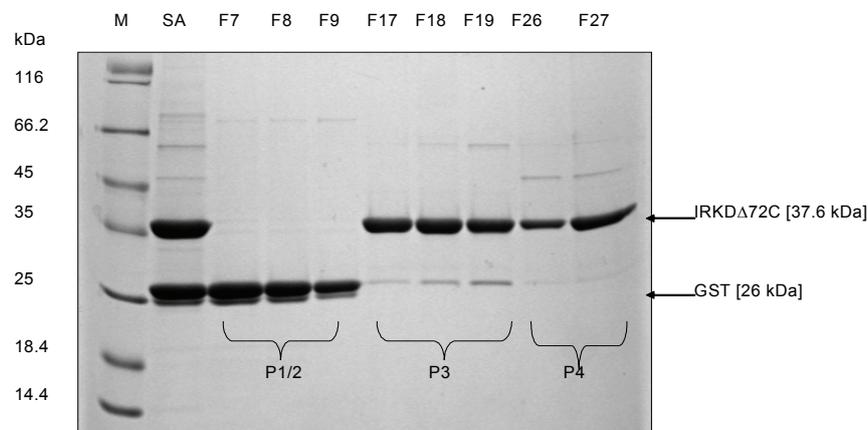


Abb. 9.2: Chromatogramm der Reinigung der IRKΔ72C-R1092Q Kinase mittels IEX

Gezeigt ist das gesamte Elutionsprofil mit der Absorption [AU] $A_{280\text{nm}}$ in blau und der Leitfähigkeit [mS/cm] der mobilen Phase. Die Peaks 3 und 4 (P3/P4) enthalten die Kinase, während die ersten beiden Peaks (P1/P2) die GST-enthaltenden Fraktionen darstellen.

Die IRKΔ72C-R1092Q Kinase eluiert in zwei Schritten (Peak 3 und 4). In der Abb. 9.3 ist das SDS-Gel der untersuchten Fraktionen präsentiert. Die Fraktionen des Peaks 3 enthalten noch geringe Menge an GST und die Fraktionen im Peak 4 dagegen nur noch Spuren an GST. Letztere Kinasefraktionen wurden dann für weitere Analysen verwendet.

**Abb. 9.3: SDS-PAGE (12%) von den gesammelten FPLC-Fraktionen der IRKΔ72C-R1092Q-Reinigung über IEX**

Aufgetragen sind zu je 50 μl der zu reinigende Spaltungsansatz (SA), die Fraktionen des 1. und 2. Peaks und die Fraktionen von Peak 3 und 4. Geringe Menge an GST sind auch im Peak 3 zu sehen, aber im Peak 4 sind es nur noch Spuren.

9.2 Plasmidkarten

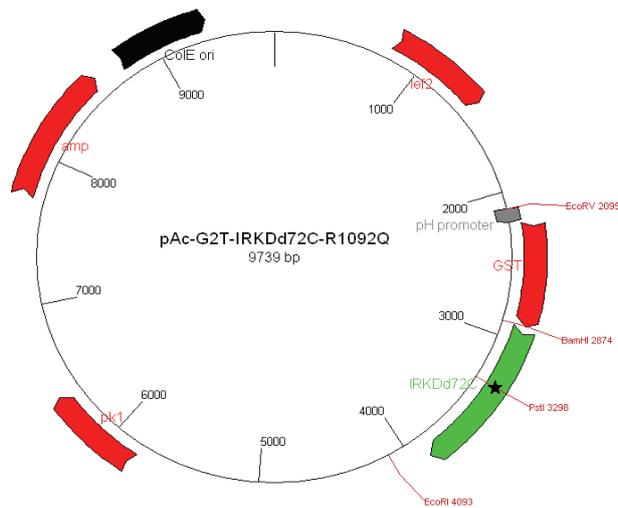


Abb. 9.4: Plasmidkarte des Transfektionsvektors pAc-G2T-IRKd72C-R1092Q

Der Stern markiert die Stelle wo die Substitution stattgefunden hat und die neue PstI-Schnittstelle eingeführt worden ist.

