

Strukturbasierte Entwicklung
von
Kinaseinhibitoren

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Dörthe Hendrike Wirtz

aus Köln

2009

Berichterstatter:

Prof. Dr. H. W. Klein (1.Gutachter)

Prof. Dr. R. Kraemer (2.Gutachter)

Prof. Dr. B. Goldfuß (Prüfungsvorsitz)

Tag der mündlichen Prüfung:

25.06.2009

Meiner Familie

*„Probleme kann man niemals mit derselben Denkweise lösen,
durch die sie entstanden sind.“*

Albert Einstein

Die im folgenden dokumentierte Arbeit wurde in der Zeit vom
01.09.2005 bis zum 30. September 2009
am Institut für Biochemie der Universität zu Köln
unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. W. Klein durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	1
2 Abstract.....	3
3 Einleitung.....	5
3.1 Allgemeine Einleitung.....	5
3.2 Rezeptortyrosinkinasen.....	5
3.3 Kinaseregulation.....	8
3.3.1 Cis-Inhibitions/trans-Aktivierungsmodell.....	8
3.3.2 Regulation über Protein-Protein-Wechselwirkung: Die α C-Helix als Indikator der aktiven Konformation.....	10
3.3.3 Autoinhibition im Juxtamembranbereich.....	14
3.3.4 Kinaseaktivierung über Dimerisierung.....	15
3.4 Funktionen des IGF-1R.....	20
3.5 Kinasen als Target für Krebstherapeutika	22
3.6 Phage Display	25
3.7 Fragestellung.....	27
4 Ergebnisse.....	29
4.1 Überblick über alle verwendeten Kinasekonstrukte.....	29
4.2 Überblick über alle in der Arbeit verwendeten Zielproteine und Substrate.....	31
4.3 Generierung der Peptide.....	33
4.3.1 Expression, Reinigung und Markierung der Fusionspeptide	34
4.3.2 Proteolytischer Verdau zur Generierung der Peptide.....	36
4.4 Charakterisierung der GST-Kinasen	38
4.4.1 Aktivitätstest auf der nativen PAGE.....	38
4.4.2 Bestimmung der kinetischen Daten für die Substratphosphorylierung.....	39
4.5 Charakterisierung der monomeren Kinase.....	41
4.5.1 Autophosphorylierung auf der nativen PAGE.....	41
4.5.2 Bestimmung der kinetischen Daten für die Substratphosphorylierung.....	41
4.6 Kreuzmutationsexperimente	43
4.7 Phage Display.....	46
4.7.1 Phage Display gegen die Juxtamembrandomäne	47
4.7.2 Phage Display gegen die α D-Helix/hinge region.....	50
4.8 Charakterisierung der Peptide gegen den GST-IGF-NT.....	52
4.8.1 Die Peptide IGF-NT K1 und K3 inhibieren die Auto- und Substrat-phosphorylierung der monomeren IGF Δ C.....	52
4.8.2 Die Aktivität der dimeren Kinase wird nicht beeinflusst	54
4.8.3 Die Bindung der Peptide verhindert die Interaktion der Kinase mit der Phosphotyrosin-bindenden Domäne.....	55
4.8.4 Untersuchungen zur Spezifität	57
4.8.5 Das Peptid IGF-NT K3 inhibiert die Autoaktivierung der monomeren Kinase	59
4.8.6 IGF-NT K3 interferiert mit der Kinasedimerisierung.....	61
4.8.7 Beeinflusst IGF-NT K3 die Bindung von ATP?.....	63
4.8.8 Bestimmung des IC50.....	64
4.8.9 Nachweis der Bindung der Peptide an die Kinase	65
4.9 Charakterisierung der Peptide gegen das α D-Peptid.....	67
4.9.1 Die Peptide inhibieren die Auto- und Substratphosphorylierung der monomeren IGF Δ C.....	67
4.9.2 Untersuchungen zur Spezifität	69
4.9.3 Die Aktivität der dimeren Kinase wird nicht beeinflusst	71

4.9.4	Bindung von α D-Peptid K2-Cys verhindert die Autoaktivierung der monomeren Kinase	73
4.9.5	Der Dimerisierungsprozess wird nicht beeinträchtigt	75
4.9.6	Die monomere Kinase wird in ihrer inaktiven Konformation fixiert	76
4.9.7	Beeinflusst α D-Peptid K2-Cys die Bindung von ATP?	77
4.9.8	Bestimmung des IC50	79
4.9.9	Nachweis der Bindung der Peptide an die Kinase	80
5	Diskussion	81
5.1	Welche Bereiche einer Kinase kommen für eine spezifische Inhibition in Frage?	81
5.2	Generierung und Charakterisierung der Kinasen	82
5.3	Phage Display	84
5.4	Generierung der Peptide in E.coli	86
5.5	Inhibitionswirkung der aus Phage Display gewonnenen Peptide	86
5.5.1	Die Inhibition ist spezifisch	89
5.5.2	Die Phage Display-Peptide zeigen nur gegen die inaktive Kinase eine inhibitorische Wirkung	91
5.6	Kinaseinhibitionsmechanismen	93
5.7	Ausblick	98
6	Material	99
6.1	Bakterienstämme, Viren, Kulturmedien und –zusätze	99
6.2	Chemikalien	99
6.3	Chromatographie Material	102
6.4	Kitsysteme	102
6.5	Laborgeräte	103
6.6	Software und EDV	105
6.6.1	Datenerfassung	105
6.6.2	Molekularbiologische Standardanwendungen	106
6.7	Molekulargewichts- und Längenstandards	106
6.8	Nukleinsäuren	106
6.8.1	Plasmidvektoren	106
6.8.2	Oligonucleotide	106
6.9	Antikörper und Enzyme	108
6.9.1	Antikörper	108
6.9.2	DNA-modifizierende Enzyme und zugehörige Puffer	108
6.9.3	Restriktionsenzyme und zugehörige Puffer	108
6.9.4	Sonstige	109
6.10	Peptide	109
6.11	Puffer und Lösungen	109
6.12	Verbrauchsmaterial	113
7	Methoden	115
7.1	Molekularbiologische Methoden	115
7.1.1	Konstruktion der Transfervektoren pVL-IGFRKD Δ C und PAC-G2T-IGFRKD Δ C	115
7.1.2	Konstruktion der Transfervektoren PAC-G2T-IGFRKD Δ 72C- E1069K und PAC-G2T-IGFRKD Δ 72C-E1067/1069K	116
7.1.3	Konstruktion des E.coli-Expressionsvektor Pet21a(+)-NtHis-Tyrtide-TS-CtCys	116
7.1.4	Klonierung der Peptide in den E. Coli-Expressionsvektor Pet21a(+)-NtHis-Tyrtide-TS-CtCys	117
7.2	Phage Display	118
7.2.1	Selektionsschritte des Phage Display	118
7.2.2	Titerbestimmung von M13 Phagen	121
7.2.3	DNA-Extraktion aus Phagen Nach QIAprep® Spin M13 Kit	122

7.2.4	ELISA.....	123
7.3	Biochemische Methoden.....	125
7.3.1	Baculovirusexpressionssystem.....	125
7.3.2	Proteinexpression in E.coli.....	129
7.3.3	Herstellung von Solubilisaten nach Proteinexpression in E.coli.....	130
7.3.4	Chromatographische Methoden.....	131
7.3.5	Dialyse von Proteinen.....	137
7.3.6	Aufkonzentrierung von Proteinlösungen.....	137
7.3.7	Proteolytische Spaltungen.....	138
7.3.8	Analytische Modifikation von reaktiven Cysteinen mit Tetramethylrhodamin-5-maleimid	139
7.3.9	Präparative Modifikation von reaktiven Cysteinen mit Tetramethylrhodamin-5-maleimid	140
7.3.10	Charakterisierung von Proteinkonzentration und -Identität	140
7.3.11	Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Blot.....	142
7.3.12	Far Western	144
7.3.13	Färbung von Proteinen in Gelen und auf Membranen.....	145
7.3.14	Phosphorylierungsreaktionen.....	147
7.3.15	Bestimmung der Kinetischen Konstanten.....	149
7.3.16	Spektroskopische Methoden.....	150
8	Literaturverzeichnis.....	156
9	Anhang.....	166
9.1	Reinigung der GST-Kinasen	166
9.2	Reinigung der ungetagten, monomeren Kinase.....	167
9.3	Reinigung der His-Getagten Kinasen EGF-His	168
9.4	Reinigung der GST-TS-IGFAC-Y950F.....	168
9.5	Proteolytische Abtrennung von GST und Reinigung der monomeren Kinasen.....	169
9.6	Reinigung der Zielproteine GST-IGF-NT und GST-IR-NT.....	170
9.7	Reinigung des Substrats Tyrtide-His.....	170
9.8	Färbung der gespaltenen Peptide im Schägger-Gel mittels Fluorescamin.....	171
9.9	Chromatogramm der HPLC-Reinigung der chemisch generierten Peptide.....	171
9.10	Michaelis-Menten-Kurven der ATP-abhängigen Substrat-phosphorylierung der dimeren Kinasemutanten GST-IGFAC-E1069K und GST-IGFAC-E1067/1069K.....	172
9.11	Michaelis-Menten-Kurve der ATP-abhängigen Substrat-phosphorylierung der monomeren IGFAC.....	173
9.12	Auswertung einer radioaktiven Phosphorylierung über die SDS-PAGE am Beispiel der Tyrtide- Phosphorylierung der monomeren Kinase.....	173
9.13	Autophosphorylierung der dimeren GST-IGFAC in Anwesenheit der Peptide IGF-NT K1 und K3.....	174
9.14	Auswertung einer radioaktiven Phosphorylierung über den Paperassay am Beispiel der KM Bestimmung der monomeren Kinase.....	174
9.15	Substratphosphorylierung der monomeren TrkB-His, EGF-His und GST-Akt in Anwesenheit der Peptide IGF-NT K1 und K3.....	175
9.16	Einfluss der markierten, aus E.coli stammenden Peptide IGF-NT K1-Cys und IGF-NT K1-Cys auf die monomere IGFAC	176
9.17	Einfluss der unmarkierten Peptide α D-Peptid K2-Cys und α D-Peptid K-Cys auf die monomere IGFAC	176
9.18	Substratphosphorylierung der monomeren TrkB-His, EGF-His und GST-Akt in Anwesenheit der Peptide α D-Peptid K2 und K3.....	177
9.19	Michaelis-Menten-Kurve der ATP-abhängigen Substrat- phosphorylierung der monomeren IGFAC in Anwesenheit von α D-Peptid K2.....	178

9.20	Bestimmung des IC50 für α D-Peptid K2-Cys	178
9.21	Sequenzen der Generierten Kinasekonstrukte	179
9.22	Sequenz des modifizierten Pet-21a(+)-Expressionsvektors.....	180
9.23	Sequenzen der Fusionspeptide.....	181
9.24	Sequenzierungsdaten der isolierten Phagen-DNA des Phage Displays gegen GST-IR-NT.....	182
9.25	Sequenzierungsdaten der isolierten Phagen-DNA des Phage Displays gegen GST-IGF-NT.....	183
9.26	Sequenzierungsdaten der isolierten Phagen-DNA des Phage Displays gegen das α D-Peptid....	184

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: Schematischer Aufbau einer Kinasedomäne in aktiver, Substrat-gebundener Form.	6
Abbildung 3.2: cis-Inhibitions/trans-Aktivierungsmodell.	9
Abbildung 3.3: Mechanismen zur Regulation der CDK-Aktivität.	11
Abbildung 3.4: Regulation der Src kinase.	13
Abbildung 3.5: Die Autoinhibition der Juxtamembrandomäne der Insulinrezeptorkinase.	15
Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der Aktivierung des IR durch Insulinbindung.	16
Abbildung 3.7: Dimeren Kristallstrukturen der unphosphorylierten Kinasedomäne des IGF-1R.....	18
Abbildung 3.8: Bildung asymmetrischer Dimere als Aktivierungsprozess beim EGFR.....	19
Abbildung 3.9: Schematische Darstellung des Biopannings.....	26
Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des IGF-1R und der verwendeten Kinasekonstrukte.....	30
Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des Substrats Tyrtide.....	32
Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der Fusionspeptide.....	34
Abbildung 4.4: Dokumentation der Reinigung und Markierung im präparativen Maßstab von His-Tyrtide-TS-IGF-NT-K1-Cys.....	35
Abbildung 4.5: Generierung des Peptids IGF-NT-K1-Cys mittels Proteolyse.....	37
Abbildung 4.6: Native PAGE der Tyrtide-Phosphorylierung der dimeren Kinasen.....	39
Abbildung 4.7: Bestimmung der kinetischen Daten für die ATP-abhängige Substratphosphorylierung der dimeren Kinasen.....	40
Abbildung 4.8: Native PAGE der Autophosphorylierung der monomeren IGFAC.....	41
Abbildung 4.9: Bestimmung der kinetischen Daten für die Substratphosphorylierung der monomeren Kinase.....	43
Abbildung 4.10: Kreuzmutationsexperiment:	45
Abbildung 4.11: Auflistung der aus dem Phage Display gegen GST-IR-NT und GST-IGF-NT erhaltenen Peptidsequenzen.	48
Abbildung 4.12: ELISA zur Überprüfung der Bindungsspezifität von IGF-NT K1 und IGF-NT K3..	49
Abbildung 4.13: Auflistung der aus dem Phage Display gegen das Peptid aus α D-Helix/hinge region erhaltenen Peptidsequenzen.	50
Abbildung 4.14: ELISA zur Überprüfung der Bindungsspezifität von α D-Peptid K2 und α D-Peptid K3.....	51
Abbildung 4.15: Die Peptide inhibieren die Autophosphorylierung der monomeren Kinase.....	53
Abbildung 4.16: Die Peptide inhibieren die Substratphosphorylierung der monomeren Kinase.....	54
Abbildung 4.17: Die Aktivität der dimeren Kinase wird nicht durch die Peptide beeinflusst.....	55
Abbildung 4.18: Die PTB-Phosphorylierung der monomeren Kinase wird durch die Peptide inhibiert.	56
Abbildung 4.19: Die PTB-Phosphorylierung der dimeren Kinase wird durch die Peptide inhibiert. ...	57
Abbildung 4.20: Untersuchungen zur Spezifität der Peptide IGF-NT K1 und K3.	58
Abbildung 4.21: IGF-NT K3 inhibiert die Autoaktivierung der monomeren IGFAC.....	60
Abbildung 4.22: Die aktivierte, monomere IGFAC wird nicht von IGF-NT K3 inhibiert.....	61
Abbildung 4.23: IGF-NT K3 interferiert mit der Kinasedimerisierung.....	62
Abbildung 4.24: Bestimmung der kinetischen Daten für die Substratphosphorylierung der monomeren Kinase in Anwesenheit von IGF-NT K3.....	64
Abbildung 4.25: IC50 -Bestimmung.....	65
Abbildung 4.26: Far Western zum Nachweis der Bindung von IGF-NT K1 und K3 an die IGFAC....	66
Abbildung 4.27: α D-Peptid K2-Cys und α D-Peptid K3-Cys inhibieren die Auto- und Substratphosphorylierung der monomeren IGFAC.....	68
Abbildung 4.28: Untersuchungen zur Spezifität der Peptide IGF-NT K1 und K3.....	70
Abbildung 4.29: Die Aktivität der dimeren Kinase wird nicht durch α D-Peptid K2 beeinflusst.....	71
Abbildung 4.30: Die PTB-Phosphorylierung der dimeren Kinase wird nicht durch α D-Peptid K2	

beeinflusst.....	72
Abbildung 4.31: Die aktivierte, monomere IGFAC wird nicht von α D-Peptid K2 inhibiert.....	73
Abbildung 4.32: α D-Peptid K2-Cys inhibiert die Autoaktivierung der monomeren IGFAC.....	74
Abbildung 4.33: Der Dimerisierungsprozess wird nicht beeinträchtigt.....	75
Abbildung 4.34: Die Bindung von α D-Peptid K2-Cys fixiert die Kinase in ihrer inaktiven Konformation.....	77
Abbildung 4.35: Ermittlung der kinetischen Daten für die Substratphosphorylierung der monomeren Kinase in Anwesenheit von α D-Peptid K2-Cys.....	78
Abbildung 4.36: IC50 -Bestimmung für 3 μ M Kinase.....	79
Abbildung 4.37: Far Western zum Nachweis der Bindung von α D-Peptid K2-Cys und K3- an die IGFAC.....	80
Abbildung 5.1: Darstellung der aus dem Phage Display gegen die Juxtamembrandomäne (A) und der α D-Helix/hinge region (B) erhaltenen Sequenzen.	85
Abbildung 5.2: Alignment der Juxtamembransequenz des IGF-1R und IR.	90
Abbildung 5.3: Alignment der Sequenzen des Bereichs der α D-Helix/hinge region der Rezeptortyrosinkinasen IGF-1R, IR, TrkB-R, EGFR und der Ser/Thr-Kinase Akt.	91
Abbildung 5.4: Möglicher Aktivierungsmechanismus einer löslichen Kinasedomäne (1) und des IGF-1-Rezeptors (2).....	97
Abbildung 7.1: Michaelis-Menten Kurve.....	153
Abbildung 9.1: Reinigungsdokumentation der GST-getagten Kinase GST-IGFAC.....	166
Abbildung 9.2: Reinigungsdokumentation der ungetagten, monomeren IGFAC.....	167
Abbildung 9.3: Reinigungsdokumentation der EGF-His.....	168
Abbildung 9.4: Reinigungsdokumentation der GST-IGFAC-Y950F.....	168
Abbildung 9.5: Monomerisierung und Reinigung der IGFAC-Y950F.....	169
Abbildung 9.6: Monomerisierung und Reinigung der IRKD-D1120A-His.....	169
Abbildung 9.7: Reinigungsdokumentation des Zielproteins GST-IGF-NT.....	170
Abbildung 9.8: Reinigungsgel des Substrats Tyrtide-His.....	170
Abbildung 9.9: Generierung des Peptids α D-Peptid K2-Cys mittels Proteolyse.....	171
Abbildung 9.10: Chromatogramm der Reinigung des chemisch generierten Peptids IGF-NT K3 über Reversed-phase- High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC).....	171
Abbildung 9.11: Bestimmung der kinetischen Daten für die ATP-abhängige Substratphosphorylierung der dimeren Kinasemutanten GST-IGFAC-E1069K und GST-IGFAC-E1067/1069K.....	172
Abbildung 9.12: Bestimmung der kinetischen Daten für die ATP-abhängige Substrat-phosphorylierung der monomeren IGFAC.....	173
Abbildung 9.13: SDS-Gel zur Auswertung der radioaktiven Substratphosphorylierung der monomeren IGFAC.....	173
Abbildung 9.14: Die Aktivität der dimeren Kinase wird nicht durch die Peptide beeinflusst.....	174
Abbildung 9.15: Paperassay zur Bestimmung des KM für ATP der monomeren Kinase.....	174
Abbildung 9.16: Die Peptide üben keinen inhibitorischen Einfluss auf die TrkB-His, EGF-His und GST-Akt aus.....	175
Abbildung 9.17: Das Label Tetramethylrhodamin-5-maleimid hat keinen Einfluss auf die inhibitorische Wirkung der Peptide.....	176
Abbildung 9.18: Untersuchung des Einflusses des Labels Tetramethylrhodamin-5-maleimid auf die inhibitorische Wirkung der Peptide.....	176
Abbildung 9.19: Die Peptide üben keinen inhibitorischen Einfluss auf die TrkB-His, EGF-His und GST-Akt aus.....	177
Abbildung 9.20: Bestimmung der kinetischen Daten für die ATP-abhängige Substrat-phosphorylierung der monomeren IGFAC in Anwesenheit von α D-Peptid K2-Cys.....	178

Abbildung 9.21: IC50 -Bestimmung für 3 μ M Kinase.....	178
Abbildung 9.22: Aminosäuresequenz der GST-IGF Δ C.....	179
Abbildung 9.23: Aminosäuresequenz der GST-IGF Δ C-E1069K.....	179
Abbildung 9.24: Aminosäuresequenz der GST-IGF Δ C-E1067/1069K.....	180
Abbildung 9.25: Aminosäuresequenz der IGF Δ C.....	180
Abbildung 9.26: Teilsequenz des E.coli Expressionsvektors Pet21a(+)-NtHis-TS-Tyrtide-CtCys. ...	180
Abbildung 9.27: Aminosäuresequenz für das Fusionspeptid His-Tyrtide-TS-IGF-NT K1-Cys.....	181
Abbildung 9.28: Aminosäuresequenz für das Fusionspeptid His-Tyrtide-TS-IGF-NT K3-Cys.....	181
Abbildung 9.29: Aminosäuresequenz für das Fusionspeptid His-Tyrtide-TS-Kontrollpeptid-Cys.....	181
Abbildung 9.30: Aminosäuresequenz für das Fusionspeptid His-Tyrtide-TS- α D-Peptid-Cys.....	181
Abbildung 9.31: Aminosäuresequenz für das Fusionspeptid His-Tyrtide-TS- α D-Peptid K2-Cys.....	182
Abbildung 9.32: Aminosäuresequenz für das Fusionspeptid His-Tyrtide-TS- α D-Peptid K3-Cys.....	182
Abbildung 9.33: Sequenzierungsdaten für den Phagen Klon IR-NT K1.....	182
Abbildung 9.34: Sequenzierungsdaten für die Phagen Klone IR-NT K2-10.....	182
Abbildung 9.35: Sequenzierungsdaten für die Phagen Klone IGF-NT K 1; 2; 4-8; 10.....	183
Abbildung 9.36: Sequenzierungsdaten für den Phagen Klon IGF-NT K 3.....	183
Abbildung 9.37: Sequenzierungsdaten für den Phagen Klon IGF-NT K 3.....	183
Abbildung 9.38: Sequenzierungsdaten für die Phagen Klone α D-Peptid K 2; 4; 5; 7; 8; 10.....	184
Abbildung 9.39: Sequenzierungsdaten für die Phagen Klone α D-Peptid K 3 und 9.....	184
Abbildung 9.40: Sequenzierungsdaten für den Phagen Klone α D-Peptid K6.....	184

Tabellenverzeichnis

Tabelle 5.1: Vergleich der Michaelis-Menten-Parameter für ATP mit den Daten unserer Arbeitsgruppe für die IGF Δ N Δ C und GST-IGF Δ N Δ C 131.....	84
Tabelle 5.2: Literaturdaten für den IC50 Wert für die Tyrosinkinase des IGF-1R, EGFR, des Stammzellfaktor-Rezeptors (c-Kit), der Src related Proteinkinase Lyn und der Ser/Thr Kinase Akt und PKA 104,113,114,132,142.....	88
Tabelle 5.3: Vergleich der kinetischen Daten für die ATP-Abhängige Substratphosphorylierung der monomeren Kinase +/- Peptid.....	89
Tabelle 6.1: Auflistung der kommerziell bezogenen Peptide.....	109
Tabelle 7.1: Auflistung der Peptidsequenzen, die durch Expression im E. Coli-Expressionsvektor Pet21a(+)- NtHis-Tyrtide-TS-Ct-Cys generiert wurden.....	118
Tabelle 7.2: Anteil an Puffer B Im Lysat, beim Äquilibrieren der Säule und beim linearen Salzgradient bei der Anionen-Austausch-Chromatographie der verschiedenen Proteine.....	134
Tabelle 7.3: Gradient an Puffer B der Reversed-phase-HPLC der chemisch generierten Peptide.....	136
Tabelle 7.4: Absorptionswellenlängen biologischer Chromophore.....	151
Tabelle 7.5: Reaktionsbedingungen für den gekoppelten Assay.....	154

Abkürzungsverzeichnis

#	Nummer	EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)- N,N'-Tetraessigsäure
°C	Grad Celsius	EGFR	Epidermal growth factor Rezeptor et aliter
µCi	Mikrocurie	et al.	
µg	Mikrogramm	F	
µl	Mikroliter	F	Phenylalanin
µM	Mikromolar	FGFR	Fibroblast growth factor Rezeptor
A		FPLC	Fast performance Liquid Chromatography
A	Adenin		
A	Alanin		
Abb.	Abbildung		
AcNPV	Autographa californica Nuclear Polyhydrosis Virus		
ADP	Adenosindiphosphat	G	
Ala	Alanin	g	1. Erdbeschleunigung: 9,81ms ⁻² 2. Gramm
APS	Ammoniumpersulfat	G	1. Guanin 2. Glycin
Arg	Arginin	Gln	Glutamin
AS	Aminosäure	Glu	Glutamat
Asn	Asparagin	Gly	Glycin
Asp	Aspartat	GST	Glutathion-S-Transferase
ATP	Adenosintriphosphat		
B		H	
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat	h	Stunde
BSA	Rinderserumalbumin	H	Histidin
bzw.	beziehungsweise	hIR	humaner Insulinrezeptor
C		His	Histidin
C	Cystein	HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
ca.	Circa		
cDNA	DNA-Kopie der mRNA	I	
Ci	Curie	I	Isoleucin
cpm	counts per minute, Zählimpuls pro Minute	Ig	Immunglobulin
CT	C-terminale Domäne	IGF	Insulin-like growth factor
Cys	Cystein	IGFAC	C-terminal verkürzte Kinasedomäne des IGF-1R
D		IGF-1R	Insulin-like growth factor-1 Rezeptor
D	Aspartat	IGFKD	lösliche Kinasedomäne des IGF-1R
Da, kDa	Dalton, Kilodalton	Ile	Isoleucin
d.h.	das heißt	IR	Insulinrezeptor
DMSO	Dimethylsulfoxid	IRΔC	C-terminal verkürzte Kinasedomäne des IR
DNA	Desoxiribonucleinsäure	IRKD	lösliche Kinasedomäne des IR
DTT	Dithiothreitol	IRR	Insulin related receptor
E		IRS-1	Insulinrezeptor-Substrat-1
E	Glutamat	J	
E.coli	Escherichia coli	JM	Juxtamembrandomäne
EGF	Epidermal growth factor receptor		
ELISA	Enzym Linked Imunosorbent Assay	K	
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	K	Lysin
		Kap.	Kapitel

VERZEICHNISSE

KD	Tyrosinkinase-Domäne	S	
L		S	Serin
L	Leucin	S.	Seite
Leu	Leucin	s.	siehe
Lys	Lysin	SDS	Natriumdodecylsulfat
		sec	Sekunde
		Ser	Serin
		Sf9	Spodoptera frugiperda
M		Shc	src homologous collagen-like protein
M	Methionin	sog.	sogenannt
M	mol/l	spez.	spezifisch
mA	Milliampere		
max.	maximal	T	
Met	Methionin	T	Threonin
min	Minute	Tab.	Tabelle
mind.	mindestens	TBS	Tris Buffered Saline
ml	Milliliter	TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin
mm	Millimeter	Thr	Threonin
mM	Millimolar	TM	Transmembran-Domäne
MQ	Millipore Wasser	Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
		Trk	nerve growth factor receptor
N		Trp	Tryptophan
N	Asparagin	Tyr	Tyrosin
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid		
NGFR	nerve growth factor receptor		
		U	
O		U	Uracil
OD	optische Dichte	u.a.	unter anderem
		UE	Untereinheit
P		UV	Ultraviolett
P	Prolin		
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	V	
PBS	phosphate buffered saline	V	Valin
PDGFR	Platelet-derived growth factor Rezeptor	V	Volt
		v/v	volume/volume, ml Volumen in 100ml Gesamtvolumen
pH	potentium hydrogenii	Val	Valin
Phe	Phenylalanin	vgl.	vergleiche
Pi	anorganisches Phosphat		
p.i.	post infection	W	
pmol	picomol	W	Tryptophan
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	W	Watt
Pro	Prolin	w/v	weight/volume, g Substanz in 100 ml Gesamtvolumen
pS	Phosphoserin	Wt	Wildtyp
pT	Phosphothreonin		
PTB	Phosphotyrosin-bindende Domäne		
PVDF	Polyvinylidendifluorid	X	
pY	Phosphotyrosin	X	beliebige Aminosäure
Q			
Q	Glutamin	Y	
		Y	Tyrosin
R			
R	Arginin	Z	
rpm	revolutions per minute	z.B.	zum Beispiel
RT	Raumtemperatur		
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase		

1 Zusammenfassung

Der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor-1 Rezeptor (IGF-1R) und der Insulinrezeptor (IR) sind Mitglieder der transmembranständigen Rezeptortyrosinkinasen, die zur Überfamilie der Wachstumsfaktorrezeptoren gehören. IGF-1R ist verantwortlich für die Entwicklung, normales Wachstum und Differenzierung der Zelle aber auch die Unterdrückung der Apoptose. Die Fähigkeit des Rezeptors, gleichzeitig proliferative und anti-apoptotische Signale zu initiieren, macht ihn zu einem möglichen Target für die Entwicklung von Inhibitoren als Krebs-Therapeutika. Die gängigen Kinaseinhibitoren sind niedermolekulare, ATP-kompetitive Inhibitoren. Da die ATP-Bindestelle unter Kinasen hoch konserviert ist, weisen solche Inhibitoren meist geringe Spezifität auf, was zu starken Nebenwirkungen führen kann. Besonders beim IGF-1R ist eine spezifische Inhibition essentiell. Eine gleichzeitige Hemmung des nah verwandten IR kann fatale Konsequenzen haben, wie zum Beispiel die Ausbildung eines diabetischen Phänotyps. Um dies zu umgehen, war es das Ziel dieser Arbeit, einen spezifischen, peptidischen Inhibitor für die Kinase des IGF-1R zu entwickeln. Nach übereinstimmender Meinung werden Rezeptortyrosinkinasen über Dimerisierung aktiviert. Daher basierte mein Ansatz zur Inhibition des IGF-1R auf der Unterbindung der Dimerisierung über Konkurrenz mit sequenzspezifischen Peptiden. Realisiert wurde dieses Konzept an zwei Bereichen des IGF-1R: Einmal der Juxtamembranbereich, in dem neben einer autoregulatorischen Region auch eine Dimerisierungsdomäne lokalisiert ist. Zudem unterscheiden sich IR und IGF-1R in dieser Region deutlich in ihrer Sequenz. Zum anderen die α D-Helix/*hinge region*, die maßgeblich den Konformationsübergang zwischen inaktiver und aktiver Kinasestruktur bestimmt und an der Dimerisierung der Kinase und der Substraterkennung beteiligt ist. Mittels *Phage Display* wurden aus einer nahezu unbeschränkten Anzahl an verschiedenen Peptiden mit randomisierter Sequenz diejenigen selektiert, die spezifisch an die entsprechenden Bereiche, Juxtamembranbereich und α D-Helix/*hinge region*, banden. Um die aus dem *Phage Display* erhaltenen Peptidsequenzen zu generieren wurde eine Technik entwickelt, kleine Peptide in *E.coli* im großen Maßstab zu exprimieren und über Affinitätschromatographie zu reinigen.

Die Validierung der gefundenen Sequenzen gegen die Juxtamembrandomäne lieferte eine Peptidsequenz, die im μ M Bereich fähig ist, die IGF-Kinase zu inhibieren:

- Die Substrat- und Autophosphorylierung der monomeren IGF-Kinase wird signifikant von dem Peptid gehemmt.

- Die inhibitorische Wirkung des Peptids ist sehr spezifisch für die Kinase des IGF-1R. Selbst die Kinase des nah verwandten IR wird von dem Peptid nicht gehemmt.
- Die Inhibition folgt einem nicht-ATP-kompetitiven Mechanismus.
- Die Aktivität der dimeren Kinase wird nicht beeinflusst. Das Peptid bindet gezielt die inaktive Kinase und verhindert den Dimerisierungsprozess.
- Zusätzlich entkoppelt das Peptid die Interaktion der Kinase mit der Phosphotyrosin-bindenden Domäne (PTB) des Insulinrezeptorsubstrat-1 (IRS-1) und stellt somit einen Inhibitor der Signalweiterleitung dar. Diese Inhibition ist unabhängig von der Kinasestruktur.

Das *Phage Display* gegen das Peptid aus der α D-Helix/*hinge region* des IGF-1R lieferte eine Peptidsequenz, deren inhibitorische Wirkung deutlich stärker war als die des Peptids gegen die Juxtamembranregion:

- Das Peptid hemmt gezielt die monomere Kinase des IGF-1R; auf die dimere Kinase hat es keinen Einfluss.
- Durch die Bindung des Peptids an die *hinge region* wird die Kinase in ihrer autoinhibierten Konformation fixiert.
- Das Peptid inhibiert spezifisch nur die Mitglieder der Insulinrezeptorfamilie. Es bindet aber deutlich stärker an die Kinase des IGF-1R als an die IR-Kinase.
- Das Peptid inhibiert nicht-ATP kompetitiv.

Somit konnten in dieser Arbeit zwei Peptidinhibitoren generiert werden, die an zwei unterschiedliche regulatorische Bereiche der inaktiven Kinasestruktur binden und den Aktivierungsprozess der Kinase hemmen. Zusätzlich inhibiert eines der Peptide die Signalweiterleitung der Kinasen unabhängig von ihrer Struktur.

2 Abstract

Both, the insulin-like growth factor receptor (IGF-1R) and the insulin receptor (IR) are members of the transmembrane receptor kinases, which belong to the family of growth factor receptors. IGF-1R is responsible for development, normal growth, and differentiation of cells, but also for suppression of apoptosis. The ability of the receptor to simultaneously initiate proliferation and anti-apoptotic signals indicates, that IGF-1R might be an interesting target for drug development. Generally, common kinase inhibitors are small molecule inhibitors which show competitive inhibition with respect to ATP. As the ATP site is highly conserved across kinases those inhibitors might lead to undesirable side effects. Especially in the case of IGF-1R a selective inhibition is essential as a simultaneous inhibition of the closely related IR might lead to severe consequences e.g. the formation of a diabetic phenotype. To avoid those effects, the aim of this PhD was to develop a specific peptide inhibitor for the IGF-1R kinase. According to the common opinion, dimerisation is necessary for the activation of a receptor kinase. Therefore, my approach was based on preventing dimerisation by competition with sequence-specific peptides. This concept was to be realized for two regions of the IGF-1R and IR: One target was the juxtamembrane region which is supposed to have an auto regulatory function as well as a role in the dimerisation process of the kinase. In addition, IR and IGF-1R display significant sequential differences in this region. As other target the α D-Helix/*hinge region* which is crucial for the transition of the inactive to the active conformation was chosen. To find a specific peptide ligand for both targets, a library of peptides with randomized amino acid sequences was screened by *phage display*.

To generate the peptide sequence a technique was developed to express small peptides in high scales and purify them by affinity chromatography.

Validation of the sequences derived from the *phage display* against the juxtamembrane region led to a peptide sequence which is able to inhibit the IGF-1R kinase in a μ M range:

- Substrate- and autophosphorylation of the monomeric IGF-1-R kinase is significantly inhibited by the peptide.
- The inhibitory effect of the sequence is highly specific for the IGF-1 kinase. Even the closely related IR kinase is not affected by the peptide.
- Inhibition follows a non competitive mechanism with respect to ATP.

- The activity of the dimeric kinase is not impaired. The peptide binds selective to the inactive kinase and impairs dimerisation.
- Additionally, the inhibitory peptide degenerates the interaction of the phosphotyrosin binding domain (PTB) of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) with the kinase. Hence the peptide acts as a inhibitor of signal transduction. This inhibition is independent of the kinase conformation.

Phage display against a peptide composed of the α D-helix/hinge region of IGF-1R provided a peptide sequence which inhibitory effect was significantly stronger compared to the effect of the peptide against the juxtamembrane region:

- This peptide inhibits specific the inactive monomeric kinase of IGF-1R while the activity of the dimeric kinase is not impaired.
- Binding of the inhibitory peptide to the hinge region leads to a fixation of the kinase in an autoinhibited conformation.
- The inhibitory effect is specific for members of the insulin receptor family. However binding of the peptide to the IGF-1R kinase is much more stronger as the binding to the kinase of the IR.
- Inhibition follows a non competitive mechanism with respect to ATP.

Thus two peptide inhibitors could be generated, which bind to different regulatory regions of the unactivated kinase structure and inhibit the activation process. Additionally one peptide inhibits the signaltransduction independently of the kinase structure.

3 Einleitung

3.1 Allgemeine Einleitung

Die Proteinphosphorylierung ist die häufigste post-translationale Modifikation und der grundlegende Mechanismus zur reversiblen Regulation von Proteinaktivität und Funktion. Sie spielt eine Schlüsselrolle bei eukariotischen Prozessen wie Wachstumskontrolle, Zellzykluskontrolle, Differenzierung, Zellform und Bewegung, Gentranskription und Metabolismus. Die Übertragung eines Phosphorylrestes auf Proteine wird durch Proteinkinasen katalysiert, Enzyme, die zu der Klasse der Transferasen gehören. Als Phosphatdonor wird in den meisten Fällen ATP genutzt, dessen γ -Phosphat auf die Hydroxylgruppe eines Serin-, Threonin- oder Tyrosinrest des Zielproteins übertragen wird. Mehr als ein Drittel aller Proteine einer Säugerzelle können durch Phosphorylierung modifiziert werden. Die Bedeutung der Phosphorylierung spiegelt sich außerdem in der Tatsache wider, dass Proteinkinasen ca. 2 % des Genoms ausmachen¹. Proteinkinasen können an Hand ihrer Spezifität in Serin/Threoninkinasen bzw. Tyrosinkinasen unterteilt werden, je nachdem, welcher Rest den Phosphatakzeptor darstellt. Tyrosinkinasen können in zwei Klassen eingeteilt werden: Zytosolische Tyrosinkinasen sind nicht in der Membran verankert, können aber auch an der Membran assoziiert vorliegen. Einige zytoplasmatische Kinasen liegen auch am Zellkern assoziiert vor. Mitglieder der Src, Jak und Fak Familie sind direkt in die Transmembran-Weiterleitung von Signalen involviert. Sie binden an Transmembranrezeptoren, denen eine katalytische Domäne fehlt, und agieren als deren katalytische Untereinheit. Die andere Hauptklasse bilden die Rezeptortyrosinkinasen (RTK). Dies sind alle Typ I membrandurchspannende Proteine mit einer N-terminalen, extrazellulären Ligandenbindungsstelle. Viele der Rezeptortyrosinkinasen sind Wachstumsfaktorrezeptoren. Sie spielen eine wichtige Rolle bei zellulären Prozessen wie Wachstum, Entwicklung Differenzierung und Metabolismus.

3.2 Rezeptortyrosinkinasen

Prominente Mitglieder der Familie der RTKs sind der *insulin receptor* (IR), der *insulin-like growth factor-1 receptor* (IGF-1R), der *insulin related receptor* (IRR) der *epidermal growth factor receptor* (EGFR), der *plated-derived growth factor receptor* (PDGFR) und der *nerve*

growth factor receptor (NGFR/ Trk) ^{2,3}. Diese Rezeptoren sind sich in ihrer Struktur sehr ähnlich ⁴. Der Wachstumsfaktor bindet an die Hormonbindedomäne im extrazellulären Bereich, deren Unterschiede im Aufbau die Spezifität gegenüber dem Liganden garantieren. Der extrazelluläre Teil des Rezeptors wird über einen helicalen, transmembranen Bereich mit dem intrazellulären Teil verbunden. Der zytoplasmatische Bereich wird in eine Juxtamembran-, eine C-terminale und eine hoch konservierte Kinasedomäne unterteilt. Die Spezifität für signalweiterleitende Proteine wird durch Unterschiede in der Juxtamembran- und C-terminalen Domäne garantiert. Die meisten RTKs bestehen aus einer einzelnen Polypeptidkette und liegen in der Abwesenheit von Ligand in monomerer Form in der Zellmembran vor (z.B. EGFR). Nur die Mitglieder der IR-Familie (IR, IGF-1R und IRR) existieren dagegen bereits als kovalente Dimere. Kristallstrukturen von Proteinkinasen zeigen, dass die katalytischen Domänen gleich aufgebaut sind, unabhängig davon, ob es sich um eine Serin-/Threonin- oder Tyrosinkinase handelt ⁵. In Abbildung 3.2.1 ist stellvertretend die Topologie der Kinasedomäne der PKA dargestellt ⁶.

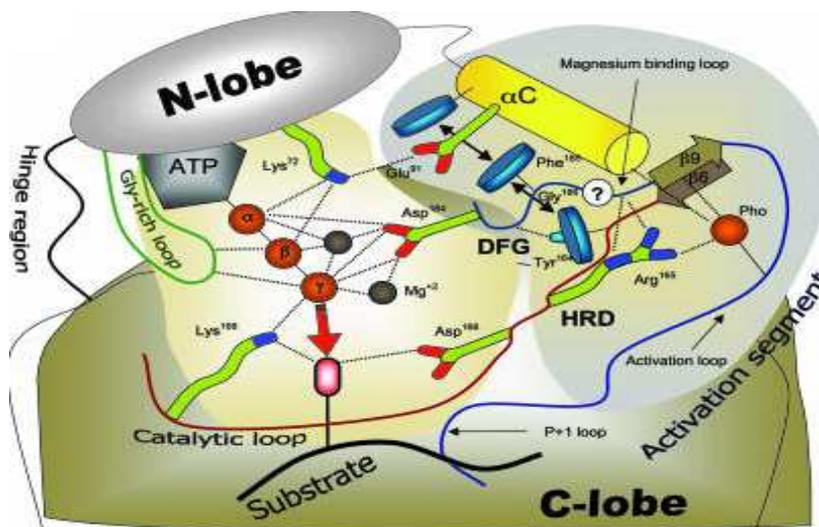


Abbildung 3.2.1: Schematischer Aufbau einer Kinasedomäne in aktiver, Substrat-gebundener Form.

Der katalytische Transfer des γ -Phosphats des ATP auf ein Proteinsubstrat wird durch den roten Pfeil angedeutet. Alle wichtigen bei der Katalyse beteiligten Reste, die entweder mit dem ATP oder dem Substrat interagieren, sind in gelber Farbe hinterlegt. Sekundärstrukturen, die an der Regulation der katalytischen Aktivität der Kinase beteiligt sind, wurden in grauer Farbe hinterlegt. Die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen HRD-Motiv, DFG-Motiv und der α C-Helix, sind als schwarze Pfeile dargestellt. Gestrichelte Linien zeigen wichtige polare Kontakte. Abbildung aus Kornev *et al* ⁶. Nummerierungen der Aminosäuren nach der PKA.

Die Kinasedomäne besteht aus zwei Regionen: Der N-terminale Lappen (*N-lobe*) ist neben der α C-Helix überwiegend aus β -Faltblättern aufgebaut. Der größere, C-terminale Lappen (*C-lobe*) besteht hingegen überwiegend aus α -Helices. Diese beiden Bereiche werden über die Schanierregion (*hinge region*) miteinander verbunden. Die *hinge region* bestimmt maßgeblich die Konformationsänderung zwischen inaktiver und aktiver Kinasekonformation und wirkt wie ein Gelenk zwischen den beiden Kinasebereichen. In der katalytischen Spalte (*catalytic cleft*) zwischen N-terminalen und C-terminalen Bereich ist das aktive Zentrum der Kinase lokalisiert. Dort wird vom N-terminalen Bereich eine hydrophobe Tasche gebildet, in dem der Adeninring des ATPs gebunden wird. Die Glycin-reiche Schleife (*Glycin-rich loop*) der N-terminalen Region mit der konservierten Sequenz GXGXXG ragt ins aktive Zentrum hinein und ist ebenfalls an der Nucleotidbindung beteiligt. Ein invariantes Lysin (PKA: Lys 72) im VAIK-Motiv koordiniert die α - und β -Phosphorylgruppe des ATP und geht gleichzeitig eine Salzbrücke mit einem hoch konservierten Glutamat (Glu 91) der α -C-Helix ein, was eine optimale Ausrichtung des γ -Phosphorylrestes zur Katalyse gewährleistet⁷. Die Ausbildung dieser Salzbrücke ist notwendig für die Katalyse. Die C-terminale Region beinhaltet die katalytische Schleife (*katalytic loop*) mit der katalytischen Base Aspartat (Asp 166) im HRD-Motiv. Dieser für die Katalyse essentielle Rest ist für die Koordination des Kofaktors Mg^{2+} zuständig. Zusätzlich wird die Hydroxylgruppe des Substrats für den Transfer ausgerichtet. Auf das HRD-Motiv folgt die Substraterkennungssequenz (K/L)AARN, die bei Ser/Thr Kinasen durch ein Lys und bei Tyrosinkinasen durch ein Leu eingeleitet wird. Das hoch konservierte DFG-Motiv kennzeichnet den Beginn der Aktivierungsschleife (*activation loop*). Dieses Motiv fungiert als Metallchelator, wobei das Aspartat (Asp 184) direkte Wechselwirkungen mit den drei Phosphatresten und dem Kofaktor Mg^{2+} eingeht. Mutationen der hoch konservierten Reste können zur verminderten katalytischen Aktivität bzw. zur Inaktivität der Kinase führen. Für die Substitution des invarianten Lysins ist eine starke Abnahme der katalytischen Aktivität durch eine Strukturveränderung im aktiven Zentrum bekannt⁸. Ein Austausch der katalytischen Base führt zur Inaktivierung der Kinase. In der Aktivierungsschleife befinden sich außerdem phosphorylierbare Tyrosinreste, die bei vielen RTKs eine wichtige Rolle im Aktivierungsprozess spielen. Im Falle des IGF-1R sind drei Autophosphorylierungsstellen in der Aktivierungsschleife vorhanden (Tyr 1131, Tyr 1135, Tyr 1136). Nur durch Phosphorylierung dieser drei Reste erlangt der Rezeptor seine vollständige

Aktivität⁹. Im Gegensatz dazu benötigt der EGFR, der nur über eine Tyrosinphosphorylierungsstelle in der Aktivierungsschleife verfügt, die Phosphorylierung dieses Restes nicht zur Erlangung vollständiger Aktivität^{10,11}.

3.3 Kinase-regulation

Im Grundzustand sind Proteinkinasen in der Regel inaktiv und erlangen ihre vollständige Aktivität oftmals nur durch einen kontrollierten, mehrstufigen Prozess. Die Kontrolle dieser Prozesse reicht von der Bindung allosterischer Effektoren bis zur Änderung der subzellulären Lokalisation des Enzyms. Proteinkinasen können als molekulare Schalter gesehen werden, die mindestens zwei extreme Konformationen einnehmen können, den „An“-Zustand mit maximaler Aktivität und den „Aus“-Zustand mit minimaler Aktivität. Da Proteinkinasen die gleiche Reaktion katalysieren, nehmen sie alle eine ähnliche Konformation im „An“-Zustand ein^{12,13}. Aus diesem Grund ist eine spezifische Regulation einer Kinase nur im inaktiven Grundzustand möglich. So haben sich bei den unterschiedlichen Kinasen einzigartige Mechanismen zur Aufrechterhaltung des inaktiven Zustandes entwickelt. Häufig beteiligte strukturelle Elemente sind die N-terminale Region mit der hoch konservierten α C-Helix, sowie die sehr flexible Aktivierungsschleife. Für die Regulation der Aktivität von Proteinkinasen im Detail werden in der Literatur verschiedene Modelle diskutiert, die im Folgenden erklärt werden sollen.

3.3.1 *Cis*-Inhibitions/*trans*-Aktivierungsmodell

Um die molekularen Mechanismen der Kinase-regulation untersuchen zu können, wird sich der löslichen, monomeren Kinasedomänen des IGF-1R (IGFKD) und des IR (IRKD) als etablierte Modelle bedient¹⁴⁻¹⁶. Zum einen können diese Kinasen gentechnisch leichter generiert werden als der Holorezeptor. Zum andern liegen die Röntgenstrukturen der unaktivierten (0P) Rezeptorkinasen IGFKD-0P und IRKD-0P, sowie deren partiell (2P) bzw. voll aktivierte (3P) Vertreter vor¹⁷⁻²². Aus den Strukturdaten postulierten Hubbard, Schlessinger und Kollegen für die Rezeptorkinase des IR ein „*cis*-Inhibitions-/*trans*-Aktivierungsmodell“, das erklären soll, wie die Kinase latent gehalten wird und somit eine Liganden-unabhängige Autophosphorylierung verhindert wird¹⁷. Dieses Modell ist auch auf den IGF-1R übertragbar⁹. Hierbei unterliegt die Aktivierungsschleife einer Autoinhibition. Die Röntgenstrukturdaten (Abb. 3.3.1) zeigen, dass die Autophosphorylierungsstelle Tyr 1150

(Nummerierung der Reste nach dem IR) in der Aktivierungsschleife so angeordnet ist, als ob es in *cis* autophosphoryliert würde. Die Hydroxylgruppe des Phenylrings interagiert mit der katalytischen Base Asp 1120 und Arg1124 über Wasserstoffbrücken.

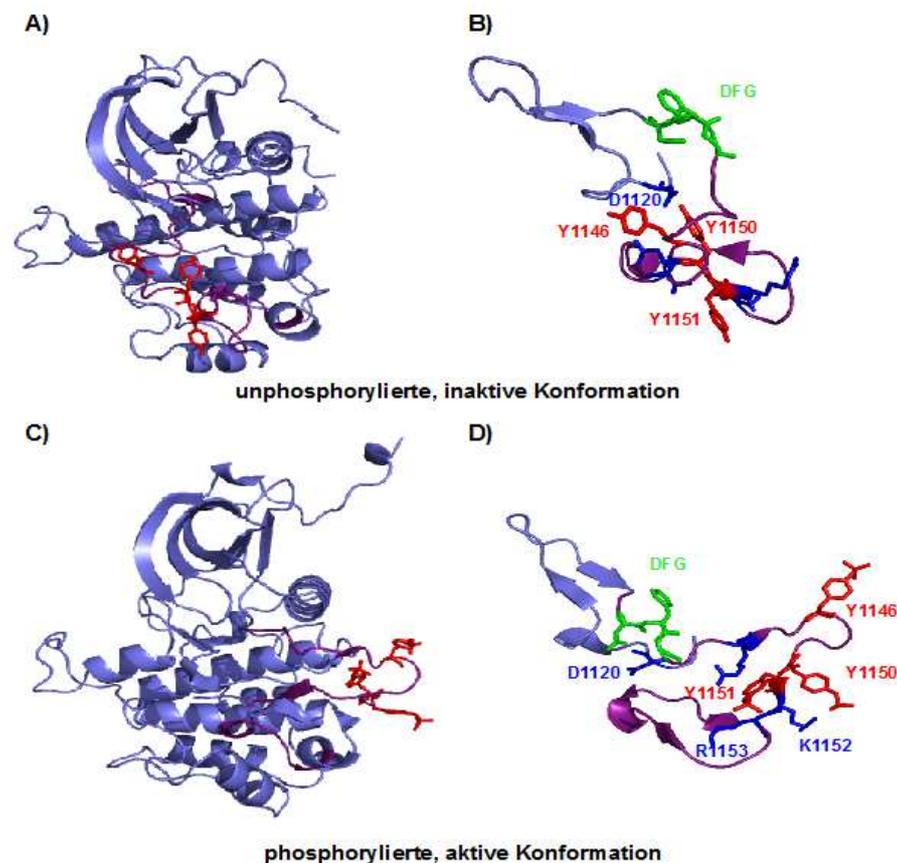


Abbildung 3.3.1: cis-Inhibitions/trans-Aktivierungsmodell.

Vergleich der Konformation der unphosphorylierten (A) und *tris*-phosphorylierten IRKD (C). Die Aktivierungsschleife ist violett und ihre Autophosphorylierungsstellen in rot dargestellt. In B (unphosphorylierte Kinase) und D (phosphorylierte Kinase) sind die katalytische und Aktivierungsschleife vergrößert dargestellt. In grün sind die Reste des DFG-Motivs, in rot die Autophosphorylierungsstellen und in blau basische Reste markiert. Wichtige Reste sind hervorgehoben. Kristallstrukturen modifiziert nach Veröffentlichungen von Hubbard^{17,19}.