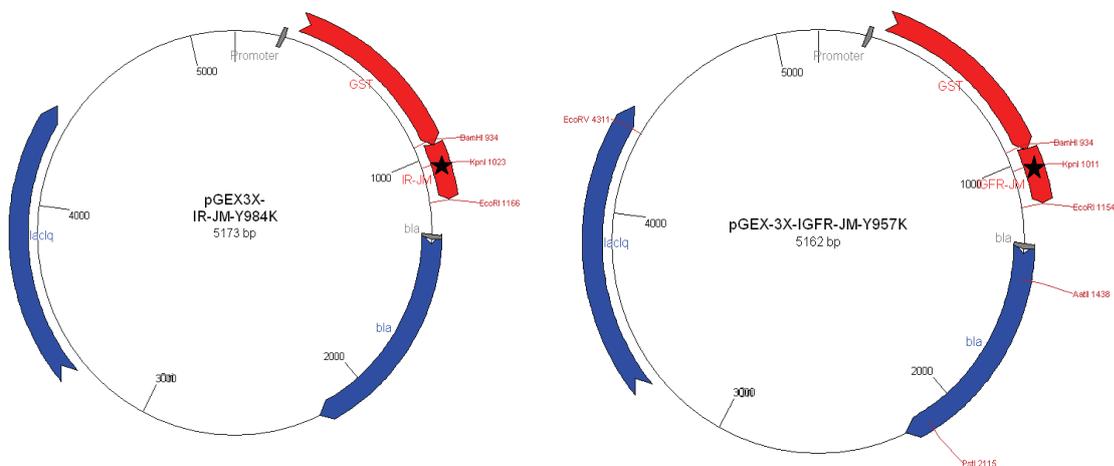


Abb. 9.5: Plasmidkarten von pGEX3X-IR-JM_{Y984K} und pGEX3X-IGFR-JM_{Y957K}

Exemplarisch sind nur die Karten für die Konstrukte mit der Substitution Y984K bzw. Y957K abgebildet. Die neu eingeführte KpnI-Schnittstelle ist mit einem Stern markiert.

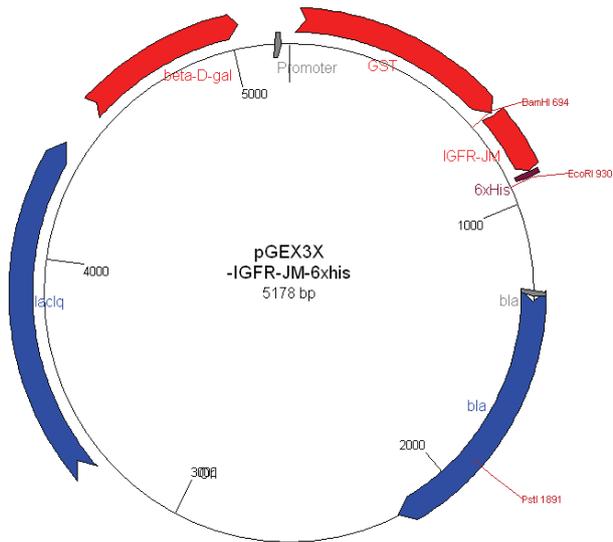


Abb. 9.6: Plasmidkarte des Vektors pGEX3X-IGFR-JM_{WT}-6xhis

Dargestellt ist stellvertretend das um den 6xHis-Tag C-terminal verlängerte IGFR-JM_{WT}-Konstrukt