Eine Phosphorylierung von Tyr1150 in *cis* ist den Röntgenstrukturdaten nach nicht möglich, da Asp1138 des DFG Motivs nicht in der richtigen Orientierung liegt um Mg^{2+} und ATP für die Katalyse zu koordinieren. Des Weiteren wird der Zugang zur Aktivierungsschleife für ATP und Substrat versperrt. Eine *trans* Autophosphorylierung durch die andere

Rezeptoruntereinheit ist auf Grund der Anordnung der zytoplasmatischen Domänen nicht möglich. Die autoinhibitorische Funktion von Tyr1150 wird durch einen Austausch dieses Restes gegen Phenylalanin bestätigt. Die erhaltene Mutante zeigt eine erhöhte Basalaktivität²³. Nach dem *Cis*-Inhibitions/*trans*-Aktivierungsmodell schließen sich in der unphosphorylierten Form des IR die Bindung von Tyr1150 und ATP in der Aktivierungsschleife gegenseitig aus. In Lösung existiert jedoch ein Gleichgewicht zwischen der autoinhibierten Form und einer nicht inhibierten Form in der ATP und Substrat freien Zugang zur Aktivierungsschleife haben. In der unphosphorylierten Kinase liegt das Gleichgewicht auf Seiten der autoinhibierten Form. Hormonbindung führt zur Konformationsänderung der zytoplasmatischen Domänen, eine *trans*-Phosphorylierung der nicht inhibierten Form der Aktivierungsschleife ist möglich. Das Gleichgewicht wird auf Seiten der nicht inhibierten Form der Aktivierungsschleife verschoben. Das Ergebnis ist ein signifikanter Anstieg der Kinaseaktivität.

Dieses, in der Literatur dominante Modell für die Aktivierung der Tyrosinkinase des IR und IGF-1R ist nicht frei von Widersprüchen. Die Schlussfolgerungen werden allein durch den Vergleich der unphosphorylierten mit der voll-phosphorylierten monomeren Kinasedomäne aufgestellt. Eventuelle Zwischenstufen werden außer Acht gelassen. Der Aspekt der Dimerisierung, die *in vivo* gegeben ist, dient bei dem vorgeschlagenem Modell lediglich der *trans* Autophosphorylierung. Die Autoinhibition kann jedoch überwunden werden, wenn die monomere Kinase in der Autophosphorylierungsreaktion in hohen Konzentrationen (~10 µM) eingesetzt wird, die kritische Kinasekonzentration also ansteigt²⁴. Dieser Effekt wird in dem Modell nicht berücksichtigt. Der *epidermal growth factor receptor* (EGFR) benötigt keine Phosphorylierung in der Aktivierungsschleife, um aktiv zu sein¹¹.

3.3.2 Regulation über Protein-Protein-Wechselwirkung: Die α C-Helix als Indikator der aktiven Konformation

Außer in der Aktivierungsschleife lassen sich weitreichende Änderungen der α C-Helix (α C) zwischen inaktiver und aktiver Kinase beobachten. Die α C ist die einzig konservierte Helix in der β -Faltblatt-reichen, N-terminalen Domäne und der wichtigste Indikator für konformationelle Änderungen im aktiven Zentrum. Insbesondere die Ausbildung der Salzbrücke zwischen dem konservierten Glutamat der α C und dem konservierten Lysin aus β 7 ist ein Indikator für die aktive Konformation aller Kinasen. Das Lysin koordiniert die α - und β -Phosphate des ATP so dass eine produktive Bindung des Phosphoryldonors erreicht wird².

Über die Salzbrücke zum Glutamat wird die optimale Ausrichtung des Lysins gewährleistet. Somit ist die Ausbildung dieser Salzbrücke essentiell für die Katalyse.

3.3.2.1 Regulation der Cyclin-abhängigen Kinase

Die Cyclin-abhängige Kinasefamilie (CDK) ist das klarste und am besten verstandene Beispiel für die allosterische Regulation der katalytischen Aktivität mittels der α C. Die CDKs sind Serin/Threonin Kinasen und spielen eine zentrale Rolle bei der Koordination des Zellzyklus²⁵. Gesteuert werden die CDKs durch verschiedene Wachstums-regulierende Signale und unterliegen einer strengen Regulation durch diverse Prozesse (Abb. 3.3.2)²⁶. Im unligandierten Zustand liegt die Kinase in einer inaktiven Konformation vor. Die α C-Helix ist so positioniert, dass die Ausbildung der essentiellen Salzbrücke nicht möglich ist. Zusätzlich versperrt der *T-loop* den Zugang zur katalytischen Spalte (Abb. 3.3.2.A). Der Aktivierungsprozess der CDKs verläuft in zwei Stufen. Der erste Schritt ist die

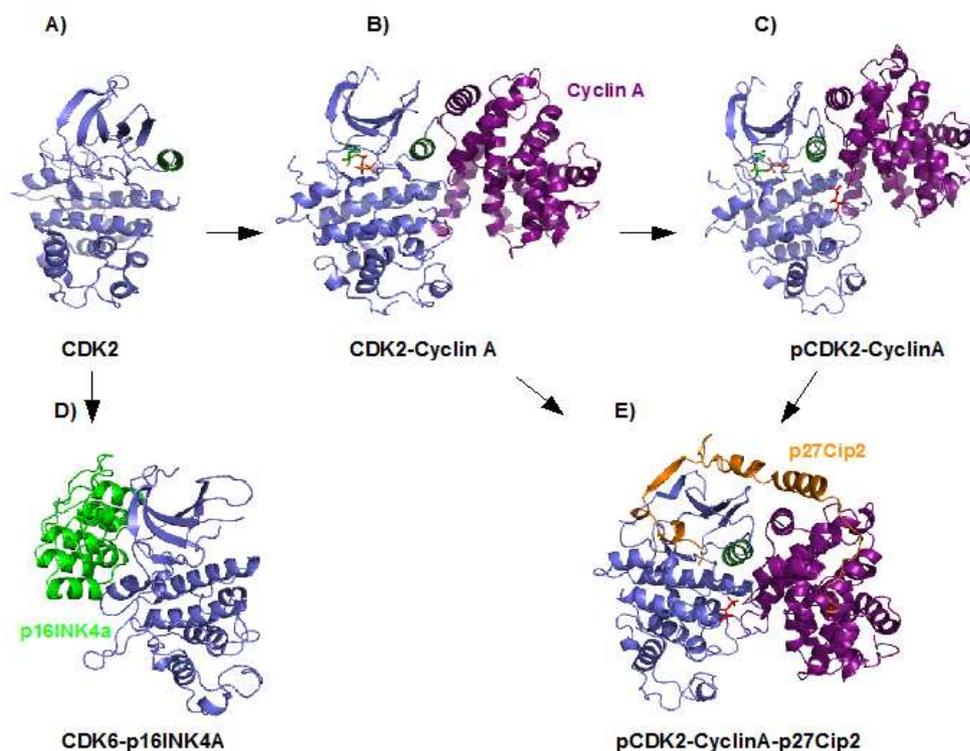


Abbildung 3.3.2: Mechanismen zur Regulation der CDK-Aktivität.

Es sind folgende Strukturen abgebildet: **A**: Monomere, unphosphorylierte, inaktive CDK2; **B**: Partiiell aktiver Komplex aus Cyclin und CDK2; **C**: Voll aktivierter, phosphorylierter Komplex aus CDK2 und Cyclin; **D**: Nicht aktivierbarer Komplex aus CDK6 und p16INK4a; **E**: Inhibierter Komplex aus phosphoryliertem CDK2-Cyclin und p27Cip2. Die α C-Helix der CDK2 ist grün und der phosphorylierte Threoninrest ist rot markiert. Abbildung modifiziert nach Pavletich²⁶.

Cyclinbindung an die Kinase, die dadurch zu einer Konformationsänderung gezwungen wird. Dieser als Hetero-Dimerisierung bezeichnete Schritt verleiht der Kinase nur partielle Aktivität. Cyclin bindet an einer Seite der katalytischen Spalte und interagiert mit der α C, so dass diese in die katalytische Spalte bewegt wird. Die essentielle Salzbrücke kann ausgebildet werden. Cyclin interagiert außerdem mit dem *T-loop*, der dadurch von der katalytischen Spalte wegbewegt wird. ATP und Substrate haben nun freien Zugang (Abb. 3.3.2.B). Der zweite Schritt ist die Phosphorylierung des CDK-Cyclin-Komplex durch die *CDK-activating kinase* (CAK). Die Phosphorylierung des Threonins im *T-loop* resultiert in einer weiteren Konformationsänderung (Abb. 3.3.2.C). Durch beide Schritte wird die Kinaseaktivität um das 100 fache erhöht²⁷. Auch die Inhibition der CDK verläuft über Protein-Protein-Wechselwirkung. Die voll aktivierte CDK kann über die Bindung von Inhibitoren der Cip Familie vollkommen inaktiviert werden. Die Bindung von p27^{Cip2} an den phosphorylierten CDK-Cyclin Komplex verändert die Form der katalytischen Spalte, so dass die für die Katalyse essentiellen Elemente verloren gehen^{28,29}. Zusätzlich fungiert er als ATP-Mimiker (Abb. 3.3.2.E). Die INK4 Inhibitoren binden an die inaktive Kinase bzw. an das Heterodimer aus CDK und Cyclin. Der Inhibitor bindet direkt neben der katalytischen Spalte, gegenüber der Stelle, an die Cyclin bindet und interagiert mit N- und *C-lobe* (Abb. 3.3.2.D). Die Bindung von INK4 übt eine Konformationsänderung in der Cyclinbindestelle aus und blockiert dadurch die Cyclinbindung. Zusätzlich wird die der INK4-Bindestelle benachbarte ATP-Bindestelle deformiert, so dass die Affinität zu ATP herabgesetzt wird³⁰.

3.3.2.2 Regulation der Src Kinase

Ein weiteres Struktur-belegtes Beispiel für die Regulation über Konformationsänderungen ist die Protein Tyrosinkinase Src. Nach Aktivierung spielen Src Kinasen (Src) eine Schlüsselrolle in der Kontrolle der Zellproliferation und Differenzierung. Daher muss ihre katalytische Aktivität streng kontrolliert werden. Der modulare Aufbau der Src besteht aus einem myristoylierten N-Terminus, gefolgt von einer nicht-konservierten Region, einer Src homologie 3 (SH3) Domäne, einer SH2 Domäne, der Kinasedomäne und einem kurzen C-terminalen Abschnitt. SH2 und SH3 Domänen binden spezifische Sequenzen, die Phosphotyrosine (SH2) bzw. Polyproline (SH3) beinhalten. Src besitzt zwei Tyrosinphosphorylierungsstellen, deren Phosphorylierung unterschiedliche Effekte haben. Die Autophosphorylierung des Tyrosinrestes in der Aktivierungsschleife führt wie bei anderen Tyrosinkinasen zur Aktivierung. Wenn der Tyrosinrest im C-terminalen Abschnitt durch die *carboxy-terminal Src kinase* (Csk) phosphoryliert wird, kommt es zur Inhibition der Aktivität. Schon frühere biochemische Studien haben darauf hingewiesen, dass für diese Regulation die

verschiedenen Domänen der Src Kinase essentiell sind^{31,32}. Doch erst die Kristallstruktur der Src konnte einen genauen Mechanismus für die Regulation darlegen³³. Die Kristallstruktur zeigt, dass die intrinsische SH2 Domäne mit dem phosphorylierten Tyrosin des C-terminalen Abschnitts interagiert (Abb. 3.3.3.A). Zusätzlich bindet die SH3 Domäne an den Linker zwischen SH2- und Kinasedomäne, der eine Polyproline type II helix formt. Diese Bindung führt zu einer Umpositionierung der α C, so dass die für die Katalyse essentielle Salzbrücke nicht ausgebildet werden kann.

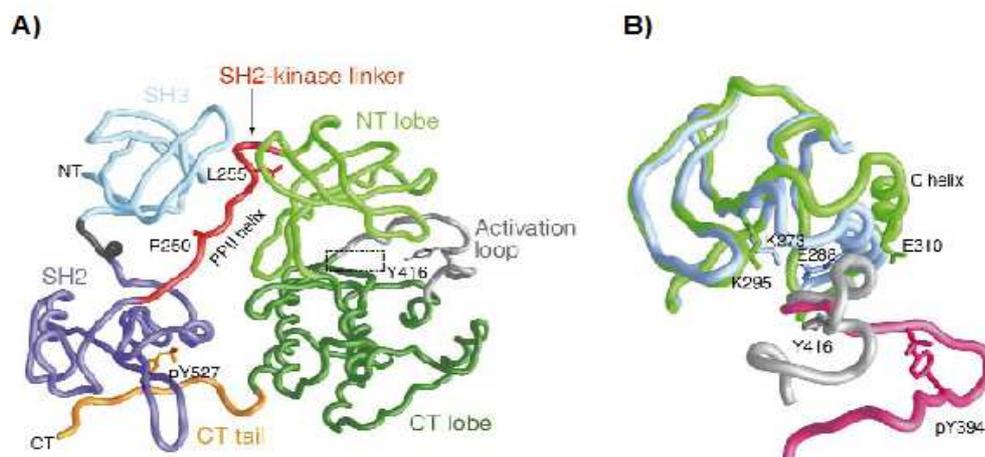


Abbildung 3.3.3: Regulation der Src Kinase.

A: Aufbau der Kinase. In hellblau die SH3- und in violett die SH2 Domäne. In rot der Linker zwischen SH2 und der Kinase Domäne (grün). Die Aktivierungsschleife ist grau und der C-Terminus orange markiert. **B:** Superpositionierung der N-terminalen Lappen der Kinasedomänen der inaktiven Src und der aktiven Lck. In grün und grau ist die Src dargestellt, in hellblau und pink die Lck. Abbildungen modifiziert nach Hubbard¹³.

Eine Superpositionierung der N-terminalen Lappen der Kinasedomänen, der inaktiven Src und der aktiven Lck verdeutlicht die Dispositionierung der α C (Abb.3.3.3.B). Leu 255 des Linkers kommt hierbei eine essentielle Rolle zu¹³. Dieser Rest liegt in einer hydrophoben Tasche auf der Rückseite des *N-lobes* und interagiert mit Resten, die im direkten Kontakt mit der α C stehen. Dadurch kommt es zu einer Deformierung dieser Helix. Die Bindung der SH2 an den phosphorylierten C-Terminus erleichtert die Interaktion zwischen SH3 und Linker. Aktiviert wird die Src Kinase über Konkurrenz. Die intramolekularen Interaktionen sind nicht optimal, so dass andere Phosphotyrosin- oder Polyprolin-tragende Sequenzen mit den Src eigenen Sequenzen konkurrieren können. Zum Beispiel bindet die Src SH2-Domäne an ein phosphoryliertes Tyrosin in der Juxtamembrandomäne des PDGFR mit sehr hoher

Affinität, so dass die intramolekularen Interaktionen aufgelöst werden und die Kinase sich autophosphorylieren kann.

Diese Beispiele der CDK und Src-Kinase sind Beleg für die Regulation von Kinasen durch extensive Protein-Protein-Wechselwirkung bzw. heterologe Dimerisierung und stellen eine Variante des *cis*-Inhibition/*trans*-Aktivierungsmodells dar.

3.3.3 Autoinhibition im Juxtamembranbereich

Für einige Rezeptoren konnten andere Domänen mit regulatorischen Funktionen als die Aktivierungsschleife detektiert werden. Eine der Domänen ist die Juxtamembrandomäne. Dieser Bereich unterscheidet sich stark unter den Rezeptortyrosinkinasen in Länge und Sequenz. Der Juxtamembranbereich des IR besteht aus 35 Aminosäuren und besitzt zwei Autophosphorylierungsstellen: Y953 und Y960. Erstgenanntes wird mit der Rezeptorendocytose in Verbindung gebracht³⁴, während die Phosphorylierung von Y960 Bindungsstellen für die IRS-Proteine und Shc schafft³⁵. Die Phosphorylierung dieser Reste beeinflusst nicht die Aktivität der Kinase. Y972 der Juxtamembrandomäne ist innerhalb der Insulinrezeptorfamilie konserviert, stellt aber keine Phosphorylierungsstelle dar. Dieser Rest übernimmt eine regulatorische Funktion³⁶. Eine Substitution dieses Restes in der löslichen, unphosphorylierten Kinase bzw. dem Rezeptor zeigt eine erhöhte Kinaseaktivität *in vitro* und *in vivo*³⁷. Ein Vergleich der Kristallstrukturen, der unphosphorylierten, autoinhibierten mit der phosphorylierten, aktiven Struktur ist in Abbildung 3.3.4 dargestellt. Die Kristallstruktur der unphosphorylierten, inaktiven Kinase verdeutlicht, dass Y972 mit Resten der α C-Helix interagiert, die Helix dadurch in einer unproduktiven Konformation hält und so die Kinaseaktivität unterdrückt (Abb. 3.3.4.A). Die für die Katalyse essentielle Salzbrücke zwischen E1047 und K1030 kann nicht ausgebildet werden. Nach der Dimerisierung und anschließender Autophosphorylierung der Aktivierungsschleife bewegen sich der N-terminale und C-terminale Bereich der Kinasedomäne von einander weg. Die α C wird nicht mehr von Y972 behindert und kann eine optimale Position zur Ausbildung der Salzbrücke einnehmen (Abb. 3.3.4B). Die Juxtamembranregion des IGF-1R ist zu 65% konserviert zum IR. Auch dieser Rezeptor verfügt über ein autoinhibitorisches Tyrosin in der Juxtamembranregion (Y957)³⁸. Eine Substitution dieses Restes in der löslichen, unphosphorylierten Kinase bzw. dem Rezeptor zeigt eine erhöhte Kinaseaktivität *in vitro* und *in vivo*. Die Kristallstrukturen der unphosphorylierten, inaktiven Kinasen zeigen, dass dieser Rest ähnlich positioniert ist wie

Y972 im IR. Die α C wird in einer unproduktiven Konformation fixiert^{18,19}.

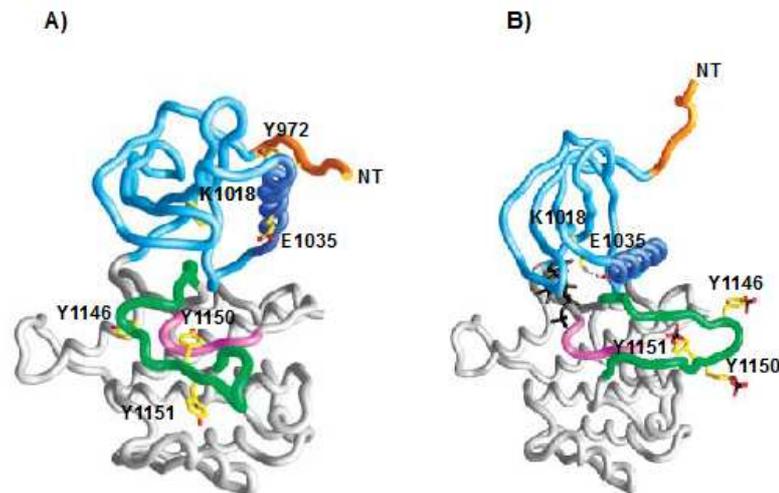


Abbildung 3.3.4: Die Autoinhibition der Juxtamembrandomäne der Insulinrezeptorkinase.

Abgebildet sind die Kristallstrukturen der unphosphorylierten Kinase (A) und der autophosphorylierten Kinase (B). Die Juxtamembrandomäne ist orange markiert, der N-terminale Lappen blau mit der α C-Helix in dunkel blau, der C-terminale Lappen ist weiß mit der katalytischen Schleife in rosa und der Aktivierungsschleife in grün. Wichtige Reste sind hervorgehoben (Abb. modifiziert nach Hubbard³⁶).

3.3.4 Kinaseaktivierung über Dimerisierung

Mit Ausnahme der IR-Familie liegen alle RTKs als nicht konstitutive Dimere in der Zellmembran vor. Die Ligandenbindung induziert eine Dimerisierung des Rezeptors, welches in der Autophosphorylierung der zytoplasmatischen Domänen resultiert. Bei den konstitutiven Dimeren der IR-Familie wird durch Hormonbindung eine Konformationsänderung verursacht, die die *trans*-Autophosphorylierung ermöglicht. Die Arbeitsgruppe von Yip hat für die Aktivierung des IR einen Mechanismus der produktiven Dimerisierung postuliert, der auf elektronenmikroskopischer Analyse der extrazellulären Hormon-Bindungsdomäne beruht (Abb. 3.3.5)^{39,40}. Bei diesem Modell wird angenommen, dass die extrazelluläre Domäne inhibitorisch auf die intrazelluläre Kinase wirkt, indem sie die Kinasedomänen in einem nichtproduktiven Abstand hält. Die Ligandenbindung an das unproduktive Dimer induziert dann eine Konformationsänderung der Ektodomänen (= Hormon-bindende, extrazelluläre Domäne des IR) und erlaubt eine Annäherung der zytoplasmatischen Domänen mit der intrinsischen Kinaseaktivität. Dabei werden die Kinasedomänen so ausgerichtet, dass eine

Autophosphorylierung in *trans* erfolgen kann.

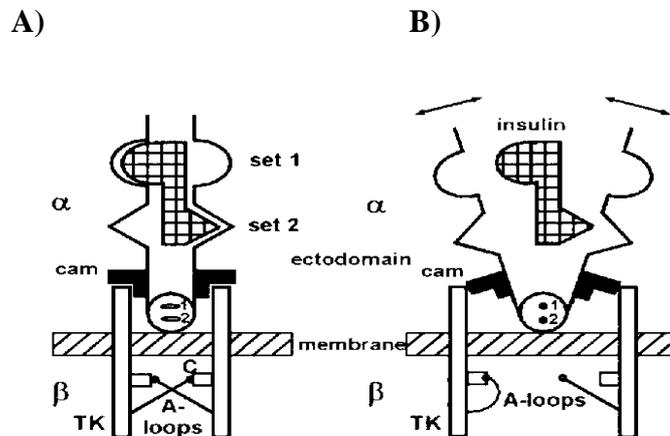


Abbildung 3.3.5: Schematische Darstellung der Aktivierung des IR durch Insulinbindung.

In **A** ist die geschlossene Insulin-gebundene Form des IR abgebildet. Die Kinasedomänen der Monomere befinden sich in räumlicher Nähe. **B** zeigt die offene Form, in der kein Insulin gebunden ist. Hier sind die Kinasedomänen beider Monomere räumlich getrennt. TK: Kinasedomäne; A-loops: Aktivierungsschleifen; membrane: Zellmembran. Abbildung modifiziert nach Ottensmeyer *et al*³⁹.

Auch unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Dimerisierung zur Steigerung der Aktivität der Kinasen führt. Dabei wurde das Modell von Yip aufgegriffen. Die durch die Fusion an die homodimere Glutathion-S-Transferease (GST) dimerisierten, löslichen Kinasedomänen des IR und des IGF-1R (IRKD, IGFKD) zeigen eine 10-100 fache Erhöhung der Phosphorylierungsaktivität sowohl in der Auto- als auch in der Substratphosphorylierung⁴¹. Somit führt die Dimerisierung durch GST zu einem produktiven Dimer. Weiterhin konnte durch limitierte Proteolyse mittels Trypsin gezeigt werden, dass durch die Dimerisierung eine Konformationsänderung in der Aktivierungsschleife stattfindet. In der monomeren Kinase ist die Aktivierungsschleife in Einklang mit der oben beschriebenen *cis*-Inhibition für Trypsin nicht zugänglich. Durch die GST-vermittelte Dimerisierung wird die Aktivierungsschleife jedoch so positioniert, dass sie durch die Protease gespalten werden kann. So scheint durch Dimerisierung die *cis*-Inhibition aufgehoben zu werden und somit die Kinase eine offene Konformation zu erhalten. Diese ist notwendig, um den Zugang von ATP und Substrat sowohl in Auto- als auch in Substratphosphorylierung zu ermöglichen. Die GST-Kinasen sind somit ein Modell für den aktiven, Hormon-gebundenen Rezeptor⁴¹. Auf molekularer Ebene

bedeutet Dimerisierung Erhöhung der lokalen Kinasekonzentration. In Einklang damit sind monomere Kinasen in der Lage, in hohen Konzentrationen sich mittels Autophosphorylierung zu aktivieren und Substratphosphorylierung auszuführen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass nicht allein die Dimerisierung zur Aktivierung führt, sondern ein produktives Dimer gebildet wird, das eine ausreichende Nähe der katalytischen Domänen und eine korrekte Orientierung zueinander gewährleistet.

3.3.4.1 Dimere Strukturen des IGF-1R

Über konzentrationsabhängige Untersuchungen der monomeren Kinasedomäne des IGF-1R in der analytischen Ultrazentrifuge konnte eine Dimerisierungskonstante von 8-10 μM ermittelt werden (Rufer, unveröffentlichte Ergebnisse). Da die Dimerisierung innerhalb einer Zehnerpotenz der Konzentrationserhöhung auftritt kann geschlossen werden, dass die Kinase selbst über eine niederaffine, aber spezifische „Dimerisierungsdomäne“ verfügt. Dies steht in Einklang mit den Befunden der Röntgenstrukturanalyse der unphosphorylierten Tyrosinkinase des IGF-1R von Munshi *et al.*^{18,42}. Diese fanden bei der Kristallisation einer Doppelmutante der Kinasedomäne des IGF-1R zwei dimere Strukturen. In der Doppelmutante wurden die zwei Glutamatreste E1067 und E1069 der *hinge region* zu Alanin mutiert, was zu einer Fixierung dieses Bereichs und zu einer höheren Auflösung als bei der Struktur des Wildtyps führte. Die beiden Monomere assoziieren als Dimer in zwei unterschiedlichen Orientierungen zueinander. In der einen Struktur sind die aktiven Zentren beider Monomere einander zugewandt (Abb. 3.3.6.A). Der N-terminale Bereich des einen Monomers interagiert mit zahlreichen Aminosäuren der Aktivierungsschleife des anderen Monomers. Auch Reste der αC -Helix sind an der Dimerisierung beteiligt. In dieser Anordnung blockiert die Juxtamembrandomäne des einen Dimers den Zugang zum aktiven Zentrum des anderen Monomers, was einer *trans*-autoinhibitorischen Rolle der Juxtamembrandomäne entsprechen würde. Das widerspricht allerdings der in der Literatur beschriebenen *cis*-autoinhibitorischen Rolle der Juxtamembrandomäne (vgl. 3.3.3). Zusätzlich wird aus dieser Struktur nicht ersichtlich, wie die *trans*-Autophosphorylierung erfolgen soll. In der zweiten dimeren Struktur sind die αD -Helices an der Interaktion der beiden Monomere beteiligt (Abb. 3.3.6.B). Die aktiven Zentren sind einander abgewandt.

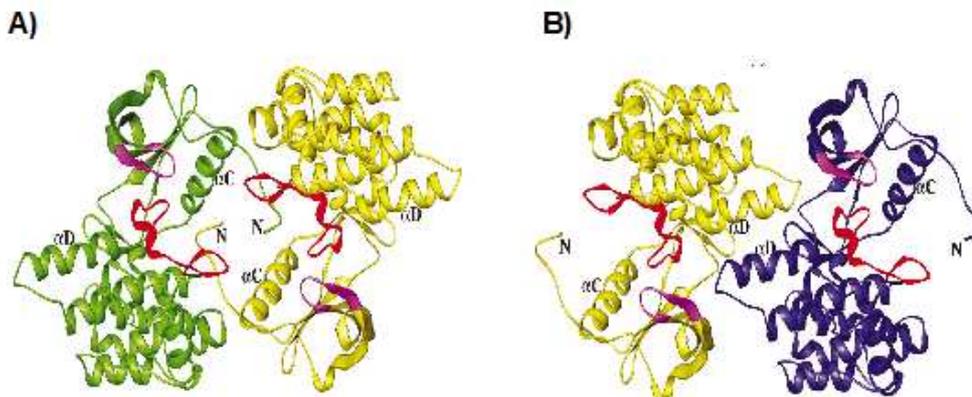


Abbildung 3.3.6: Dimeren Kristallstrukturen der unphosphorylierten Kinasedomäne des IGF-1R
 Schleifendiagramm der dimeren Struktur. Die Glycin-reiche Schleife ist in pink und die Aktivierungsschleife in rot gekennzeichnet. Kristallisiert wurde die eine Kinasemutante, in der die zwei Glutamatreste E1067 und E1069 zu Alanin mutiert wurden. Nur diese Mutante resultierte in Kristallen mit einer Auflösung von 1,5 Å. Die Kristallisierte Kinasedomäne entspricht der Sequenz von 944 bis 1264 des humanen IGF-1R. **A:** Dimer mit den Aktiven Zentren zueinander gewandt. **B:** Dimer mit den voneinander abgewandten Aktiven Zentren. Abbildung modifiziert nach Munshi *et al*⁴².

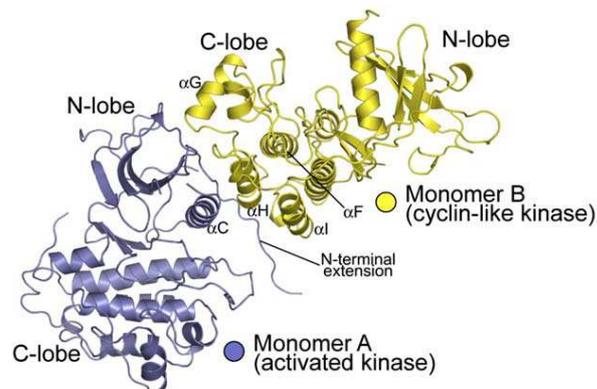
Zusammen mit der *hinge region* bildet die α D-Helix das „Gelenk“ der Kinase und bestimmt maßgeblich die Konformationsänderung von der inaktiven zur aktiven Form und *vice versa*²¹. Diese Struktur steht im Einklang mit der *cis*-autoinhibitorischen Rolle der Juxtamembrandomäne der Rezeptortyrosinkinasen. Auch die *trans*-Autophosphorylierung der Aktivierungsschleife ist vorstellbar, da das aktive Zentrum und die Aktivierungsschleife beider Monomere in dieser Struktur zugänglich sind. Auf Grund der relativ hohen Interaktionsflächen zwischen den Monomeren, die für ein Kristallartefakt ungewöhnlich groß wären, schließen die Autoren eine physiologische Bedeutung dieser Dimere nicht aus, zumal der Rezeptor *in vivo* als konstitutives Dimer vorliegt.

3.3.4.2 Bildung von asymmetrischen Dimeren beim Aktivierungsprozess des EGFR

Mitglieder der *epidermal growthfactor receptor family*, EGFR, ErbB2, ErbB3 und ErbB4, sind Rezeptortyrosinkinasen und werden als solche über Liganden-induzierte Dimerisierung aktiviert^{43,44}. Dimerisierung führt zur Phosphorylierung von Tyrosinresten in der C-terminalen Domäne, die im phosphorylierten Zustand als Bindestellen für Signalmoleküle mit SH2 oder PTB Domänen dienen⁴⁵. Die Aktivierung des Rezeptors ist nicht die Folge der *trans*-Phosphorylierung der Aktivierungsschleife, wie es für die anderen Rezeptortyrosinkinasen beschrieben wird. Die Phosphorylierung des Tyrosinrestes der Aktivierungsschleife ist nicht

notwendig für die Aktivierung des EGFR^{10,11,46,47}. Bei der Kristallisierung der zytoplasmatischen Domäne des EGFR wurde ein asymmetrisches Dimer gefunden, in dem der *C-lobe* der Kinasedomäne des einen Monomers mit dem *N-lobe* der Kinasedomäne des zweiten Monomers interagiert (s. Abb. 3.3.7.A)⁴⁸. Auffällig ist hier die direkte Interaktion des einen Monomers mit der α C-Helix der zweiten Monomers. Dadurch zeigt dieses Dimer eine hohe Ähnlichkeit zu dem CDK-Cyclin-Komplex. Bei der EGF-Struktur übernimmt der *C-lobe* des einen Monomers (Monomer B in Abbildung 3.3.7.A) die Funktion des Cyclins.

A)



B)

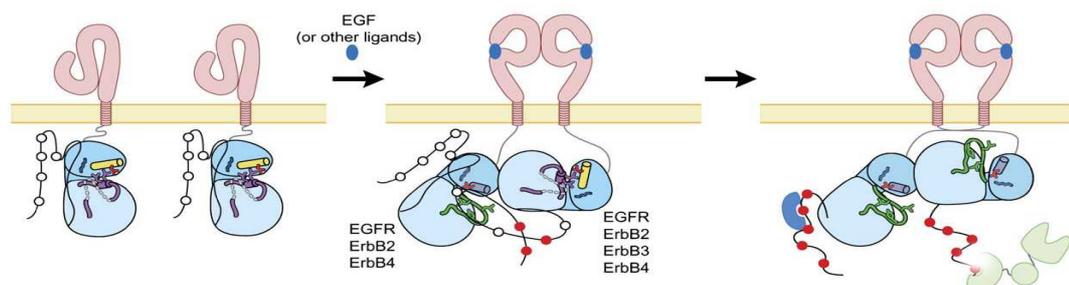


Abbildung 3.3.7: Bildung asymmetrischer Dimere als Aktivierungsprozess beim EGFR.

A: Dargestellt ist die Kristallstruktur des asymmetrischen Dimers des EGFR. In blau ist Monomer A und in gelb Monomer B gezeigt. **B:** Schematische Darstellung des Modells zum Aktivierungsprozess von Mitgliedern der EGFR Familie. Nach Liganden-stimulierter Homo- oder Heterodimerisierung bildet sich das asymmetrische Dimer aus. Alle Mitglieder der Familie können als Donor Kinase fungieren, während als Akzeptorkinase nur die funktionell aktiven Mitglieder EGFR, ErbB2 und ErbB4 agieren können. Es kommt zur Autophosphorylierung im C-Terminus, so dass Bindungsstellen für Substrate geschaffen werden. Abbildung modifiziert nach Zhang *et al*⁴⁸.

Mutationen essentieller Reste der Interaktionsfläche zeigen, dass das *CDK/Cyclin-like* asymmetrische Dimer notwendig ist für die Aktivierung des Rezeptors. Die Interaktion der beiden Monomere stabilisiert die aktive Konformation der Kinasedomäne. Die Kristallisation der Kinasedomäne mit einer dieser Mutationen führt zu einer Struktur, die der inaktiven Konformation der Src bzw. CDK ähnlich ist (*Src/CDK-like inactive conformation*). In dieser inaktiven Struktur wird die α C-Helix in einer nach Außen verschobenen Position fixiert, die Aktivierungsschleife nimmt eine inaktive Struktur ein. Auf Grund dieser Strukturen präsentieren Zhang *et al.* ein Modell zur Aktivierung des Rezeptors über Dimerisierung (Abb. 3.8.B)⁴⁸. Im unligandierten Zustand nimmt die Kinasedomäne des monomeren Rezeptors die *Src/CDK-like inactive conformation* ein. Das Dimerisierungs-Interface der extrazellulären Domäne bleibt verdeckt, bis es durch die Bindung vom Liganden aufgedeckt wird⁴⁹. Die Dimerisierung bringt die Kinasedomänen in räumliche Nähe und induziert dadurch den Übergang zum *CDK/Cyclin-like* asymmetrischen Dimer. Der *C-Lobe* des einen Monomers übernimmt die Rolle des Cyclins (Donor Kinase) und aktiviert das andere Monomer (Akzeptor Kinase) durch die Stabilisierung der aktiven Konformation der Kinasedomäne.

In diesem asymmetrischen Dimer erlangt nur die Akzeptor Kinase Aktivität. Die Autoren vermuten jedoch, dass die beiden Kinasedomänen ihre Positionen dynamisch tauschen und sich gegenseitig aktivieren können, wenn der Juxtamembranbereich flexibel genug ist. Dieses Modell erklärt wie eine katalytische inaktive Kinase, eine katalytisch funktionelle Kinase aktivieren kann, wie es im Fall von Heterodimeren aus den aktiven Mitgliedern der EGFR Familie und dem katalytisch inaktiven ErbB3 der Fall ist⁴⁵. Hier dient ErbB3 als Donor Kinase. Unsere Arbeitsgruppe konnte außerdem zeigen, dass die monomere Kinase des EGFR auch durch das katalytisch inaktive Substrat *src homologous collagen-like protein* (Shc), das in der Juxtamembrandomäne des Rezeptors bindet, aktiviert werden kann⁵⁰. Dieses Ergebnis lässt sich mit dem von Zhang vorgestellten Modell in Einklang bringen, wenn Shc die Funktion der Donor Kinase übernimmt.

3.4 Funktionen des IGF-1R

Der IGF-1R ist ein Mitglied der Insulinrezeptorfamilie und ist aufgebaut wie unter 3.2 beschrieben. Im Anschluss an die Transmembrandomäne besitzt der Rezeptor eine Juxtamembrandomäne, in der eine Bindungsstelle für Phosphotyrosin-bindende Domänen

lokalisiert ist (Y950). Die Kinasedomäne umfasst drei Tyrosinautophosphorylierungsstellen (Y1131, 1135 und 1136) in der Aktivierungsschleife. In der C-terminalen Domäne sind weitere Tyrosine und Serine lokalisiert (Y1250, Y1251, Y1316 und S1272, S1278, S1280-1283) die ebenfalls phosphoryliert werden und eine Rolle in der Signalweiterleitung spielen. Der IGF-1R wird sowohl im fötalen als auch im post-natalen Gewebe expremiert. Die Expression erfolgt in fast allen Zelltypen, Ausnahmen sind Hepatozyten und ausgereifte B-Zellen^{51,52}. Aktiviert wird der IGF-1R über die Bindung der Hormone IGF-1 und IGF-2. Auch der IR ist ein Teil des IGF-Systems. Die Homologie zwischen IR und IGF-1R liegt zwischen 45-65 % in der Ligandenbindungsdomäne bzw. 60-85 % in den intrazellulären Domänen⁵³⁻⁵⁶. Dennoch üben die beiden Rezeptoren in Säugern unterschiedliche biologische Funktionen aus⁵⁷. Der IR spielt eine zentrale Rolle im Glukose Metabolismus, während der IGF-1R eine Funktion in der Wachstumsregulation einnimmt. Eine wichtige Grundlage dieser unterschiedlichen Funktion ist die unterschiedliche zelluläre Verteilung der Rezeptoren sowie deren unterschiedliche Affinitäten zu den Liganden bzw. den signalweiterleitenden Substraten. Der IR wird nur im Leber-, Muskel- und Fettgewebe in großer Menge expremiert. Der IR bindet Insulin mit sehr hoher Affinität, die Hormone IGF-1 und 2 hingegen mit einer sehr viel geringeren Affinität.

Die Hormonbindung an den IGF-1R führt zu einer Aktivierung verschiedenster Signalwege. Der aktivierte IGF-1R sendet ein mitogenes Signal und schützt Zellen vor Apoptose. Er fördert Zell-Größen-Wachstum, kann Differenzierung einleiten und spielt eine bedeutende Rolle in der Zelltransformation. Da der IGF-1R ubiquitär vorhanden ist, spielt er eine Rolle im Wachstum vieler Zelltypen, auch wenn der primäre Wachstumsfaktor ein anderer sein sollte⁵⁸⁻⁶⁰. Die verschiedenen Funktionen des IGF-1R erscheinen zum Teil widersprüchlich. Hierbei stellt sich besonders die Frage, wie die Wahl zwischen den unterschiedlichen Schicksalen erfolgt.

Der durch seine Liganden aktivierte IGF-1R spielt eine wesentliche Rolle bei der Kontrolle der Zellproliferation sowohl *in vivo* als auch *in vitro*. Die mitogene Funktion des Rezeptors erstreckt sich über fast alle Zelltypen. Wird die IGF-1R Synthese über Anti-Sense Strategie gehemmt, kommt es zu Inhibition der Zellproliferation⁶¹⁻⁶⁴. Für die mitogene Funktion des IGF-1R sind lediglich eine funktionelle Kinasedomäne und ATP-Bindestelle notwendig. Das Vorhandensein der Substratbindestellen der Juxtamembrandomäne bzw. des C-Terminus hat

keinen Einfluss auf die mitogene Aktivität des Rezeptors, so dass davon ausgegangen werden kann, dass dem Rezeptor mehrere Signalwege zur Weiterleitung des Signals zur Verfügung stehen^{65,66}.

In manchen Zelltypen können IGF-1 und IGF-2 Differenzierung einleiten. Versuche haben gezeigt, dass die Zugänglichkeit der Substrate die Antwort des IGF-R auf das Hormon bestimmt. Ist IRS-1 das vorherrschende Substrat, so sind die Zellen auf Wachstum programmiert und können Transformation auslösen. Überwiegt das Substrat Shc, haben die Zellen die Tendenz zu differenzieren⁶⁷. Anders als bei der Mitose ist für die Differenzierung zusätzlich zur Funktionalität des Rezeptors sowohl das Vorhandensein von Y950, als auch das des C-Terminus essentiell^{67,68}.

Verschiedene Zelltypen werden durch den aktivierten IGF-1R vor einer Menge an apoptotischen Schäden geschützt. Eine Abschaltung der IGF-1R Funktion über Antisense Strategie⁶⁹⁻⁷⁴ oder durch dominant negative Mutationen⁷⁵⁻⁷⁷ führt zur Apoptose von Tumorzellen *in vivo*. Zum Schutz vor der Apoptose ist allein ein funktioneller Rezeptor essentiell⁷⁸. Der IGF-1R nutzt somit alternative Signalwege zum Schutz vor Apoptose⁵⁹.

Bei einigen Krebserkrankungen ist der IGF-1R überexprimiert⁷⁹⁻⁸¹. Dies ist vereinbar mit den Hinweisen aus Versuchen mit Tieren oder der Zellkultur. Hier konnte gezeigt werden, dass ein überexprimierter Rezeptor zur Transformation einer Zelle führt und dass eine Deletion des IGF-1R die Zellen unempfindlich für Transformation macht^{82,83}. Eine weitere Beobachtung ist, dass eine Senkung der Rezeptoraktivität durch Antisense Strategie oder dominant negative Mutationen zu massiver Apoptose in Tumorzellen *in vivo* und *in vitro* führt^{84,76}. Dies resultiert in einer Inhibition der Tumorgenese und der Metastasenbildung in Tieren⁸⁵. Um die Transformation einleiten zu können, ist die Anwesenheit von IRS-1 notwendig. Außerdem ist der komplette, intakte Rezeptor essentiell. Die Domäne, die das Signal weiterleitet, kann im C-Terminus des Rezeptors lokalisiert werden. Hier ist das Vorhandensein des Tyrosin 1251, das Serincluster bei 1280 bis 1283 und die Reste zwischen 1293-1294 notwendig⁸⁶.

3.5 Kinasen als Target für Krebstherapeutika

Dereguliertes Zellwachstum ist das Kriterium aller Tumore, ob gutartig oder bösartig. Es entsteht durch gestörte Signalvermittlung innerhalb einer Zelle oder auch zwischen Zellen⁸⁷. Eine sehr wichtige Rolle spielen hier die Rezeptortyrosinkinasen bzw. Kinasen im

allgemeinen. Da deregulierte Kinasen mit vielen Krebserkrankungen korrelieren, hat sich die zielgerichtete Inhibition von Proteinkinasen zur attraktiven Strategie in der Krebsbehandlung entwickelt^{88,89}. Sie verspricht eine verbesserte Wirksamkeit ohne die toxischen Nebenwirkungen von gebräuchlichen Krebsmedikamenten⁹⁰⁻⁹². Ein kleiner Satz an Kinasen wurden bisher verwendet für klinischen Nutzen: *breakpoint cluster region* (Bcr) des *Abelson leukemia virus* (Abl), c-Kit, PDGFR, EGFR und ErbB2⁹³. Die Fähigkeit, diese Targets mit niedermolekularen Inhibitoren oder Antikörpern zu inhibieren, führte zu neuen Mitteln gegen Krebs. Allerdings sind die Mittel, die gegen diese Targets gerichtet sind weit entfernt vom Ideal. Die Wirksamkeit der Mittel sind unter anderem abhängig von dem Vorhandensein einer aktivierenden Mutation in der Kinasedomäne, wie es im Falle der Inhibitoren *Gefitinib* und *Erlotinib* gegen den EGFR der Fall ist⁹⁴. Außerdem können Resistenzen durch die Ausbildung von spezifischen Mutationen gegen diese Mittel ausgebildet werden, wie im Falle des Inhibitors *Gleevec* bei Bcr/Abl⁹⁵. Ein Weitere Verminderung der Wirksamkeit ist der Wechsel zu alternativen proliferativen bzw. Überlebens-Signalwegen, die durch andere Rezeptoren vermittelt werden. Die Inhibition von EGFR durch *Erlotinib* führt zu einem erhöhten Level an IGF-1R/EGFR Heterodimeren⁹⁶. Über die Hetero-Dimerisierung wird der IGF-1R aktiviert, der wiederum den PI3K/Akt- sowie MEK/ERK Signalweg anschaltet. Die Tumorzellen entgehen der Apoptose, außerdem wird die EGFR-Expression angeschaltet, was wiederum die Heterodimerisierung fördert. Eine Interaktion zwischen IGF-1R und EGFR konnte schon mehrfach in Tumorzellen beobachtet werden⁹⁷⁻⁹⁹.

Es gibt verschiedene Ansätze, Kinasen zu inhibieren. Die meisten Kinaseinhibitoren sind niedermolekulare Wirkstoffe, die einfacher zu handhaben sind, als Proteine oder Antikörper. Diese Inhibitoren sind aber meist ATP-kompetitiv¹⁰⁰⁻¹⁰² und binden somit in der ATP-Bindestelle. Da diese unter Kinasen hoch konserviert ist, sind diese Inhibitoren oft nicht spezifisch⁹¹. Ein weiteres Problem der ATP-kompetitiven Inhibitoren ist die hohe ATP-Konzentration der Zelle, vor allem bei Kinasen mit kleinen K_M für ATP im Bereich von 10 μ M oder weniger. Außerdem ist die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von Wirkstoff-resistenten Kinasemutanten bei niedermolekularen Inhibitoren, die in der katalytischen Domänen binden höher als bei Antikörpern oder Peptiden/Proteinen, die meist mehrere essentielle Bindestellen zum Target aufweisen¹⁰³. Eine andere Strategie ist die Inhibition über die Substratbindung. Hier können pseudo-Substrate verwendet werden, die im katalytischen

Zentrum binden und den Zugang versperren¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Wenn die Substratbindung außerhalb der katalytischen Region stattfindet, besteht die Möglichkeit, nicht die Kinaseaktivität selbst, sondern lediglich die Substratphosphorylierung und damit Signalweiterleitung zu hemmen. So können Wirkstoffe gefunden werden, die lediglich einen Signalweg einer Kinase inhibieren, während die anderen erhalten bleiben¹⁰⁷. Eine Kombination der ATP- und Substratkompetitiven Inhibition führt zu Bisubstrat-Inhibitoren, bei denen ein ATP-Analoga mit einem Substratanaloga über einen Linker verknüpft ist¹⁰⁸. So kann der Inhibitor gleichzeitig mit der Nucleotid- und der Substrat-Bindungsstelle konkurrieren. Dadurch soll der Inhibitor eine hohe Affinität sowie Spezifität für die jeweilige Zielkinase erlangen. Die Verwendung von monoclonalen Antikörpern führt zu sehr spezifischen Inhibitoren. Diese Strategie wird vor allem beim EGFR bzw. ErbB2 angewandt^{109,110}. Der MEK Inhibitor CI-1040 zeigt eine weitere, viel versprechende Strategie. Dieser Inhibitor bindet in einer Region außerhalb des katalytischen Zentrums in der es wenige Sequenzähnlichkeiten zu anderen Kinasen gibt. Er scheint durch seine Bindung die Kinase in ihrer inaktiven Konformation zu fixieren¹¹¹.

Die Suche nach alternativen Rezeptortyrosinkinasen, die eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellproliferation bzw. der Verhinderung von programmiertem Zelltod von Tumorzellen spielen, führte zum IGF-1R als Target. Eine interessante Eigenschaft des Rezeptors ist dabei, dass er nur einen mäßigen Effekt auf Zellen in Monolayer Kultur hat. Es scheint, als ob der Rezeptor kein absolutes Muss für normales Wachstum ist, aber für das Fixierungs-unabhängige Wachstum von Zellen essentiell ist^{72,77,112,113}.

Ein großes Problem bei der Entwicklung von spezifischen Inhibitoren für diesen Rezeptor ist seine hohe Homologie zum IR, die innerhalb der Kinasedomäne bei 85 % liegt⁵³. Eine Hemmung des IR kann zur Ausbildung des diabetischen Phänotyps führen. Hier gibt es drei Möglichkeiten, das Problem zu umgehen. Zum einen kann die Bindung von IGF-1 und IGF-2 an den Rezeptor verhindert werden. Denkbar wären Mimiker der IGF-Bindeproteine, die die freie Menge an Ligand herabsetzen¹¹⁴. Hier ist der IR nicht betroffen, da die Affinität zu Insulin viel höher ist, als die zu IGF-1 und IGF-2. Ein Nachteil ist allerdings, dass gleich beide Hormone ausgeschaltet werden müssen. Der zweite Ansatz wäre die Entwicklung von Inhibitoren, die außerhalb der Kinasedomäne binden, in Bereichen mit geringerer Sequenzhomologie.

Eine Überlagerung der Strukturen der inaktiven Kinasedomänen des IGF-1R und IR zeigt jedoch, dass es auch zwischen der sehr homologen Kinasedomäne strukturelle Unterschiede gibt. Insbesondere in den Bereichen der α C-Helix, der Glycin-reichen Schleife und der *hinge region* (hier *kinase insert region* genannt) liegen unterschiedliche Strukturen zwischen den Kinasen des IR und IGF-1R vor¹⁸. Diese ersichtlichen strukturellen Unterschiede der inaktiven Kinasekonformation können zur Generierung spezifischer IGF-1R Inhibitoren ausgenutzt werden¹¹⁴.

3.6 Phage Display

Das *Phage Display* ist eine Methode, Protein-Protein-, Protein-Peptid oder Protein-DNA Wechselwirkungen zu untersuchen. Außerdem findet die Methode Anwendung bei der Suche nach spezifischen Antikörpern für therapeutische, diagnostische oder molekularbiologische Anwendungen. Der Ansatz basiert auf zwei entscheidenden Konzepten: Zum einen wird der Phage genutzt, um Proteinerkennung mit DNA Replikation zu verlinken. Das Protein oder Peptid wird auf der Oberfläche des Phagen präsentiert und die DNA, die für dieses Peptid kodiert, ist im Phagen enthalten. Das zweite Konzept ist die Verwendung großer Bibliotheken von DNA Sequenzen, die in die Phagen kloniert werden. So kann aus einer großen Anzahl an Phagen mit unterschiedlichen repräsentierten Sequenzen die heraus selektioniert werden, die spezifisch an ein Target binden. Anschließend können diese durch die Infektion von Bakterien amplifiziert werden. Für das *Phage Display* wird hauptsächlich der filamentöse Phage M13 verwendet¹¹⁵. Die Hülle dieses Phagens besteht aus vier Hüllproteinen (gp3, gp7, gp8 und gp9). Die Hüllproteine werden mit N-terminalen Signalsequenzen synthetisiert, welche sie zur Membran leiten. Bei Sekretion wird diese Sequenz proteolytisch abgespalten. Für das *Phage Display* wird die DNA der zu untersuchenden Sequenz zwischen die Signal Sequenz und dem N-Terminus des Hüllproteins kloniert. Hierzu wird häufig das Hüllprotein gp3 verwendet. Zur Selektion wird die als *Biopanning* bezeichnete Methode verwendet, die in Abbildung 3.6.1 schematisch dargestellt ist. Das Target (Protein, Peptid oder auch DNA) wird auf einer festen Oberfläche immobilisiert und mit der Phagenbibliothek inkubiert (A-B). Die ungebundenen und unspezifisch bindenden Phagen werden in mehreren Waschschrritten entfernt (C). Anschließend können die bindenden Phagen eluiert und durch Infektion von *E.coli* amplifiziert werden (D-E). Diese Phagen werden erneut im *Biopanning* eingesetzt, um die Spezifität zu erhöhen. Nach 3-5 Runden kann die DNA der bindenden Phagen isoliert und

sequenziert werden (F).