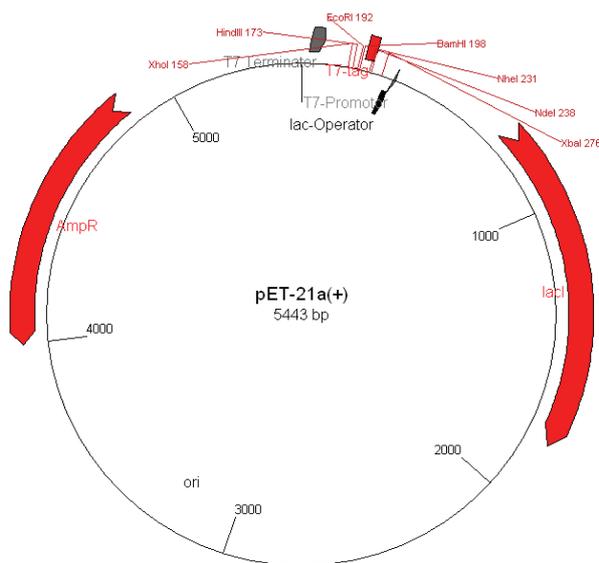


Abb. 9.7: Plasmidkarte des Vektors pET-21a(+)-Expressionsvektor

In pET-Vektoren sind die Zielgene unter der Kontrolle des starken T7-Bakteriophagen-Promoters. Die Expression wird induziert durch die Bereitstellung der T7-RNA-Polymerase der (DE3)-Wirtszelle.

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben: Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. H. W. Klein nicht nur für die Überlassung des interessanten Themas und die zahlreichen und fruchtbaren wissenschaftlichen Diskussionen, sondern ganz besonders für das in mir gesetzte Vertrauen und das stets freundschaftliche Verhältnis sowie die ständige Hilfsbereitschaft und die vielfältigen Anregungen.

Meinen Kolleginnen Kristin Baer, Susan Parvaresh, Monika Gompert und Arne Rufer danke ich ganz herzlich für die jahrelange harmonische Zusammenarbeit und deren Unterstützung für das Gelingen dieser Dissertation durch Rat, Tat und Material. Daniel-Sebastian Karau danke ich für die wunderbare Zeit, die wir gemeinsam im Labor 13 verbracht haben. Herrn Magnus Manske danke ich vielmals für die stete Hilfe bei allen EDV-Belangen und ständige Versorgung mit frischem Kaffee. Den jetzigen Kollegen Marie-Therese Finken, Dörthe Wirtz, Daniel Fischer, Julia Wassermann, Sebastian Neubert, Alexander Krupp und Claus Bender und meinen ehemaligen Mitarbeitern Hadi Al-Hasani, Ivonne Lisinski, Jan Gebauer, Lars Thiebach und Christian Rogon danke ich für die gute Zusammenarbeit, das angenehme Arbeitsklima und ihrer Hilfsbereitschaft.

Desweiteren danke ich allen Mitarbeitern des Biochemischen Instituts und der Nuklearchemie für ihre kompetente Hilfe und das freundschaftliche Verhältnis. Ganz besonders möchte ich mich da bei Herrn Manfred Kreikler, Arthur Reuter, Uwe Otto, Herrn Pyschny, Egon Bolz und Frau Nadja Hellmann bedanken.

Nicht unerwähnt bleiben sollen die zahllosen Praktikanten/-innen unter meiner Führung, die mir durch fleißiges Pipettieren viel geholfen haben.

Für die kontinuierliche und großzügige finanzielle Unterstützung möchte ich mich beim ZMMK bedanken.

Meiner Familie, meinen Freunden und Bekannten danke ich für Ihr Verständnis, für Ihre Geduld und Unterstützung. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder 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 der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Helmut W. Klein betreut worden.

Tanju Yesilkaya

Lebenslauf

Name: Tanju Yesilkaya

Wohnhaft in: Köln

Geburtsdatum/-ort: 01.05.1977 / Köln

Familienstand: ledig

Schulabschluss: Abitur 1996 am Johann-Gottfried-Herder
Gymnasium in Köln

Ersatzdienst: 1996-1997 MSHD der Caritas Köln e.V.

Studium: Oktober 1997 – Juni 2002 an der Universität
zu Köln - Fachrichtung Biologie mit
Abschluss Diplom

Juli 2001 – März 2002
Diplomarbeit an der Universität zu Köln
unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. W.
Klein „14-3-3 – Ein Interaktionspartner für
die duale Aktivität des Insulin- und IGF-1
Rezeptors“

Juni 2002 – Juli 2005
Dissertation an der Universität zu Köln unter
der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. W. Klein
„Kinase-Inhibitoren außerhalb der ATP-
Bindungsstelle“