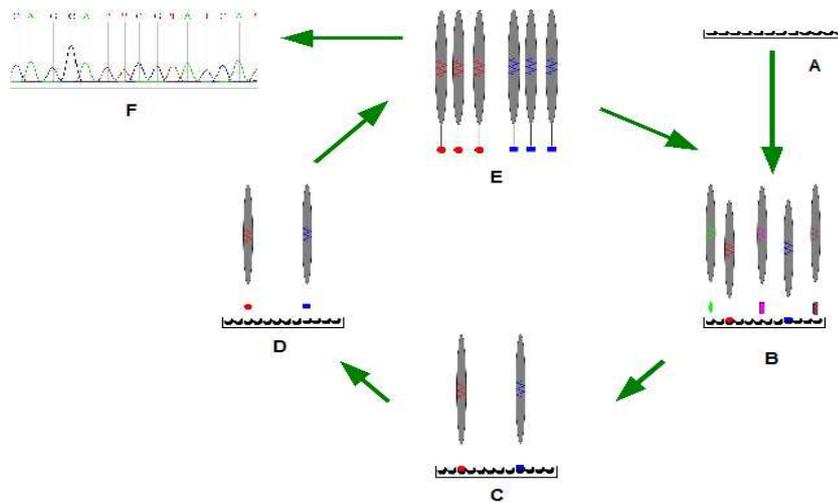


Abbildung 3.6.1: Schematische Darstellung des Biopannings

A: Das Target wird auf einer festen Oberfläche immobilisiert. **B:** Inkubation des Targets mit der Phagenbibliothek. **C:** Waschschrift zur Entfernung der unspezifisch bindenden Phagen. **D:** Elution der an das Target bindenden Phagen. **E:** Amplifikation der bindenden Phagen. **F:** Isolierung und Sequenzierung der Phagen DNA zur Identifikation der DNA-Sequenz der an das Target bindenden Peptid- bzw. Proteinsequenzen.

Die häufigste Anwendung ist das *Phage Display* von Antikörper-Bibliotheken¹¹⁶⁻¹¹⁸. Hier wird der Gensatz eines Antikörpers an das Hüllprotein gp3 des M13 Phagen fusioniert, so dass eine große Anzahl an Phagen mit unterschiedlichen Antikörperfragmenten auf der Oberfläche erhalten werden. Im *Biopanning* werden dann die Phagen selektioniert, die spezifisch an ein Antigen binden. Aus den isolierten Phagen kann nun die DNA der Antikörper isoliert und sequenziert werden. Im Gegensatz zu auf Versuchstieren basierenden Methoden zur Herstellung von Antikörpern stehen nach einem *Biopanning* die Gene für jeden erzeugten Antikörper ohne Mehraufwand zur Verfügung. Das *Phage Display* ermöglicht außerdem die Generierung von Antikörpern, die in einem Tier niemals gebildet werden könnten. Hierzu zählen z.B. Antikörper gegen eine transiente Konformation eines Antigens nach Kofaktor-Bindung¹¹⁹ oder auch gegen hoch toxische Substanzen, tödliche Pathogene oder evolutionär stark konservierte Antigene. Antikörper-Bibliotheken mit weit über 10^9 individuellen Klonen sind inzwischen hergestellt und für die Selektion von spezifischen Antikörperfragmenten gegen unterschiedlichste Antigene verwendet worden¹²⁰.

Eine weitere Anwendung findet das *Phage Display* bei der Suche nach Interaktionspartnern für ein bestimmtes Target-Protein. Hier können DNA-Bibliotheken, bestehend aus allen kodierenden Sequenzen einer Zelle, eines Gewebes oder gar Organismus eingesetzt werden. So können neue Funktionen oder Mechanismen des Proteins erschlossen werden. Außerdem wird das *Phage Display* zum Protein-Engineering verwendet. Durch das Screening von Peptid-Bibliotheken (Peptide von 8-12 Aminosäuren) werden Liganden für ein Targetprotein gesucht. So können Enzyminhibitoren, Rezeptor-Agonisten und Antagonisten generiert werden. Als solches ist das *Phage Display* ein wichtiges Hilfsmittel im *Drug Discovery* ¹²¹⁻¹²³.

3.7 Fragestellung

Der IGF-Rezeptor (IGF-R) ist verantwortlich für Entwicklung, normales Wachstum und Differenzierung der Zelle, aber auch die Unterdrückung der Apoptose. Maligne Transformation einer Zelle ist deshalb vielfach assoziiert mit erhöhter Expression und/oder konstitutiver Aktivierung des IGF-Rezeptors. Eine Senkung der Rezeptoraktivität durch Antisense Strategie oder dominant negative Mutationen führt zu massiver Apoptose in Tumorzellen *in vivo* und *in vitro* ^{72,69-71,73-77}. Aus diesem Grunde besteht ein besonderes Interesse an der Entwicklung eines Inhibitors gegen den IGF-Rezeptor. Die gängigen Kinaseinhibitoren sind niedermolekulare, ATP- bzw. Substrat-kompetitive Kinaseinhibitoren, die innerhalb der Kinasedomäne binden. Ein großes Problem hierbei ist die große Homologie innerhalb der Kinasedomäne zwischen IGF-1R und Insulinrezeptor (IR), was zu drastischen Nebenwirkungen wie die Ausbildung eines diabetischen Phänotyps bei einer unspezifischen Inhibition führen kann. Ziel meiner Arbeit war daher die Entwicklung strukturbasierter, nicht ATP- bzw. Substrat-kompetitiver, peptidischer Kinaseinhibitoren. Die Aktivierung von Rezeptorkinasen basiert nach übereinstimmender Meinung auf der Dimerisierung ^{39-41,48,124}. Daher basierte mein Ansatz zur Inhibition des IGF-1R auf der Unterbindung der Dimerisierung über Competition mit sequenzspezifischen Peptiden. Realisiert werden sollte dieses Konzept an zwei Bereichen des IGF-1R, dem Juxtamembranbereich und der α D-Helix/*hinge region*. Im Juxtamembranbereich weist der IGF-1R Sequenzunterschiede zum IR auf, der ein Insert von fünf Aminosäuren besitzt. Die Sequenzunterschiede in diesem Bereich sollten zu sehr spezifisch bindenden Peptiden für die IGF-1R Kinase führen. Neben der Dimerisierungsdomäne ist im Juxtamembranbereich ein autoregulatorischer Bereich lokalisiert. Peptide, die in diesem Bereich binden, könnten somit die Kinase in ihrer autoinhibierten Konformation fixieren bzw. mit der Dimerisierung der Kinase interferieren. Mittels *Phage Display* werden aus einer nahezu unbeschränkten Anzahl an verschiedenen

Peptiden mit beliebiger Sequenz diejenigen selektioniert, die spezifisch an die Fragmente der entsprechenden Bereiche binden. Gegen die α D-Helix/*hinge region* gab es bereits eine aus Vorarbeiten stammende inhibitorische Peptidsequenz (L¹KSYLRSLRPEAENN¹⁵)¹²⁵, die über *Phage Display* optimiert werden sollte. Die Spezifität des Bindungsortes sollte unter anderem mittels Kreuzmutation verifiziert werden. Die α D-Helix/*hinge region* bestimmt maßgeblich die Konformationsänderung zwischen inaktiver und aktiver Kinasekonformation und ist an der Dimerisierung der Kinase sowie der Substraterkennung beteiligt^{21,42}. Innerhalb der Region der α D-Helix/*hinge region* unterscheiden sich der IGF-1R und IR in der Sequenz nur um eine Aminosäure. Ein Vergleich der unphosphorylierten, inaktiven Kinasedomänen des IGF-1R und IR zeigt jedoch für diesen Bereich Unterschiede in der Struktur¹⁸, so dass hier die Spezifität über die Bindung des Peptids an die einzigartige autoinhibierte Form der Kinase erreicht werden kann. Die aus dem *Phage Display* erhaltenen Peptidsequenzen sollten im Anschluss in Auto- und Substratphosphorylierungsreaktionen auf ihren Einfluss auf die Aktivität der monomeren bzw. dimeren Kinase untersucht werden. Hierbei sollte vor allem der Mechanismus, die ATP-Abhängigkeit und die Spezifität der Inhibition charakterisiert werden.

4 Ergebnisse

4.1 Überblick über alle verwendeten Kinasekonstrukte

Im Laufe dieser Arbeit wurden verschiedene Kinasekonstrukte verwendet. Für die kinetischen Untersuchungen zur Charakterisierung der inhibitorischen Peptide wurde hauptsächlich die C-terminal deletierte, lösliche, zytoplasmatische Domäne des IGF-1R verwendet. Im C-Terminus des Rezeptors sind sowohl regulatorische Regionen als auch Dimerisierungsdomänen lokalisiert. Um Interaktionen der Peptide mit diesem Bereich ausschließen zu können, wurde er deletiert. Die Kinase umfasst die Aminosäuresequenz des zytosolischen Bereichs von R930 bis K1256. Die C-terminal deletierte Kinase des IGF-1R wurde im Zuge dieser Arbeit als Monomer sowie als GST-getagtes Dimer kloniert (7.1.1) und gereinigt (7.3.4). Eine schematische Darstellung dieser Kinasekonstrukte im Vergleich zum Rezeptor ist in Abbildung 4.1.1 dargestellt. GST-Fusionsproteine sind nicht-kovalente stabile Dimere, die sich während der Proteinsynthese formen. Die über GST-dimerisierten Kinasen sind ein Modell für den aktivierten Rezeptor, ohne dass es *per se* einer Phosphorylierung in der Aktivierungsschleife bedarf. Sie weisen die aktive, offene Struktur der Aktivierungsschleife auf⁴¹. Ein zusätzlicher Vorteil des GST-Tags ist, dass die Fusionsproteine besser expremiert werden und sich sehr einfach über Affinitätschromatographie reinigen lassen. Für die Kreuzmutationsexperimente wurden außerdem zwei Mutanten der GST-getagten, C-terminal deletierten, löslichen zytoplasmatischen Domäne des IGF-1R verwendet. Zum einen wurde eine Einzelmutante mit dem Austausch des Glutamats (E) 1069 der *hinge region* zu Lysin (K) generiert. Zum anderen wurde eine Doppelmutante mit dem zusätzlichen Austausch an der Stelle E1067 zu K generiert. Die Generierung der DNA der Mutanten wird im Methodenteil beschrieben (7.1.2). Alle Kinasekonstrukte wurden in *Sf9*-Zellen expremiert (7.3.1). Die GST-getagten Kinasen wurden über eine Kombination aus Glutathion-Sepharose-Affinitätschromatographie (7.3.4.1) und Anionen-Austauscher-Chromatographie (7.3.4.3) zu nahezu 100 % rein erhalten. Ein typischer Reinigungsverlauf ist am Beispiel der GST-IGFΔC im Anhang dargestellt (Abb. 9.1.1, S. 166). Die gereinigten Kinasen GST-IGFΔC, GST-IGFΔC-E1069K und GST-IGFΔC-E1067/1069K konnten mit einem gegen die Kinasedomäne gerichteten Antikörper (α -Exon 20) nachgewiesen werden. Aus $5-6 \times 10^8$ Zellen konnten 4-5 mg Kinase isoliert werden. Die

monomere IGF Δ C wurde aus einer Kombination aus Anionen-Austauscher-Chromatographie und Gelfiltrationschromatographie (7.3.4.4) gereinigt. Aus 10-12 x 10⁸ Zellen wurden so c.a. 3,5 mg der zu nahezu 100 % reinen, monomeren Kinase erhalten und mit α -Exon 20 nachgewiesen. Der Reinigungsverlauf der monomeren IGF Δ C ist im Anhang abgebildet (Abb. 9.2.1, S. 167).

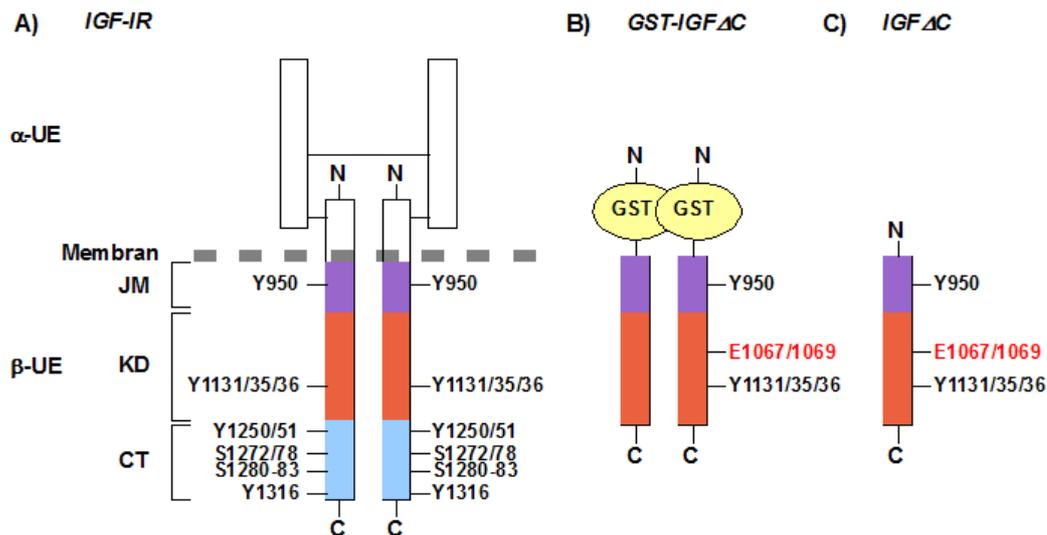


Abbildung 4.1.1: Schematische Darstellung des IGF-1R und der verwendeten Kinasekonstrukte.

A: Schematische Darstellung des dimeren ($\alpha\beta$)₂ IGF-1R. Die extrazelluläre (α -UE) und intrazelluläre Untereinheit (β -UE) sind angegeben. Die Juxtamembrandomäne (JM), katalytische Domäne (KD) und C-terminale Domäne (CT) sind farblich hervorgehoben. Tyrosin- und Serinautophosphorylierungsstellen sind angezeigt. **B:** Schematische Darstellung der über GST dimerisierten C-terminal verkürzten, löslichen Kinasedomäne des IGF-1R (GST-IGF Δ C). Die Juxtamembrandomäne und katalytische Domäne sind farblich hervorgehoben. Neben den Autophosphorylierungsstellen sind auch die Glutamatreste der *hinge region* angezeigt (rot). **C:** Schematische Darstellung der monomeren, C-terminal verkürzten, löslichen Kinasedomäne des IGF-1R (IGF Δ C). Die Juxtamembrandomäne und katalytische Domäne sind farblich hervorgehoben. Neben den Autophosphorylierungsstellen sind auch die Glutamatreste der *hinge region* angezeigt (rot).

Für die PTB-Phosphorylierung wurde eine Mutante der IGF-1R-Kinase verwendet, bei der die Tyrosinautophosphorylierungsstelle Y950 der Juxtamembrandomäne zu Phenylalanin (F) mutiert wurde. Die GST-TS-IGF Δ C-Y950F verfügt über den zytosolischen Bereich der IGF-1R-Kinase von R930 bis K1256 und über eine Erkennungssequenz für die TEV-Protease im Linker zwischen GST und der Kinasesequenz. Auch bei diesem Konstrukt ist der C-Terminus deletiert. Y950 der Juxtamembrandomäne ist eine PTB-Bindestelle. Die Substitution dieses

Restes zu F führt dazu, dass die PTB nicht mehr an die Kinase binden kann und dadurch nicht mehr phosphoryliert wird¹²⁶. Diese Kinase wurde expremiert, mittels Glutathion-Sephrose-Affinitätschromatographie gereinigt und anschließend monomerisiert (7.3.7.2). Die Dokumentation der Reinigung ist im Anhang gezeigt (Kap. 9.5, S. 169). Des Weiteren wurde noch eine katalytisch inaktive Kinasemutante des IR verwendet. Diese Mutante beinhaltet den zytosolischen Bereich des IR von R942 bis S1343, besitzt einen N-terminalen GST-Tag und einen C-terminalen His-Tag. Zusätzlich ist die katalytische Base Aspartat (D) 1120 zu Alanin (A) mutiert, so dass die für die Katalyse essentielle Koordination des Kofaktors Mg^{2+} nicht gegeben ist, was zu einem Verlust der Transferaseaktivität führt (GST-IRKD-D1120A-His). Die katalytisch inaktive Kinase stellt ein sehr gutes Substrat für die aktive Kinase des IR bzw. IGF-R dar. Diese Kinase wurde expremiert, über Glutathion-Sephrose-Affinitätschromatographie gereinigt und über protolytischen Verdau mit Thrombin monomerisiert (7.3.7.1). Die Dokumentation ist im Anhang gezeigt (Kap. 9.5, S. 169). Für die Untersuchungen zur Spezifität der Peptide wurden die monomeren Kinasen des EGFR (intrazelluläre Domäne von R647 bis A1186), des TrkB-R (intrazelluläre Domäne von G434 bis G790) sowie die monomere, C-terminal deletierte Kinase des IR (intrazelluläre Domäne von K942 bis K1271) verwendet. Die Kinasen des EGFR und TrkB-R lagen als monomere, C-terminal His-getagte Proteine (EGF-His und TrkB-His) vor und wurden von mir expremiert und über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Dokumentation einer solchen Reinigung ist im Anhang exemplarisch am Beispiel der EGF-His gezeigt (Abb. 9.3.1, S. 168). Die monomere, C-terminal deletierte Kinase des IR (IR Δ C) besitzt keinen Tag. Sie lag bereits über Anionen-Austauscher gereinigt vor. Außerdem wurde die Kinasedomäne der zytosolischen Ser/Thr-Kinase Akt untersucht. Hier wurde die GST-getagte, um die PH-domäne deletierte und mittels Okkadeinsäure aktivierte Akt-Kinase (GST-Akt: intrazelluläre Domäne von P119 bis E481) verwendet, welche bereits über Glutathion-Sephrose-Affinitätschromatographie gereinigt vorlag.

4.2 Überblick über alle in der Arbeit verwendeten Zielproteine und Substrate

Im Laufe der Arbeit sollten mittels *Phage Display* Peptide gefunden werden, die an den Juxtamembranbereich des IR und des IGF-1R binden. Als Zielproteine wurden die GST-getagten Juxtamembrandomänen beider Rezeptoren verwendet (GST-IGF-NT bzw. GST-IR-

NT). Beide Proteine lagen bereits in der Arbeitsgruppe vor¹²⁵. Beide Proteine wurden in *E.coli* BL21 Zellen expremiert (7.3.2). Die Reinigung erfolgte wie unter 7.3.4.1 beschrieben über die Glutathion-Sepharose-Affinitätschromatographie. Eine Dokumentation der Glutathion-Sepharose-Reinigung dieser Proteine ist im Anhang (Abb. 9.7.1, S. 170) am Beispiel des GST-IGF-NT dargestellt. Die Proteine konnten in einer Reinheit von über 95 % isoliert werden. Aus einem Liter Kulturvolumen ließen sich etwa 4 mg Protein aufreinigen.

Für die Substratphosphorylierungen durch die Kinasen des IGF-1R, des IR und des TrkB-R wurde Tyrtide (*tyrosine phosphorylatable peptide*) als Substrat verwendet. Tyrtide ist ein 85 Aminosäuren großes Fragment des physiologischen Substrates IRS-1, das über die Aminosäuresequenz M515 bis D631 verfügt. Es enthält eine Phosphorylierungsstelle für die IGF-Kinase, die in einem YMXM-Motiv vorliegt. Eine Phosphorylierung von Tyrtide an diesem Rest führt zu einem elektrophoretischen Mobilitätsshift, so dass das phosphorylierte Protein vom unphosphorylierten Protein eindeutig unterschieden werden kann. In Abbildung 4.2.1 ist eine schematische Darstellung dieses Substrats gezeigt.

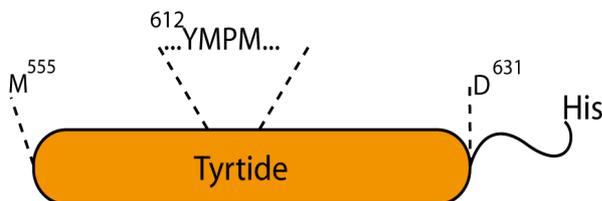


Abbildung 4.2.1: Schematische Darstellung des Substrats Tyrtide.

Tyrtide ist ein Fragment des physiologischen Substrats IRS-1 des IGF-1R. Es umfasst die Aminosäuresequenz M555 bis D631, eine Teilsequenz der mittleren Domäne des IRS-1. Die Sequenz verfügt über ein Tyrosin in einem MXM-Motiv, das von Tyrosinkinasen phosphoryliert wird. C-terminal besitzt das Konstrukt einen His-Tag.

Die DNA von Tyrtide lag im Pet21a(+)-Vektor vor, der einen C-terminalen His-Tag vermittelt. Die Expression erfolgte im Bakterienstamm B121DE3 (7.3.2). Die Reinigung erfolgte über die Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie (7.3.4.2). Eine Dokumentation der Tyrtide-Reinigung ist im Anhang (Abb. 9.7.2, S. 170) gezeigt. Aus einem Liter Kulturvolumen ließen sich etwa 10 mg Protein zu nahezu 100 % rein isolieren.

Als ein physiologisches, bindendes Substrat wurde für die Kinase des IGF-1R ein Konstrukt der PTB-Domäne des IRS-1 verwendet. Dieses Konstrukt umfasst die PTB-Domäne von P158 bis R370 mit einem N-terminalen GST-Tag (GST-PTB₃₇₀). Die PTB Domäne ist eine

phosphotyrosin-bindende Domäne des natürlichen Substrats IRS-1. Sie ist notwendig für die Interaktion zwischen IRS-1 und dem IGF-1R¹²⁶. Das Substrat GST-PTB₃₇₀ wurde mir affinitäts-gereinigt und in einer Reinheit von etwa 95 % zur Verfügung gestellt.

Tyrtide stellt kein gutes Substrat für die Kinase des EGFR dar. Aufgrund dessen wurde für die Phosphorylierung dieser Kinase das Protein GST-Gab1 verwendet. Bei GST-Gab1 handelt es sich um ein 59,8 kDa großes Fragment des humanen Gab1. Gab1 gehört zur Familie der IRS-1. GST-Gab (Aminosäuresequenz G223-K525) beinhaltet diese Domäne und somit eine Tyrosinphosphorylierungsstelle (Y447), welche durch die Kinase des EGFR phosphoryliert wird. Das Substrat GST-Gab1 wurde mir affinitäts-gereinigt und in einer Reinheit von etwa 80 % zur Verfügung gestellt.

4.3 Generierung der Peptide

Die Peptide α D-Peptid, α D-Mutante IGF-NT K1 sowie IGF-NT K3 wurden kommerziell von der Firma Coring System Diagnostix GmbH bezogen, die die Peptide über chemische Synthese erzeugt haben. Zur Kontrolle wurde ein Peptid mit randomisierter Sequenz verwendet, das in unsere Arbeitsgruppe schon als Kontrollpeptid in Phosphorylierungsassays verwendet wurde. Als Reinheitsgrad wurde „crude“ gewählt, was einer Reinheit von über 50 % entspricht. Zusätzlich wurden die Peptide über die *Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC) gereinigt (Kap. 7.3.4.5). Im Anhang (Abb. 9.9.2, S. 171) ist beispielhaft das Chromatogramm der Reinigung des Peptids IGF-NT K3 dargestellt. Die Peptidkonzentration wurde mittels Absorptionsspektroskopie ermittelt (Kap. 7.3.16.7). Über die chemische Synthese wurden auf Grund der hohen Kosten nur geringe Mengen der Peptide bezogen. Um die aus dem *Phage Display* erhaltenen Peptide im großen Maßstab generieren zu können, sollten sie in *E.coli* überexprimiert werden. Da kleine Peptide in Bakterien abgebaut werden, wurde das Peptid an ein größeres, gut exprimierbares Protein angehängt. Dazu wurde zunächst ein Expressionsvektor generiert (s. Kap. 7.1.3). Dieser vermittelt einen N-terminalen His-Tag, was eine Affinitäts-Chromatographie des Fusionspeptids ermöglicht. Zwischen dem „Carrier“-Protein und dem Peptid ist eine Erkennungssequenz für die TEV-lokalisiert, so dass das Peptid nach der Reinigung einfach von dem „Carrier“-Protein abgeschnitten werden kann. Da sich Tyrtide als ein sehr gut exprimierbares Protein erwiesen hat, wurde dieses als „Carrier“ verwendet. Tyrtide und die TEV-Protease besitzen N-terminal

einen His-Tag, so dass sie über eine Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie nach dem proteolytischen Verdau von dem Peptid abgetrennt werden können. Der Expressionsvektor vermittelt C-terminal die Sequenz HCQRE, die ein reaktives Cystein enthält. Der pK-Wert dieses Cysteins liegt bei etwa 5, so dass das Cystein mit einer Maleinimidgruppe verknüpft werden kann. So können die Peptide mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert (gelabelt) werden.. Eine schematische Darstellung dieses Konstruktes ist in Abbildung 4.3.1 gezeigt. Die Peptide konnten über einen Oligonucleotid-Linker in den Vektor eingebracht werden (7.1.4). Die erhaltene Plasmide wurde mittels DNA-Sequenzierung überprüft.

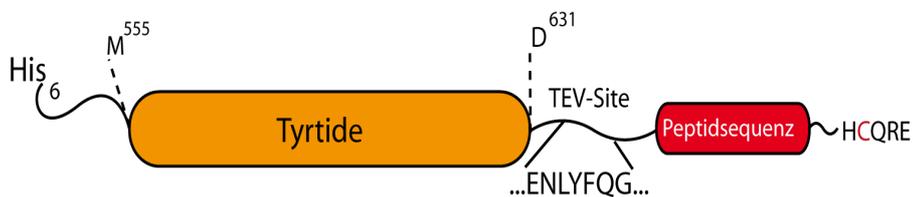


Abbildung 4.3.1: Schematische Darstellung der Fusionspeptide.

Die Konstrukte besitzen einen N-terminalen His-Tag auf den die Tyrtide-Sequenz (M555-D631) folgt. Zwischen Tyrtide und der Peptidsequenz liegt der Linker mit der TEV-Protease Erkennungssequenz. C-terminal zu der Peptidsequenz liegt die Sequenz HCQRE mit dem reaktive Cystein (in rot hervorgehoben).

4.3.1 Expression, Reinigung und Markierung der Fusionspeptide

Die Expression der Fusionspeptide erfolgte in *E.coli* BL21-DE3-Zellen (7.3.2). Die in unserer Arbeitsgruppe etablierte Methode für den Zellaufschluss lieferte keine guten Ausbeuten, ein Großteil des Fusionspeptids verblieb im Pellet, so dass die Methode optimiert werden musste (7.3.3.2). Dem Lysispuffer wurden 1% Triton-X-100 zugesetzt. Außerdem wurde insgesamt dreimal lysiert. Die Lysate wurden vereinigt und über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie (7.3.4.2) gereinigt. Um markierte Fusionspeptide zu erhalten, wurde das auf der Nickel-Chelat-Matrix immobilisierte Protein mit Tetramethylrhodamin-5-maleimid gelabelt. Der Farbstoff wird via Michael Addition an das C-terminale, reaktive Cystein angelagert. Anschließend wurde das Protein über eine Standard Nickel-Chelat-Affinitäts-Chromatographie gereinigt. Die hoch konzentrierten Eluate wurden vereinigt und gegen 10 mM Tris, 2 mM MgCl₂ pH 8 dialysiert. Die Addition von MgCl₂ führte zu einer Stabilisierung der ansonsten sehr labilen Peptide. Eine SDS-PAGE zur Reinigungsdokumentation ist Abbildung 4.3.2 am Beispiel von His-Tyrtide-TS-IGF-NTK1-

Cys exemplarisch gezeigt. Der Farbstoff wird bei 543 nm angeregt und emittiert bei 575 nm, so dass markierte Proteine im SDS-Gel unter der UV-Lampe betrachtet und ausgewertet werden können (Abb. 4.3.2B). Eine Einfärbung der Proteinbanden in Peptidfärbelösung ist ebenfalls möglich (Abb. 4.3.2A).

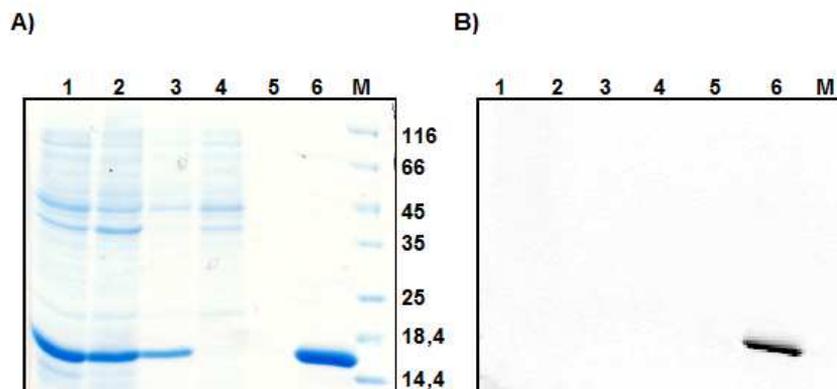


Abbildung 4.3.2: Dokumentation der Reinigung und Markierung im präparativen Maßstab von His-Tyrtide-TS-IGF-NT-K1-Cys

15 % SDS-PAGE zur Dokumentation der präparativen Markierung des His-Tyrtide-TS-IGF-NT-K1-Cys und der Reinigung über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie.

A: Gel gefärbt in Peptidfärbelösung. **B:** Gel unter UV. Es werden nur die markierten Proteine sichtbar.

Aufgetragen wurden: **M:** Protein Molecular Weight Marker; **1:** 1. Rohlysat; **2:** 2. Rohlysat; **3:** 3. Rohlysat; **4:** Durchlauf der Nickel-Chelat-Matrix, **5:** Waschschrift; **6:** Probe der vereinigten Eluate der Nickel-Chelat-Matrix. Das Fusionspeptid läuft in der 15 % SDS-PAGE bei ca. 16 kDa.

Aufgetragen wurden die drei Lysate, Proben des Durchlaufs, dem Waschschrift und der vereinigten, markierten Eluate. Das Fusionspeptid hat eine errechnete Molekularmasse von 12,9 kDa, retardiert in der 15 % SDS PAGE aber apparent bei etwa 16 kDa . Es ist deutlich zu erkennen, dass durch das mehrmalige Lysieren ein Großteil an dem gewünschten Fusionspeptid in Lösung gebracht werden konnte. Im dritten Lysat (Spur 3) ist allerdings deutlich weniger des gewünschten Fusionspeptids vorhanden, so dass auf ein weiteres Lysieren verzichtet wurde. Die Probe der vereinigten Eluate (Spur 6) enthält zu mehr als 90 % das gewünschte Fusionspeptid, es sind nur wenig Verunreinigungen zu erkennen. Da die Fusionsproteine im Anschluss gespalten und darauf folgend erneut gereinigt wurden, konnte an dieser Stelle auf eine weitere Aufreinigung verzichtet werden. Die Dokumentation des Reinigungsgels unter UV zeigt, dass die präparative Markierung erfolgreich war. Insgesamt wurden aus einem Liter Kulturvolumen etwa 8-10 mg Protein isoliert. Einzig das

Fusionspeptid His-Tyrtide- α D-Peptid K2-Cys wurde in geringeren Mengen isoliert. Dieses Peptid erwies sich als instabil und konnte nur in Konzentrationen von maximal 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ gelagert werden. Insgesamt wurden hier aus einem Liter etwa 5 mg Protein isoliert.

4.3.2 Proteolytischer Verdau zur Generierung der Peptide

Die Fusionspeptide weisen eine Erkennungssequenz für die TEV-Protease zwischen dem His-getagten Tyrtide und der Peptidsequenz auf. Die TEV-Protease selbst besitzt ebenfalls einen His-Tag. So können über eine Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie die TEV-Protease, das ungeschnittene Fusionspeptid sowie abgespaltenes Tyrtide vom gewünschten Peptid abgetrennt.

Als optimale Bedingungen für den proteolytischen Verdau der Fusionspeptide wurde ein Protease- Kinase-Verhältnis von 1:75, sowie eine Spaltungsdauer von 3 h bei 4 °C ermittelt. Die markierten Fusionspeptide verhielten sich ähnlich wie die unmarkierten. Der Verdau wurde durch die Zugabe von dem Protease-Inhibitor-Cocktail *Complete* gestoppt. Zur Abtrennung der TEV-Protease, dem ungeschnittenen Fusionspeptid sowie abgespaltenem Tyrtide wurde der Spaltungsansatz über eine Nickel-Chelat-Matrix gegeben. Im Durchlauf befindet sich das abgespaltene Peptid. Da die Peptide eine Molekulare Masse von nur etwa 2,5 kDa aufwiesen, musste zur Dokumentation einer solchen Reinigung die Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophorese nach Schägger und Jagow¹²⁷ (Shägger Gel; 7.3.10.4) verwendet werden. Das Schägger Gel ermöglicht eine bessere Auftrennung im niedermolekularen Bereich. In Abbildung 4.3.3 ist die Dokumentation zur Gewinnung des gelabelten Peptids IGF-NT-K1-Cys exemplarisch dargestellt, in A das Gel in Peptidfärbelösung gefärbt, in B das Gel unter UV. Hier werden nur gelabelte Peptide sichtbar. Das schließt das ungespaltene Fusionspeptid und das gespaltene Peptid, nicht aber Tyrtide mit ein. Aufgetragen wurden das unverdaute Fusionspeptid (Spur 1), der Spaltungsansatz nach 3 h (Spur 2), der Durchlauf der Nickel-Chelat-Matrix (Spur 3) sowie ein Waschschrift der Nickel-Chelat-Matrix mit 25 mM Imidazol (Spur 3). Die Probe des Spaltungsansatz nach drei Stunden zeigt, dass der Verdau nahezu komplett war. In den Proben des Durchlaufs und des Waschschrifts ist nur das gespaltene Peptid vorhanden. Das ungespaltene Fusionspeptid hat eine errechnete Molekularmasse von 12,9 kDa, Tyrtide eine von 9,4 kDa und das gespaltene IGF-NT-K1-Cys eine von 2,5 kDa.

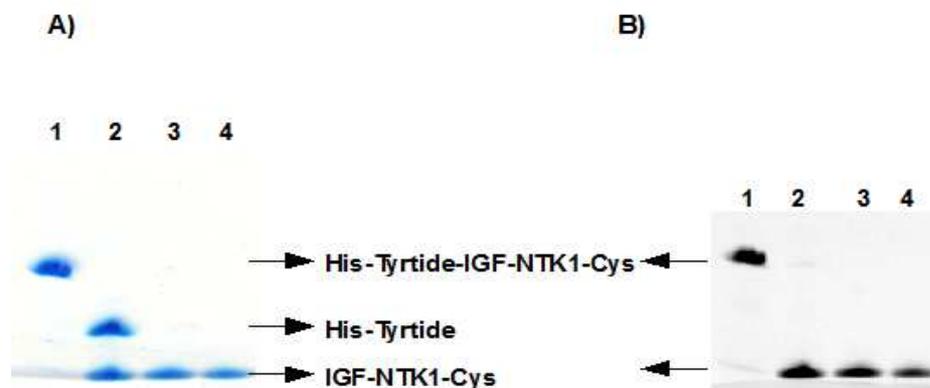


Abbildung 4.3.3: Generierung des Peptids IGF-NT-K1-Cys mittels Proteolyse

Schägger-Gel zur Dokumentation des proteolytischen Verdau von markiertem His-Tyrtide-IGF-NTK1-Cys durch die TEV-Protease und Aufreinigung des abgespaltenen Peptids über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie. **A:** Gel gefärbt in Peptidfärbelösung. **B:** Gel unter UV: Hier werden nur die markierten Proteine sichtbar.

Aufgetragen wurden: **1:** ungespaltenes His-Tyrtide-IGF-NTK1-Cys; **2:** Verdau nach 3 h **3:** Durchlauf der Nickel-Chelat-Matrix; **4:** Waschschrift der Nickel-Chelat-Matrix mit 25 mM Imidazol. Das ungespaltene Fusionspeptid hat eine errechnete Molekularmasse von 12,9 kDa, Tyrtide eine von 9,4 kDa und das gespaltene IGF-NT-K1-Cys eine von 2,5 kDa.

Die Peptidkonzentration wurde mittels Absorptionsspektroskopie ermittelt. Da es innerhalb der Sequenz des Peptids IGF-NT K3 drei Histidinreste gibt, wurde selbst durch den Waschschrift mit 25 mM Imidazol nicht alles Peptid von der Säule eluiert. Um das Peptid nicht mit Tyrtide oder TEV-Protease zu verunreinigen, konnte die Imidazolkonzentration im Waschschrift nicht weiter erhöht werden. Daher wurden hier der Verlust an Peptid in Kauf genommen um dieses in hoher Reinheit zu erhalten.

Als ein großes Problem hat sich die Anfärbung der Peptide herausgestellt. Die Peptide α D-Peptid-K2-Cys und α D-Peptid-K3-Cys ließen sich auf Grund ihrer Aminosäurezusammensetzung nicht durch die kolloidale Peptidfärbelösung detektieren. Um die Reinheit der unmarkierten Peptide dokumentieren zu können, war es notwendig, sie im Schägger-Gel sichtbar zu machen. Dazu wurden mehrere Färbemethoden getestet (7.3.13). Weder die Silberfärbung noch die Eosinfärbung führten zu einem Erfolg. Nur mittels Fluoreszenzfärbung mit Fluorescamin konnten die ungelabelten, gespaltenen Peptide in den Gelen nachgewiesen werden. Die Fluoreszenzmarkierung durch Fluorescamin erfolgt vor der

Elektrophorese. Der Farbstoff wird an freie Aminogruppen, α -Aminogruppe des NT und ϵ -Aminogruppe von Lysin, addiert. Die Empfindlichkeit hängt von der Anzahl vorhandener Aminogruppen ab. Ein Schägger Gel zur Dokumentation der Generierung von α D-Peptid-K3-Cys ist im Anhang abgebildet (Abb. 9.9.1, S. 171). Auch für diese Peptide konnte eine Reinheit von nahezu 100 % nachgewiesen werden.

4.4 Charakterisierung der GST-Kinasen

4.4.1 Aktivitätstest auf der nativen PAGE

Um die Kinasen GST-IGF Δ C, GST-IGF Δ C-E1069K und GST-IGF Δ C-E1067/1069K in den Kreuzmutationsexperimenten vergleichen zu können, musste gewährleistet werden, dass die Mutanten die Substitution der Reste E1067 und E1069 in der hinge region ohne Aktivitätsverlust tolerieren. Für eine einfache und schnelle Quantifizierung der Aktivität der GST-Kinasen eignet sich besonders die Substratphosphorylierung von Tyrtide-His mit Dokumentation auf der nicht denaturierenden (native) PAGE. Tyrtide wird nur an einem Tyrosinrest phosphoryliert. Auf Grund des entstehenden Ladungsunterschieds zwischen unphosphoryliertem und phosphoryliertem Tyrtide erfolgt eine Auftrennung in der nativen PAGE, da Phosphatgruppen bei basischem pH dianionisch vorliegen.

Es wurden 100 μ M Tyrtide durch jeweils 0,5 μ M der jeweiligen dimeren Kinase unter Standardbedingung (1mM ATP, 30 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 50 mM Tris pH 7,5, Raumtemperatur) zeitabhängig phosphoryliert. Zu den Zeitpunkten 1, 2, 4 und 8 min wurde eine Probe entnommen und die Reaktion durch Zugabe von nativen Probenpuffer abgestoppt. Im Anschluss wurden die Proben auf eine nativen PAGE elektrophoretisch aufgetrennt (7.3.10.5). Zusätzlich wurde unphosphoryliertes Tyrtide aufgetragen (4.4.1). Es wird deutlich, dass alle drei Kinasen eine ähnliche Aktivität aufweisen, wobei der Wildtyp etwas schneller zu sein scheint. Bei der GST-IGF Δ C scheint schon nach 4 min das gesamte Substrat umgesetzt worden zu sein. Die beiden Mutanten wird erst nach 8 min ein vollständiger Umsatz detektiert. Die PAGE bestätigt außerdem, dass das Substrat nur eine Phosphorylierungsstelle für die Kinase des IGF-1R aufweist.

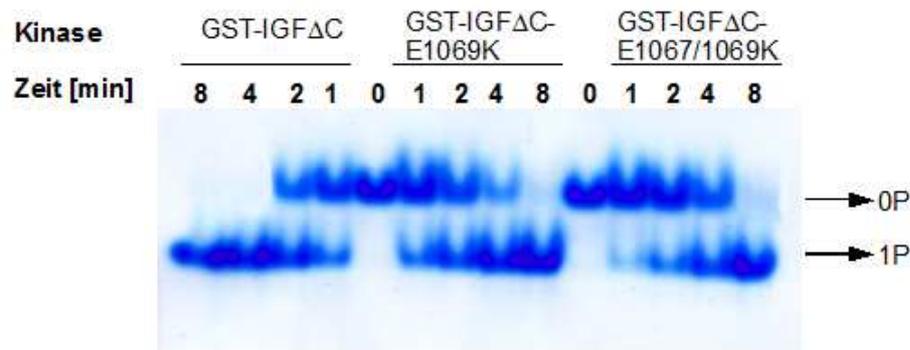


Abbildung 4.4.1: Native PAGE der Tyrtide-Phosphorylierung der dimeren Kinasen

100 μ M Tyrtide wurden durch jeweils 0,5 μ M der dimeren GST-IGF Δ C, GST-IGF Δ C-E1069K und GST-IGF Δ C-E1067/1069K unter Standardbedingung zeitabhängig phosphoryliert. Die Proben der Zeitwerte 0, 1, 2, 4, und 8 min wurden auf einer 8,5 % Nativen PAGE aufgetrennt. Auf Grund der höheren Ladung legt das phosphorylierte Tyrtide eine größere Laufstrecke im elektrischen Feld zurück. Pfeile markieren die Phosphorylierungsstufen des Substrats.

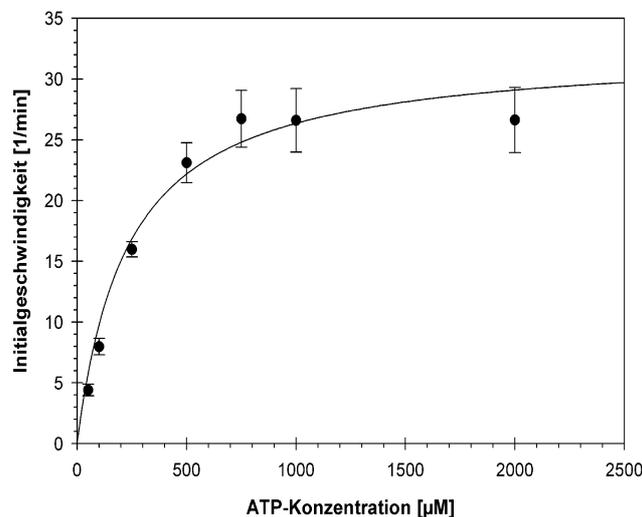
4.4.2 Bestimmung der kinetischen Daten für die Substratphosphorylierung

Für eine quantitative Analyse der Substratphosphorylierung der dimeren Kinasen wurden Michaelis-Menten Kurven aufgenommen, um die ATP-Affinität und die katalytische Effizienz zu bestimmen. Hierzu wurde ein gekoppelter Enzymassay durchgeführt. Diese Methode koppelt eine optisch inaktive Reaktion, den ATP-Umsatz, an eine optisch aktive Reaktion, den Verbrauch von NADH (7.3.16.5). Alle Messungen wurden in Anwesenheit von einem Überschuss an Tyrtide durchgeführt. Dadurch wird die Autophosphorylierung zu einem großen Teil gehemmt, es kann spektroskopisch die Substratphosphorylierung detektiert werden¹²⁸.

Zur Bestimmung des K_M für ATP sowie k_{cat} wurden 200 μ M Tyrtide durch 0,2 μ M Kinase in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration im gekoppelten Assay phosphoryliert. Für jede ATP-Konzentration wurde die Umsatzkurve, Abnahme der OD mit der Zeit, aufgenommen. Aus der Umsatzkurve wurde die Initialgeschwindigkeit bestimmt. Die Auftragung der Initialgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration ergibt die Michaelis-Menten Kurve (Abb. 4.4.2A). Auffallend war, dass die Initialgeschwindigkeiten oberhalb einer ATP-Konzentration von 5 mM wieder ab fielen. Für die Bestimmung der K_M - und k_{cat} -Werte wurden aus diesen Gründen nur die Initialgeschwindigkeiten bis zu einer ATP-

Konzentration von 5 mM berücksichtigt. Die ermittelten kinetischen Daten sind in Abbildung 4.4.2.B aufgelistet. Die Werte entsprechen dem arithmetischen Mittelwert mehrerer Messungen. Der angegebene Fehler entspricht der Standardabweichung. Es gibt nur kleine Unterschiede in den K_M - und k_{cat} -Werten zwischen den unterschiedlichen Kinasekonstrukten. Die Mutationen führen zu keinen Einschränkungen der Kinase in Bezug auf das Kosubstrat ATP. In Abbildung 4.4.2.A ist eine Michaelis-Menten Kurve am Beispiel der GST-IGFΔC exemplarisch dargestellt. Michaelis-Menten Kurven der Mutanten sind im Anhang (Abb. 9.10.1, S. 172) abgebildet.

A)



B)

	K_M [μM]	k_{cat} [s^{-1}]
GST-IGFΔC	247,84 +/- 59,02	0,62 +/- 0,07
GST-IGFΔC-E1069K	415,30 +/- 24,03	0,71 +/- 0,05
GST-IGFΔC-E1067/1069K	359,98 +/- 23,59	0,69 +/- 0,10

Abbildung 4.4.2: Bestimmung der kinetischen Daten für die ATP-abhängige Substratphosphorylierung der dimeren Kinasen.

A: Michaelis-Menten Kurve der ATP-abhängigen Substratphosphorylierung der dimeren GST-IGFΔC. Zur Ermittlung der kinetischen Daten wurde ein gekoppelter Assay durchgeführt. Es wurden 0,2 μM GST-IGFΔC und 200 μM Tyrtide verwendet. Aus dem hyperbolischen Fit wurde ein K_M für ATP von 232,21 μM und ein k_{cat} von 0,45 s^{-1} erhalten. **B:** Tabelle zum Vergleich der kinetischen Parameter der ATP-anhängigen Substratphosphorylierung der dimeren Kinasen. Die Werte entsprechen dem arithmetischen Mittelwert mehrerer Messungen. Der angegebene Fehler entspricht der Standardabweichung.

4.5 Charakterisierung der monomeren Kinase

4.5.1 Autophosphorylierung auf der nativen PAGE

Um zunächst eine Aussage über die Aktivität der monomeren Kinase IGF Δ C treffen zu können, wurde die Autophosphorylierung auf der nativen PAGE untersucht. Ähnlich wie beim Tyrtide können die unterschiedlichen Phosphorylierungsstufen auf Grund der entstehenden Ladungsunterschiede aufgetrennt werden.

Die Kinase wurde in einer Konzentration von 5 μ M mit 1 mM ATP unter Standardbedingungen zeitabhängig phosphoryliert. Durch Zugabe von nativem Probenpuffer wurde die Reaktion abgestoppt. Proben der Zeitwerte, sowie eine Probe der unphosphorylierten Kinase wurden auf einer nativen PAGE aufgetrennt (Abb.4.5.1). Das Gel zeigt, dass nach einer Minute schon 2 Phosphorylierungsstufen erreicht werden, die vierte deutet sich an. Nach 2 Minuten liegt kein unphosphoryliertes Protein mehr vor, es werden vier Phosphorylierungsstufen erreicht. Nach 3 Minuten deutet sich schon eine fünfte Phosphorylierungsstufe an. Nach 16 min liegt das Protein hauptsächlich vierfach- bzw. fünffach phosphoryliert vor. Somit konnte gezeigt werden, dass die Kinase aktiv war und über fünf Phosphorylierungsstellen verfügt.

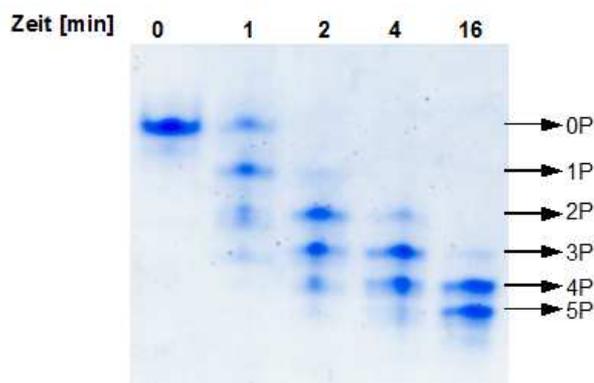


Abbildung 4.5.1: Native PAGE der Autophosphorylierung der monomeren IGF Δ C.

5 μ M monomere Kinase wurden einer zeitabhängigen Autophosphorylierung unter Standardbedingung unterzogen. Die Proben der Zeitwerte 0, 1, 2, 4, und 16 min wurden auf einer 8,5 % Nativen PAGE aufgetrennt. Je höher der Phosphorylierungsgrad der Kinase, desto größer ist die Laufstrecke, die sie im elektrischen Feld zurücklegt. Pfeile markieren die Phosphorylierungsstufen der Kinase.

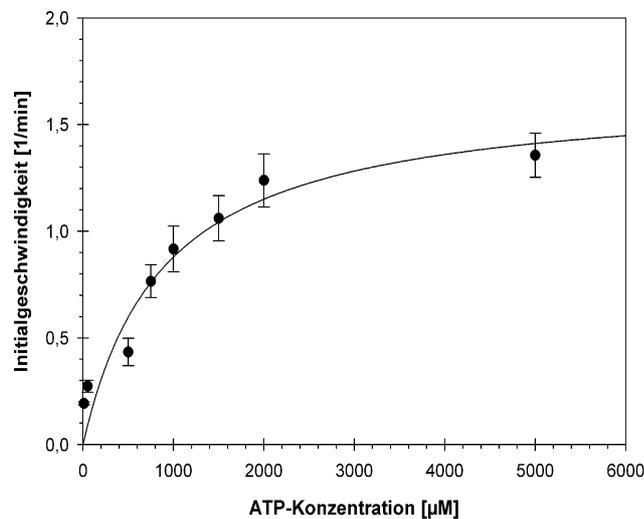
4.5.2 Bestimmung der kinetischen Daten für die Substratphosphorylierung

Für eine quantitative Analyse der Substratphosphorylierung der monomeren IGF Δ C wurden Michaelis-Menten Kurven aufgenommen, um die ATP-Affinität und die katalytische Effizienz

zu bestimmen. Hierzu wurde ein gekoppelter Assay, sowie ein radioaktiver Assay durchgeführt.

Zur Bestimmung des K_M für ATP sowie k_{cat} wurden 200 μM Tyrtide durch 1 μM IGF Δ C in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration im gekoppelten Assay phosphoryliert. Für jede ATP-Konzentration wurde die Umsatzkurve aufgenommen. Bei den Untersuchungen wurde beobachtet, dass diese einen mehrphasigen Verlauf zeigten, was auf eine Überlagerung mehrerer Prozesse hindeutet. Am Anfang zeichnete sich die Kurve durch eine kleine Steigung aus, die dann durch eine erheblich größere abgelöst wurde. Der Zeitpunkt an dem die Steigung wechselte, fand umso früher statt, je größer die ATP-Konzentration war. Da davon ausgegangen wurde, dass die erste Katalysephase die der unphosphorylierten Kinase entspricht, wurden für die Berechnung der Initialgeschwindigkeiten nur die Steigungen der ersten Katalysephase ausgewertet. Oberhalb einer ATP-Konzentration von 5 mM ATP war das nicht mehr möglich, da dann zu wenige Messpunkte für eine Bestimmung der Steigung zu Verfügung standen. Dennoch konnte mit den vorhandenen ATP-Konzentrationen eine Sättigung erreicht werden, so dass eine Bestimmung der kinetischen Daten möglich war. In Abbildung 4.6.1.A ist die Michaelis-Menten Kurve der ATP-abhängigen Substratphosphorylierung der monomeren Kinase dargestellt. Zum Vergleich wurden die kinetischen Daten noch über einen radioaktiven Assay ermittelt. Es wurden ebenfalls 200 μM Tyrtide durch 1 μM IGF Δ C phosphoryliert. Ausgewertet wurde der Versuch über den Paperassay (7.3.14.3). Die Umsatzkurven ergeben sich für die verschiedenen ATP-Konzentrationen aus dem Phosphattransfer auf das Substrat in Abhängigkeit von der Zeit. Aus den Umsatzkurven wurde die Initialgeschwindigkeit bestimmt und in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration ausgewertet. Die daraus resultierende Michaelis-Menten Kurve ist im Anhang (Abb. 9.12.1, S. 173) gezeigt. Auch bei dieser Methode traten die Probleme der zwei Steigungen auf, allerdings konnte hier schon bei ATP-Konzentrationen oberhalb von 2 mM keine Steigung mehr bestimmt werden. Die ermittelten kinetischen Daten beider Methoden sind in Abbildung 4.6.1.B aufgelistet. Die Werte entsprechen dem arithmetischen Mittelwert mehrerer Messungen. Der angegebene Fehler entspricht der Standardabweichung.

A)



B)

	K_M	k_{cat}
Radioaktive Substratphosphorylierung	873,87 +/- 89,02 µM	0,042 +/- 0,004 s ⁻¹
Gekoppelter Assay	801,02 +/- 85,92 µM	0,037 +/- 0,002 s ⁻¹

Abbildung 4.6.1: Bestimmung der kinetischen Daten für die Substratphosphorylierung der monomeren Kinase.

Michaelis-Menten Kurve der ATP-abhängigen Substratphosphorylierung der IGFAC. Zur Ermittlung der kinetischen Daten wurde ein gekoppelter Assay durchgeführt. Es wurden 1 µM GST-IGFAC und 200 µM Tyrtide verwendet. Aus dem hyperbolischen Fit wurde ein K_M für ATP von 891,77 µM und ein k_{cat} von 0,030 s⁻¹ erhalten. **B:** Tabelle zum Vergleich der kinetischen Parameter der ATP-anhängigen Substratphosphorylierung der monomeren Kinase ermittelt aus dem gekoppeltem Assay bzw. dem radioaktiven Assay. Die Werte entsprechen dem arithmetischen Mittelwert mehrerer Messungen. Der angegebene Fehler entspricht der Standardabweichung.

4.6 Kreuzmutationsexperimente

Das aus Vorarbeiten¹²⁵ stammende αD -Peptid der Sequenz $L^1KSYLRSLRPEAENN^{15}$ inhibiert die Auto- und Substratphosphorylierung der Kinase des IGF-1R. Auf Grund der Ergebnisse wurde angenommen, dass das αD -Peptid mit seinen beiden positiv geladenen Resten K^2 und R^6 an die beiden Glutamatreste (E1067 und E1069) der hinge region der Kinase bindet. Diese These sollte über Kreuzmutationsexperimente untermauert werden. Dazu wurden die beiden Glutamatreste gegen Lysin substituiert. Gleichzeitig wurden im Peptid die beiden positiven Reste K^2 und R^6 zu Glutamat mutiert (αD -Mutante). Über Phosphorylierungsassays der

Kinasevarianten sollte der Einfluss der Peptide auf die jeweilige Kinase charakterisiert werden. Im Falle einer Bindung des α D-Peptids an die hinge region wurde erwartet, dass das Peptid nicht mehr in der Lage ist, die Kinasevarianten zu inhibieren. Von der α D-Mutante sollte die Kinase-Doppelmutante hingegen inhibiert werden.

Die Kinasen GST-IGF Δ C, GST-IGF Δ C-E1069K, GST-IGF Δ C-E1067/1069K wurden in Anwesenheit des α D-Peptids, der α D-Mutante, des Kontrollpeptids und in Abwesenheit der Peptide einer zeitabhängigen Substratphosphorylierung mit radioaktiv markiertem γ^{32} P-ATP unterzogen. Die Phosphorylierungen fanden unter Standardbedingungen, mit einer spezifischen Radioaktivität von ca. 100-200 Cpm/pmol statt. Die Kinase wurde in einer Konzentration von 0,5 μ M eingesetzt, die Peptide in einen 50-fachen molaren Überschuss zur Kinase. Als Substrat wurden 25 μ M Tyrtide eingesetzt. Zu den entsprechenden Zeiten wurden den Ansätzen Proben entnommen und im SDS-Gel aufgetrennt. Die radioaktiven Substratbanden wurden ausgeschnitten, im Counter analysiert und graphisch ausgewertet. Hierzu wurde der Phosphateinbau in das Substrat Tyrtide pro Substratmenge im Slot bestimmt. Die graphische Auswertung ist in Abbildung 4.6.2 dargestellt. Unter A ist die Substratphosphorylierung der Wildtyp Kinase GST-IGF Δ C zu sehen. Das α D-Peptid hemmt die Wildtypkinase, die Initialgeschwindigkeit der Phosphorylierung und der Einbau wird herabgesetzt. Die α D-Mutante vermag die Autophosphorylierung der Wildtypkinase nur gering zu inhibieren. Die Einzelmutante GST-IGF Δ C-E1069K wird weder von dem α D-Peptid noch von der α D-Mutante inhibiert (Abb. 4.6.2.B). Die Autophosphorylierung der dimeren Doppelmutante GST-IGF Δ C-E1067/1069K wird von der α D-Mutante gehemmt (Abb. 4.6.2.C). Auch das α D-Peptid vermag den Phosphattransfer der Doppelmutante zu verringern, jedoch ist hier der inhibitorische Effekt nur marginal. Diese Ergebnisse belegen die ursprüngliche These, dass das α D-Peptid mit den beiden basischen Resten K² und R⁶ an die beiden Glutamatreste E1067 und E1069 der *hinge region* der Kinase bindet.

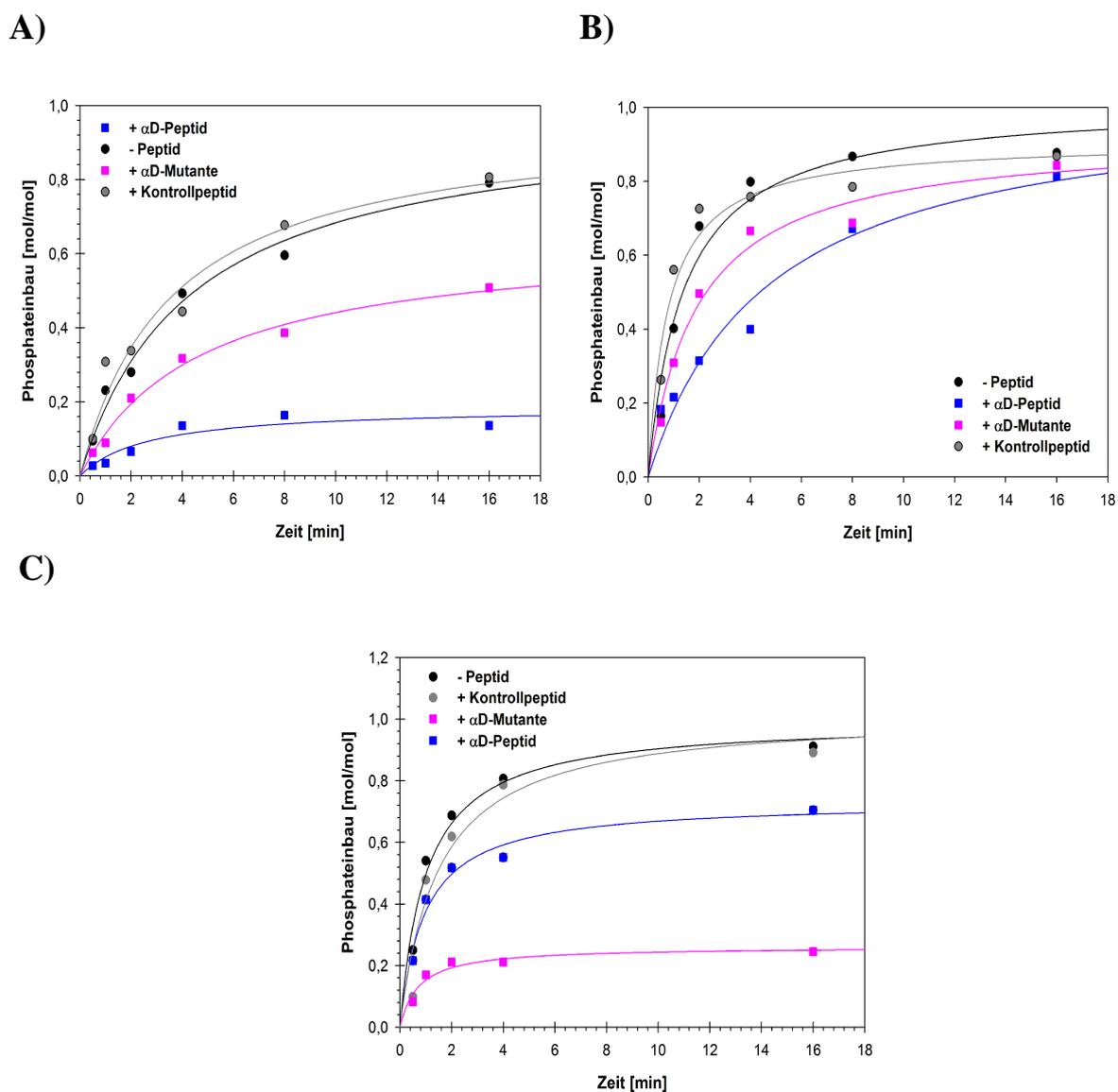


Abbildung 4.6.2: Kreuzmutationsexperiment:

Gezeigt ist die graphische Auswertung der Tyrtide-Phosphorylierung der dimeren Kinasen +/- Kontrollpeptid (grau), α D-Peptid (blau), α D-Mutante (rosa). 25 μ M Tyrtide wurden durch 0,5 μ M der jeweiligen dimeren Kinase +/- 25 μ M Peptid unter Verwendung von radioaktiv markierten γ^{32} P-ATP zeitabhängig phosphoryliert. Aufgetragen wurde der Phosphateinbau in das Substrat.

A: Phosphorylierung durch die GST-IGFΔC. **B:** Phosphorylierung durch die GST-IGFΔC-E1069K.

C: Phosphorylierung durch die GST-IGFΔC-E1067/1069K.

4.7 Phage Display

Mittels Phage Display sollten Peptidsequenzen selektioniert werden, die spezifisch gegen Dimerisierungsdomänen des IGF-1R binden und somit die Dimerisierung und damit Aktivierung der Kinase unterbinden können. Phage Display ist eine Methode, mit der aus einer nahezu unbeschränkten Anzahl an verschiedenen, randomisierten Peptiden solche heraus gefiltert werden, die spezifisch an ein bestimmtes Zielprotein binden. Als Zielproteine wurden hier zwei Bereiche des IGF-1R gewählt:

1. Juxtamembranbereich des IGF-1R:

Die Kinase des IGF-1R verfügt selbst über eine niederaffine, aber spezifische Dimerisierungsdomäne (vgl. Kap. 3.3.4.1) Unsere Arbeitsgruppe konnte über Limitierte Proteolyse mit Chymotrypsin zeigen, dass die Dimerisierungsdomäne im Juxtamembranbereich der Kinase lokalisiert ist (unveröffentlichte Ergebnisse). Neben der Dimerisierungsdomäne ist in der Juxtamembranregion ein autoregulatorischer Bereich lokalisiert (vgl. Kap. 3.3.3). Peptide, die in diesem Bereich binden, könnten die Kinaseregulation beeinflussen bzw. mit der Dimerisierung der Kinase interferieren. Ein Alignment der Aminosäuresequenz des N-terminalen Bereichs der Rezeptortyrosinkinasen IR und IGF-1R verdeutlicht, dass starke Sequenzunterschiede zwischen den beiden Rezeptoren existieren. Der IR besitzt ein Insert von fünf Aminosäuren. Die Sequenzunterschiede in diesem Bereich könnten zu sehr spezifisch bindenden Peptiden für die IGF-1R Kinase führen.

2. α D-Helix/hinge region des IGF-1R:

Die α D-Helix/hinge region bestimmt maßgeblich die Konformationsänderung zwischen inaktiver und aktiver Kinasekonformation und ist an der Dimerisierung der Kinase und der Substraterkennung beteiligt. Ein Peptid aus der Aminosäuresequenz dieser Region des IGF-1R, L¹KSYLRSLRPEAENN¹⁵, inhibiert die Auto- und Substratphosphorylierung der Kinase des IGF-1R¹²⁵. Mittels Kreuzmutationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass das Peptid im Bereich der α D-Helix/hinge region bindet. Mittels Phage Display gegen diesen Bereich sollte eine Optimierung der Bindung und Inhibition erfolgen.

Zur Selektion von Peptidsequenzen, die eine Bindung gegen Zielproteine aufweisen, wurden die Zielproteine in Mikrotiterplatte immobilisiert und mit Phagen aus der Bibliothek inkubiert (7.2). Als Phage wurde der M13 Phage verwendet. Es wurde eine 12mer Bibliothek verwendet, so dass der Phage Peptide aus 12 Aminosäuren auf seiner Oberfläche präsentiert. Die Bibliothek umfasst $1,9 \times 10^9$ individuelle Sequenzen. Die randomisierte Peptidsequenz wird expremiert zwischen der Signalsequenz und dem N-Terminus des Hüllproteins pIII. Somit ist die erste Position im präsentierten Fusionsprotein die erste Position der randomisierten Sequenz. Jedes präsentierte Peptid wird gefolgt von einem kleinen Linker (GGGS) und anschließend der Wildtyp pIII Sequenz.

4.7.1 Phage Display gegen die Juxtamembrandomäne

Zusätzlich zur Juxtamembrandomäne des IGF-1R wurde zum Vergleich als zweites Zielprotein die Juxtamembrandomäne des IR gewählt. Beide Proteine wurden als GST-getagte Fusionsproteine eingesetzt. Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass die Phagen nicht gegen GST binden und dass sich die Fusionsproteine gut zum Beschichten der Plastikoberfläche eignen¹²⁹. Zur Überprüfung des Selektionsmechanismus wurde als Kontrolle eine Selektion gegen Streptavidin durchgeführt. Nach der fünften Selektionsrunde wurden einzelne Klone gepickt, amplifiziert, die DNA isoliert und sequenziert. Die für die randomisierten Peptide erhaltene DNA Sequenz wurde mittels des bioinformatischen Programms GENTle© in die passende Aminosäuresequenz transformiert. Eine Auflistung der erhaltenen Sequenzen ist in Abbildung 4.7.1 dargestellt. Das Alignment der Klone, die gegen den GST-IR-NT selektioniert wurden (Abb. 4.7.1.A), zeigt dass neun der zehn Klone eine identische Sequenz aufweisen. Einzig Klon eins besitzt eine abweichende Sequenz, die allerdings in der Lage der hydrophoben und geladenen Reste Ähnlichkeiten zu der Sequenz der anderen neun Klone aufweist. Im Falle des GST-IGF-NT (Abb.4.7.1.B) besitzen acht Klone eine identische Sequenz (K1, K2, K4-8 und K10), die keinerlei Ähnlichkeit zu den Sequenzen der anderen beiden Klone, K9 und K3, aufweist. Diese Sequenz ist identisch mit der Sequenz, die einmal unter den Klonen gegen GST-IR-NT gefunden wurde. Die Sequenz des Klons gegen Streptavidin zeigte keine Ähnlichkeiten zu denen gegen den Juxtamembranbereich der Kinase selektionierten Peptiden (Daten nicht gezeigt) und wies zudem die erwartete Konsensussequenz HPQ für die Bindung an Streptavidin auf¹³⁰.

A)		B)	
Target: GST-IR-NT		Target: GST-IGF-NT	
IR-NT K1	TQWLPSLLEHPM	IGF-NT K1	TQWLPSLLEHPM
IR-NT K2	EHWYDGPMTRPS	IGF-NT K2	TQWLPSLLEHPM
IR-NT K3	EHWYDGPMTRPS	IGF-NT K3	HLHVHVKFADRQ
IR-NT K4	EHWYDGPMTRPS	IGF-NT K4	TQWLPSLLEHPM
IR-NT K5	EHWYDGPMTRPS	IGF-NT K5	TQWLPSLLEHPM
IR-NT K6	EHWYDGPMTRPS	IGF-NT K6	TQWLPSLLEHPM
IR-NT K7	EHWYDGPMTRPS	IGF-NT K7	TQWLPSLLEHPM
IR-NT K8	EHWYDGPMTRPS	IGF-NT K8	TQWLPSLLEHPM
IR-NT K9	EHWYDGPMTRPS	IGF-NT K9	INTYTTQLGFSL
IR-NT K10	EHWYDGPMTRPS	IGF-NT K10	TQWLPSLLEHPM

Abbildung 4.7.1: Auflistung der aus dem Phage Display gegen GST-IR-NT und GST-IGF-NT erhaltenen Peptidsequenzen.

Die aus den Sequenzierungsdaten erhaltenen DNA-Sequenz für die jeweiligen Phagen-Klone wurde mittels des bioinformatischen Programms GENTle© in die passende Aminosäuresequenz in Einbuchstabencode transformiert. Aminosäuren mit unpolaren Seitenketten sind in grün, die mit polaren, ungeladenen Seitenketten in hellblau dargestellt. In rot sind Aminosäuren mit saurer Seitenkette und in blau die mit basischer Seitenkette dargestellt.

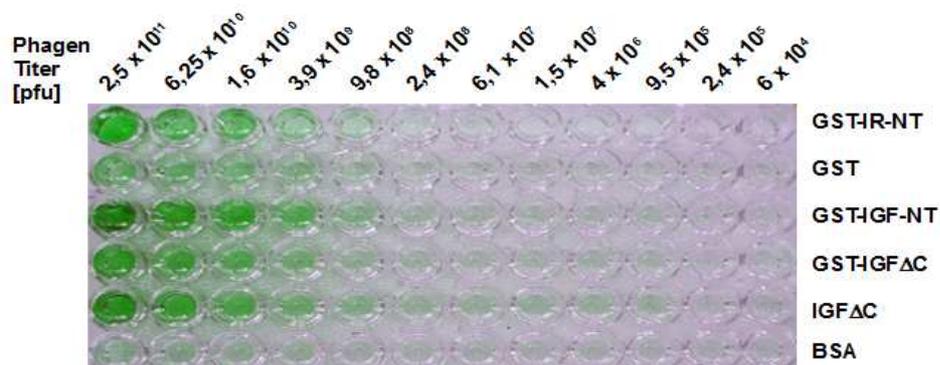
Die Sequenz des Klons IGF-NT K9 wies einen hohen Anteil an Tyrosin-, Serin und Threonin-Resten auf, die eventuell von der IGF-Kinase phosphoryliert werden könnten und damit die Auswertung der jeweiligen Versuche erschweren würde. Daher wurde diese Sequenz von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Auch die gegen GST-IR-NT selektierten Sequenzen wurden nicht weiter untersucht.

Mittels *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) sollte untersucht werden, ob die isolierten Phagenklone die Zielproteine binden oder allein durch Wechselwirkungen mit dem geblockten Plastik der Mikrotiterplatte selektiert wurden. Um die Bindungsqualitäten der ausgesuchten Peptide zu ermitteln, wurden die Zielproteine GST-IGF-NT und GST-IR-NT, die monomere und dimere IGF α C-Kinase sowie die Kontrolle GST auf der Mikrotiterplatte immobilisiert und anschließend mit einer Verdünnungsreihe von 6×10^4 - $2,5 \times 10^{11}$ der entsprechenden Phagenlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der Nachweis erfolgte wie unter 7.2.4 beschrieben. Die Intensität der Färbung und die minimale Konzentration der Phagenlösung, bei der noch eine Färbung sichtbar bleibt, soll die Affinität der Phagen zum immobilisierten Protein andeuten. In Abbildung 4.7.2.A ist das Ergebnis für die Bindungsspezifität von Klon IGF-NT-K1 dargestellt. Die Phagen binden nicht gegen

Plastik. Gegen GST ist nur eine schwache Bindung zu erkennen. Die Interaktion mit GST-IGF-NT scheint stärker zu sein, als die mit GST-IR-NT. Die Phagen binden auch gegen die monomere IGF Δ C und etwas schwächer gegen die GST-getagte Variante dieser Kinase.

Klon IGF-NT K3 bindet am besten gegen das Target GST-IGF-NT (4.7.2.B). Die Reaktion hat mit $3,9 \cdot 10^9$ pfu Phagen noch eine sichtbare Färbung gezeigt. Ähnlich stark ist die Bindung an die monomere und dimere Kinase der IGF Δ C. Die Probenreihen mit GST-IR-NT, GST und blockiertem Plastik zeigen eine nur schwache bzw. keine Farbreaktion.

A)



B)

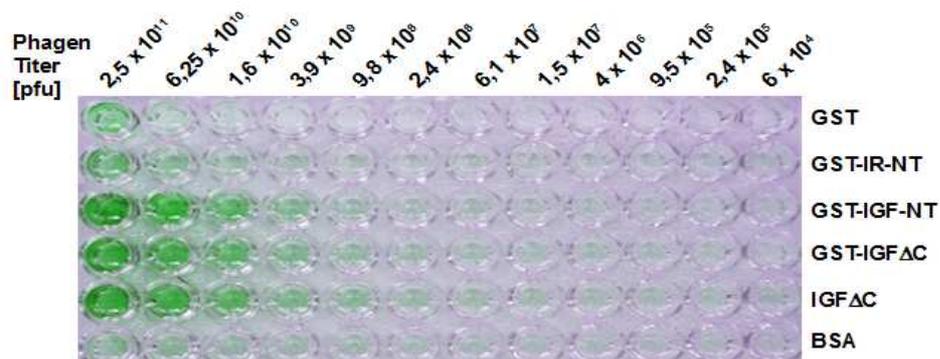


Abbildung 4.7.2: ELISA zur Überprüfung der Bindungsspezifität von IGF-NT K1 und IGF-NT K3. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten wurden mit den Proteinen GST-IR-NT, GST, GST-IGF-NT, GST-IGF Δ C, IGF Δ C und BSA gecoatet und mit der Phagenlösung in dem angegebenen Titer inkubiert. **A:** Phagen-Lösung des Phagen Klons IGF-NT K1. **B:** Phagen-Lösung des Phagen Klons IGF-NT K3.

4.7.2 Phage Display gegen die α D-Helix/hinge region

Um bindende Peptidsequenzen gegen die α D-Helix/hinge region zu selektionieren, wurde als Zielprotein das Peptid aus der Sequenz der α D-Helix/hinge region gewählt. Hier wurde das ungelabelte, gespaltene Peptid aus *E.coli* verwendet. Da das gleiche Kit verwendet wurde, das auch gegen den Juxtamembranbereich zum Einsatz kam, wurde auf eine weitere Kontrolle des Selektionsmechanismus verzichtet. Nach der fünften Selektionsrunde wurden einzelne Klone gepickt, amplifiziert, die DNA isoliert und sequenziert. Die für die Peptide erhaltene DNA Sequenz wurde in die passende Aminosäuresequenz transformiert (Abb. 4.7.3).

Targetsequenz: LKSYLRSLRPEMENN

α D-Peptid K2	HSALRPPASAAP
α D-Peptid K3	TPTDNSVFAAS
α D-Peptid K4	HSALRPPASAAP
α D-Peptid K5	HSALRPPASAAP
α D-Peptid K6	NIWINILPTKPW
α D-Peptid K7	HSALRPPASAAP
α D-Peptid K8	HSALRPPASAAP
α D-Peptid K9	TPTDNSVFAAS
α D-Peptid K10	HSALRPPASAAP

Abbildung 4.7.3: Auflistung der aus dem Phage Display gegen das Peptid aus α D-Helix/hinge region erhaltenen Peptidsequenzen.

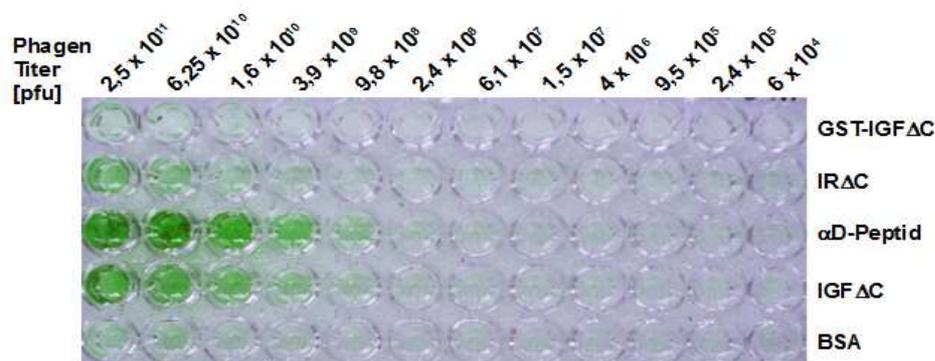
Die aus den Sequenzierungsdaten erhaltene DNA-Sequenz für die jeweiligen Phagen-Klone wurde mittels des bioinformatischen Programms GENTle© in die passende Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode transformiert. Aminosäuren mit unpolaren Seitenketten sind in grün, die mit polaren, ungeladenen Seitenketten in hellblau dargestellt. In Rot sind Aminosäuren mit saurer Seitenkette und in blau die mit basischer Seitenkette dargestellt.

Das Sequenzierungsergebnis für Klon 1 konnte nicht ausgewertet werden. Es wurden drei unterschiedliche Sequenzen erhalten. Die Sequenz von α D-Peptid K2 trat insgesamt sechs mal auf, die von Klon 3 zweimal. Die Sequenz von Klon 6 trat nur einmal auf. Letztere wurde für die weiteren Versuche ausgeschlossen, da im ELISA eine Plastikbindung beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt).

Um die Bindungsqualitäten der ausgesuchten Peptide zu ermitteln, wurde ein ELISA durchgeführt. Dabei wurde die Bindungsspezifität der Klone gegen das α D-Peptid, die monomere und dimere IGFAC-Kinase und zur Kontrolle die IRAC untersucht (Abb.4.7.4).

Die Phagen des Klons α D-Peptid K2 binden nicht gegen Plastik. Die stärkste Bindung wurde für das Targetpeptid gefunden, hier wurde mit $9,8 \cdot 10^8$ pfu Phagen noch eine sichtbare Färbung gezeigt. Ein wenig schwächer ist die Interaktion mit der monomeren Kinase des IGF-1R. Gegen die GST-Kinase konnte keine Bindung nachgewiesen werden. Es konnte eine Bindung an die IR Δ C beobachtet werden. Diese ist aber wesentlich schlechter als die gegen die IGF Δ C. Das Ergebnis der ELISA zur Überprüfung der Bindungsspezifität des Klons α D-Peptid K3 ist in Abbildung 4.7.4.B dargestellt. Hier konnten keine guten Ergebnisse erzielt werden. Die Bindung der Phagen waren selbst gegen das Targetpeptid sehr schlecht. Für alle vier Proteine konnte eine Reaktion bis $6,25 \cdot 10^{10}$ pfu Phagen nachgewiesen werden. Es fand keine Binden an Plastik statt.

A)



B)

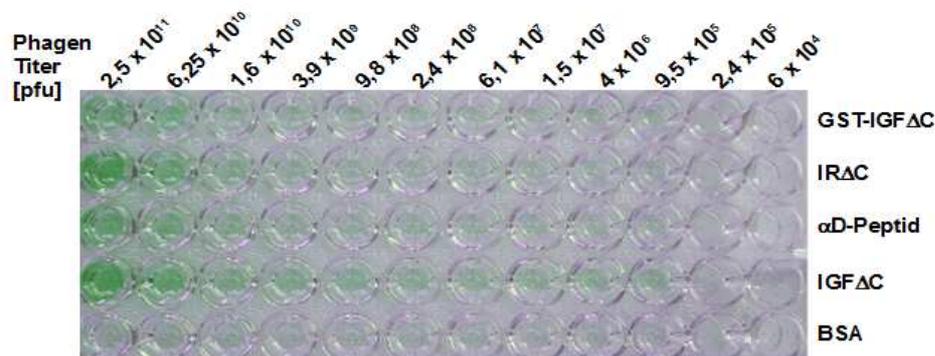


Abbildung 4.7.4: ELISA zur Überprüfung der Bindungsspezifität von α D-Peptid K2 und α D-Peptid K3

Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten wurden mit den Proteinen IGF Δ C, GST-IGF Δ C, α D-Peptid, IGF Δ C und BSA gecoatet und mit der Phagenlösung in dem angegebenen Titer inkubiert. **A:** Phagen-Lösung des Phagen Klons α D-Peptid K2. **B:** Phagen-Lösung des Phagen Klons α D-Peptid K3.

4.8 Charakterisierung der Peptide gegen den GST-IGF-NT

Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle Phosphorylierungsreaktionen unter Standardbedingung (1mM ATP; 30 mM MgCl₂; 5 mM DTT; 50 mM Tris pH 7,5; Raumtemperatur) und mit radioaktiv markiertem $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP einer spezifischen Radioaktivität von etwa 100-200 Cpm/pmol durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe des ATP gestartet. Sofern nicht anders vermerkt wurden die Reaktionen mit den chemisch synthetisierten Peptiden durchgeführt. Vor der Reaktion wurden die Peptide für 30 min bei 4 °C mit der Kinase vorinkubiert. Autophosphorylierungsreaktionen wurden auf der SDS-PAGE analysiert (7.3.14.4). Für die Auswertung der Autophosphorylierung wurde der Phosphateinbau in die Kinase bestimmt. Das ist die Menge an Phosphat, die auf die Kinase übertragen wurde, pro Kinasemenge in der ausgeschnittenen Gelbande. Die Auswertung der Tyrtide-Phosphorylierung erfolgte über die SDS-PAGE bzw. dem Paperassay (7.3.14.3). Im Anhang ist die Auswertung einer radioaktiven Substratphosphorylierung über die SDS-PAGE (Abb. 9.12.2, S. 173) bzw. dem Paperassay (Abb. 9.14.2, S. 174) exemplarisch dargestellt. Zur graphischen Auswertung der Tyrtide-Phosphorylierung wird der Phosphateinbau in das Substrat bestimmt. Dieser gibt die Menge an Phosphat an, die in das Substrat eingebaut wurde, pro Substratmenge in der ausgewerteten Gelbande bzw. auf dem Papier. Insgesamt kann in das Substrat nur 1 mol Phosphat pro mol Substrat eingebaut werden, da Tyrtide nur eine Tyrosinphosphorylierungsstelle für die IGF-Kinase aufweist. Die Auswertung der Substratphosphorylierung der GST-PTB₃₇₅ bzw. GST-Gab1 erfolgte über die SDS-PAGE, es wurde der Phosphattransfer bestimmt. Dieser gibt die Menge an übertragenem Phosphat an.

4.8.1 Die Peptide IGF-NT K1 und K3 inhibieren die Auto- und Substratphosphorylierung der monomeren IGFΔC

Um den Einfluss der erhaltenen Peptide auf die Kinaseaktivität zu untersuchen, wurden diese zunächst in Autophosphorylierungsreaktionen der monomeren IGFΔC eingesetzt. 5 μM Kinase wurden unter Standardbedingungen in Anwesenheit von 250 μM Peptid (IGF-NT K1 bzw. K3) phosphoryliert. Um ausschließen zu können, dass der Effekt der Peptide auf deren Aufreinigungsmethode zurückzuführen ist, wurde zusätzlich eine Autophosphorylierung in Anwesenheit des Kontrollpeptids (250 μM) durchgeführt. Dieses Peptid mit randomisierter Sequenz wurde auf die gleiche Weise gereinigt wie die Peptide IGF-NT K1 und K3. Die Auswertung der Phosphorylierung erfolgte über die SDS-PAGE. Die graphische Auswertung ist in Abbildung 4.8.1 dargestellt.

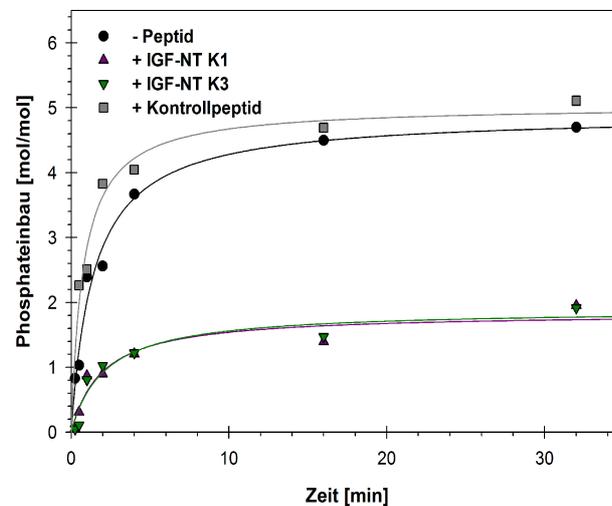


Abbildung 4.8.1: Die Peptide inhibieren die Autophosphorylierung der monomeren Kinase.
 Dargestellt ist die graphische Auswertung der zeitabhängigen Autophosphorylierung von 5 μ M IGFAC +/- 250 μ M Peptid. Peptid und Kinase wurden für 30 min bei 4 °C vorinkubiert. Aufgetragen wurde der Phosphateinbau in die Kinase in Abhängigkeit von der Zeit.

Gezeigt ist der Phosphateinbau in die Kinase in Abhängigkeit von der Zeit. Es wird deutlich, dass die Anwesenheit der Peptide IGF-NT K1 und K3 die Autophosphorylierung der monomeren Kinase signifikant verzögert. Die Kinase schafft ohne Peptid schon nach 16 Minuten ihren Maximaleinbau von fast 5 mol Phosphat pro mol Kinase. In Anwesenheit der Peptide schafft die Kinase selbst nach 32 Minuten nur einen Einbau von maximal 2 mol/mol. Ebenso wird die Initialgeschwindigkeit gegenüber der Kontrollreaktion erheblich abgesenkt. Das Kontrollpeptid vermochte keine Inhibition auszuüben. So ist der inhibitorische Effekt der Peptide IGF-NT K1 und K3 allein auf deren Sequenz zurückzuführen.

Anschließend wurde die Substratphosphorylierung der IGFAC in Anwesenheit der beiden Peptide untersucht. Dazu wurden 100 μ M Tyrtide durch 5 μ M IGFAC in An- bzw. Abwesenheit von 250 μ M des jeweiligen Peptids zeitabhängig phosphoryliert. Die Auswertung der Phosphorylierung erfolgte über SDS-PAGE. Die Graphische Auswertung der Substratphosphorylierung ist in Abbildung 4.8.2 gezeigt. Aufgetragen ist der Phosphateinbau in Tyrtide in Abhängigkeit von der Zeit. Bei der Substratphosphorylierung ist der inhibitorische Effekt noch deutlicher. Nach 32 min wurde in Anwesenheit der Peptide nur etwa 10-20 % der Phosphatmenge im Vergleich zur Reaktion ohne Peptid auf das Substrat übertragen.

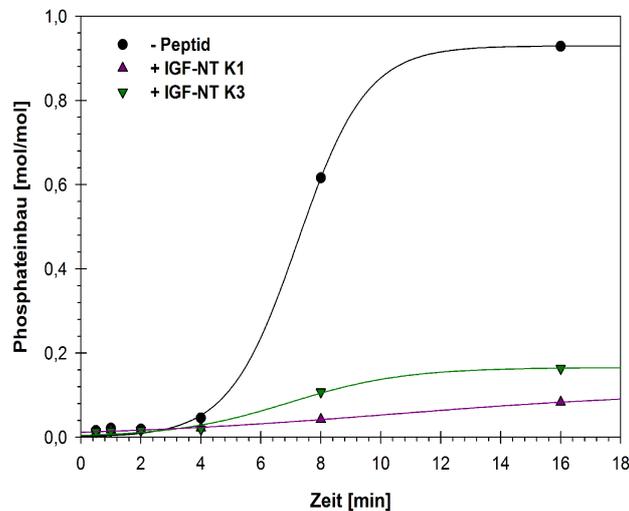


Abbildung 4.8.2: Die Peptide inhibieren die Substratphosphorylierung der monomeren Kinase.

Dargestellt ist die graphische Auswertung der zeitabhängigen Substratphosphorylierung der IGF Δ C +/- der Peptide IGF-NT K1 und K3. Eingesetzt wurden 5 μ M Kinase, 100 μ M Tyrtide und 250 μ M Peptid. Ausgewertet wurde die Phosphorylierung über SDS-PAGE. Aufgetragen wurde der Phosphateinbau in Tyrtide gegen die Zeit.

4.8.2 Die Aktivität der dimeren Kinase wird nicht beeinflusst

Im Folgenden stand eine Charakterisierung der Art und Weise der Inhibition im Vordergrund. Haben die Peptide einen Einfluss auf präformierte Kinase-Dimere? Aus diesem Grund wurde die über GST künstlich dimerisierte GST-IGF Δ C in An- und Abwesenheit der Peptide IGF-NT K1 und K3 in Phosphorylierungsreaktionen untersucht. GST-dimere Kinasen zeigen eine 10-100 fache Erhöhung der Phosphorylierungsaktivität, sowohl in der Auto- als auch Substratphosphorylierung. Sie sind ein Modell für den aktivierten Rezeptor, ohne dass es *per se* einer Phosphorylierung in der Aktivierungsschleife bedarf⁴¹. Um den Einfluss der Peptide auf die dimere Kinase zu untersuchen, wurden sie im 50 fachen molaren Überschuss in der zeitabhängigen Tyrtide-Phosphorylierung eingesetzt. Dazu wurden 25 μ M Tyrtide durch 0,5 μ M GST-IGF Δ C phosphoryliert und über SDS-PAGE analysiert. Die graphische Auswertung ist in Abbildung 4.8.3 dargestellt. Gezeigt ist der Phosphateinbau in Tyrtide in Abhängigkeit von der Zeit. Es wird deutlich, dass die Peptide keinen Einfluss auf die Aktivität der dimeren Kinase haben. Weder der Transfer auf das Substrat noch die Initialgeschwindigkeit wird durch die Peptide beeinflusst. Auch die Autophosphorylierung der dimeren Kinase wurde untersucht (s. Anhang, Abb. 9.14.1 S. 175). Es konnte kein Einfluss

der Peptide auf die Autophosphorylierung der dimeren Kinase beobachtet werden.

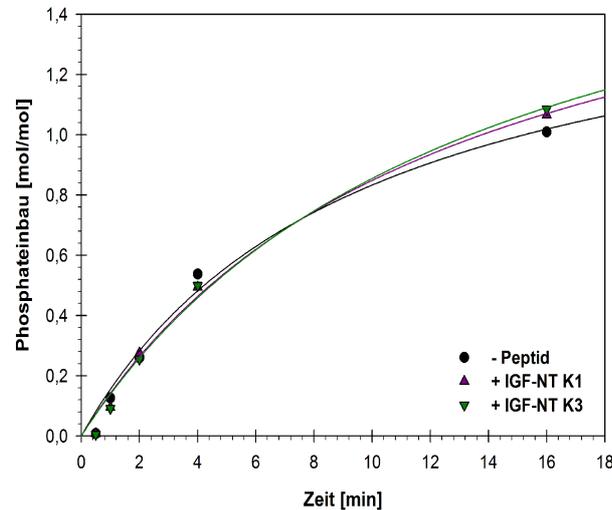


Abbildung 4.8.3: Die Aktivität der dimeren Kinase wird nicht durch die Peptide beeinflusst.

Dargestellt ist die Substratphosphorylierung von $0,5 \mu\text{M}$ GST-IGFAC +/- $25 \mu\text{M}$ IGF-NT K1 bzw. K3. Als Substrat wurden $25 \mu\text{M}$ Tyrtide verwendet. Aufgetragen wurde der Phosphateinbau in Tyrtide gegen die Zeit.

4.8.3 Die Bindung der Peptide verhindert die Interaktion der Kinase mit der Phosphotyrosin-bindenden Domäne

Da die Peptide gegen den Bereich selektioniert wurden, in dem das physiologische Substrat IRS-1 via seiner PTB Domäne bindet, wurde der Einfluss der Peptide auf die Phosphorylierung von GST-PTB₂₇₅ durch die monomere sowie dimere Kinase untersucht. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Bindungsstelle in der Juxtamembrandomäne der Kinase des IGF-1R intakt sein muss, damit es zu einer Phosphorylierung der PTB durch die Kinase kommt¹²⁶. Wird Tyrosin 950 im PTB-Bindemotiv zu Phenylalanin mutiert, so führt das zu einem signifikant verringertem Phosphattransfer auf die PTB. Zunächst wurden $25 \mu\text{M}$ GST-PTB₃₇₀ durch $5 \mu\text{M}$ monomere Kinase in An- und Abwesenheit von $250 \mu\text{M}$ Peptid zeitabhängig phosphoryliert. Zum Vergleich wurden $25 \mu\text{M}$ GST-PTB₃₇₀ durch $5 \mu\text{M}$ der monomeren IGF-Kinase-Mutante phosphoryliert, in der Y950 der PTB-Bindestelle zu F mutiert wurde (IGFAC-Y950F), so dass eine Bindung des Substrats verhindert wird. Ausgewertet wurde der Versuch über SDS-PAGE. Eine graphische Auswertung des Versuchs ist in Abbildung 4.8.4 dargestellt. Aufgetragen wurde der Phosphattransfer auf die PTB

Domäne gegen die Zeit. Wie zu erwarten, wird die PTB Domäne durch die Y950F-Mutante deutlich schlechter phosphoryliert als durch die Wildtyp-Kinase. Der maximale Phosphattransfer ist um 75 % verringert. Auch die Initialgeschwindigkeit wird gesenkt. Wird die PTB hingegen durch die Wildtypkinase in Anwesenheit der Peptide phosphoryliert, so kann lediglich basale Aktivität beobachtet werden. Der maximale Phosphattransfer liegt noch deutlich unter dem, der durch die Y950F-Mutante erreicht wird.

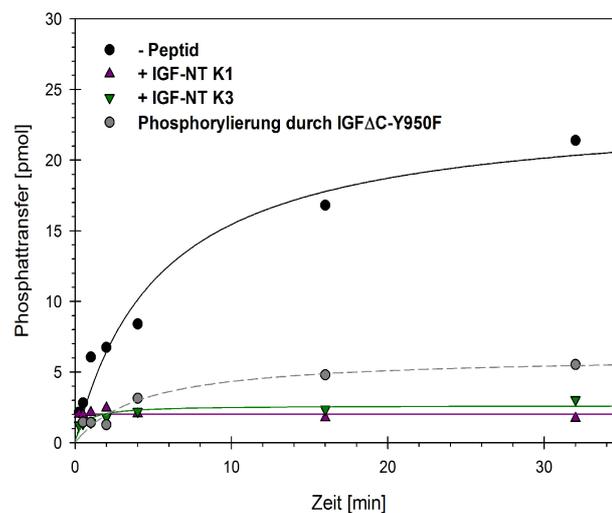


Abbildung 4.8.4: Die PTB-Phosphorylierung der monomeren Kinase wird durch die Peptide inhibiert.

Graphische Auswertung der zeitabhängigen PTB-Phosphorylierung der monomeren IGFΔC. Eingesetzt wurden 5 μM IGFΔC bzw. IGFΔC-Y950F, 25 μM GST-PTB₃₇₀ und 250 μM IGF-NT K1 bzw. K3. Ausgewertet wurde die Phosphorylierung über SDS-PAGE. Aufgetragen wurde der Phosphattransfer auf die PTB in Abhängigkeit von der Zeit.

Im Anschluss wurde der Einfluss der Peptide auf die PTB-Phosphorylierung der dimeren Kinase GST-IGFΔC untersucht. Dazu wurden 25 μM GST-PTB₃₇₀ durch 0,5 μM GST-IGFΔC in An- und Abwesenheit von 25 μM Peptid zeitabhängig phosphoryliert. Auch hier wurde zum Vergleich die GST-PTB₃₇₀ durch die dimere Mutante GST-IGFΔC-Y950F phosphoryliert. Die Auswertung der Phosphorylierung erfolgte über die SDS-PAGE, die graphische Darstellung ist in Abbildung 4.8.5 gezeigt. Anders als bei dem nicht-bindenden Substrat Tyrtide, wird die PTB-Phosphorylierung der dimeren Kinase durch die Anwesenheit der Peptide inhibiert. Der verringerte maximale Phosphattransfer ist vergleichbar mit dem der Kinasemutante GST-IGFΔC-Y950F, bei der die PTB-Bindung geschwächt ist. Da die Aktivität der dimeren Kinase

durch die Peptide nicht beeinflusst wird, muss in diesem Fall IGF-NT K1 bzw. K3 die Bindung des Substrats an die Kinase verhindern.

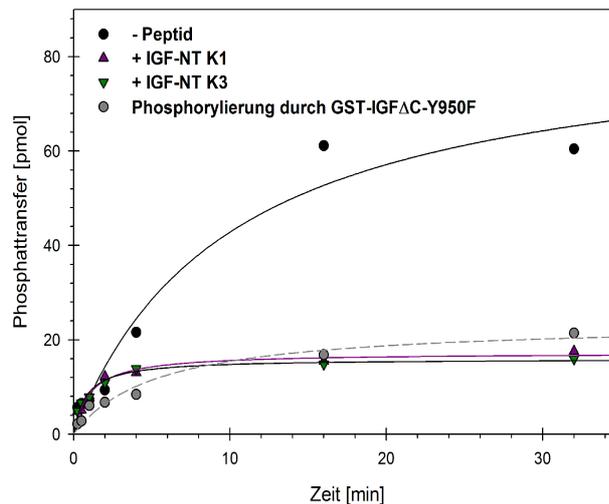


Abbildung 4.8.5: Die PTB-Phosphorylierung der dimeren Kinase wird durch die Peptide inhibiert.
 Graphische Auswertung der zeitabhängigen PTB-Phosphorylierung der dimeren Kinase. Eingesetzt wurden 0,5 μ M GST-IGF Δ C bzw. GST-IGF Δ C-Y950F, 2,5 μ M GST-PTB₃₇₀ und 25 μ M IGF-NT K1 bzw. K3. Ausgewertet wurde die Phosphorylierung über SDS-PAGE. Aufgetragen wurde der Phosphattransfer auf die PTB in Abhängigkeit von der Zeit.

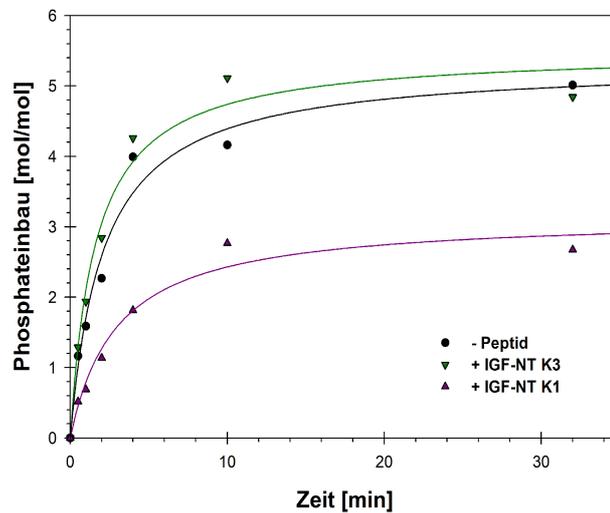
4.8.4 Untersuchungen zur Spezifität

Im Folgenden sollte die Spezifität der beiden Peptide in ihrer inhibitorischen Wirkung untersucht werden. Dafür standen mir drei weitere Rezeptortyrosinkinasen zur Verfügung. Als ein naher Verwandter des IGF-1R wurde mit Kinase des Insulinrezeptors ein weiteres Mitglied der Insulinrezeptorfamilie untersucht. Außerdem wurden die Kinasedomänen der Rezeptortyrosinkinasen TrkB-R und EGFR untersucht. Beide weisen eine geringere Homologie zum IGF-1R auf als der IR. Des Weiteren wurde ein Vertreter der Ser/Thr-Kinasefamilie untersucht, die zytosolische Kinase Akt.

Der Einfluss auf die Kinase des IR wurde in der Autophosphorylierung der monomeren, C-terminal deletierten Variante dieser Kinase (IR Δ C) untersucht. Dazu wurden 5 μ M Kinase in An- bzw. Abwesenheit von 250 μ M Peptid zeitabhängig autophosphoryliert. Die Auswertung erfolgte über SDS-PAGE. In Abbildung 4.8.6.A ist eine graphische Auswertung dieses Versuchs dargestellt. Aufgetragen ist der Phosphateinbau in die Kinase in Abhängigkeit von

der Zeit. In Anwesenheit von IGF-NT K3 zeigt die Kinase die gleiche Aktivität wie ohne Peptid. Die Initialgeschwindigkeit ist gleich und es wird in beiden Fällen ein maximaler Einbau von etwa 5 mol Phosphat pro mol Kinase erreicht. Das Peptid IGF-NT K1 übt auch auf die IRΔC einen inhibitorischen Einfluss aus. Die Kinase erreicht in Anwesenheit von IGF-NT K1 nur einen maximalen Einbau von etwa 2 mol/mol. Auch die Initialgeschwindigkeit ist herabgesetzt.

A)



B)

Kinasen	Einfluss des Peptids IGF-NT K1	Einfluss des Peptids IGF-NT K3
IGFΔC	+	+
IRΔC	+	-
TrkB-His	-	-
EGF-His	-	-
GST-Akt	-	-

Abbildung 4.8.6: Untersuchungen zur Spezifität der Peptide IGF-NT K1 und K3.

A: Dargestellt ist die graphische Auswertung der zeitabhängigen Autophosphorylierung von 5 μM IRΔC +/- 250 μM Peptid. Ausgewertet wurde die Phosphorylierung über SDS-PAGE. Aufgetragen wurde der Phosphateinbau in die Kinase in Abhängigkeit von der Zeit. Nur das Peptid IGF-NT K1 zeigt einen inhibitorischen Einfluss auf die monomere Kinase des IR. **B:** Zusammenfassung der Ergebnisse zur Untersuchungen des inhibitorischen Einflusses der Peptide IGF-NT K1 und K3 auf die Kinasen IGFΔC, IRΔC, TrkB-His, EGF-His, GST-Akt.

Im Falle der Kinase des TrkB-R wurde die His-getagte, monomere intrazelluläre Kinasedomäne (Trk-His) eingesetzt. Hier wurde der Einfluss der Peptide auf die Tyrtide-Phosphorylierung untersucht. Es wurden 60 μM Tyrtide durch 3 μM Trk-His +/- 150 μM Peptid zeitabhängig phosphoryliert. Ausgewertet wurde der Versuch über den Paperassay. Zur Untersuchung des Einflusses auf die Kinase des EGFR wurden 150 μM der Peptide in einer Phosphorylierung von 9 μM GST-Gab durch 3 μM EGF-His eingesetzt. Um den Einfluss der Peptide auf die Akt zu untersuchen, wurde die GST-getagte, um die PH-domäne deletierte, mittels Okkadeinsäure aktivierte Akt-Kinase (GST-Akt) in der Phosphorylierung der GST-PTB₃₇₀ untersucht. Auf die Akt Kinase hat der GST-Tag keinen aktivierenden Einfluss (Baer, unveröffentlichte Ergebnisse). Hierfür wurden 0,5 μM GST-AKT und 5 μM GST-PTB₃₇₀ +/- 25 μM Peptid eingesetzt.

Die graphische Auswertung dieser Versuche ist im Anhang (Abb. 9.15.1, S. 175) dargestellt, das Ergebnis ist in Abbildung 4.8.6.B zusammengefasst. Die Peptide IGF-NT K1 und K3 haben keinen inhibitorischen Einfluss auf die verwendeten Kinasevarianten des TrkB-R, EGFR und Akt-Kinase. Da das Peptid IGF-NT K1 einen inhibitorischen Einfluss auf die Kinase des IR ausübt, und in dieser Arbeit ein spezifischer Inhibitor generiert werden sollte, wurden die folgenden Versuche nur noch mit dem Peptid IGF-NT K3 durchgeführt.

4.8.5 Das Peptid IGF-NT K3 inhibiert die Autoaktivierung der monomeren Kinase

Das Peptid IGF-NT K3 zeigt einen Einfluss auf die monomere Kinase des IGF-1R, nicht aber auf die über GST dimerisierte Kinase. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass das Peptid den Übergang der Kinase von der inaktiven zur aktiven Struktur verhindert und damit die Autoaktivierung der Kinase inhibiert. Eine prä-dimerisierte Kinase, die bereits eine aktive Konformation eingenommen hat, wird nicht inhibiert. Um diese Ergebnisse zu untermauern, wurde eine konzentrationsabhängige Autophosphorylierung der monomeren Kinase in An- und Abwesenheit von IGF-NT K3 durchgeführt. Da die monomere Kinase über Dimerisierung aktiviert wird, ist die Initialgeschwindigkeit der Kinase abhängig von ihrer Konzentration. Es wurden steigende Kinasekonzentrationen (1-7 μM Kinase) zeitabhängig autophosphoryliert. Dabei wurden 100 μM IGF-NT K3 eingesetzt. Ausgewertet wurden die jeweiligen Phosphorylierungen über SDS-PAGE. Für die verschiedenen Kinasekonzentrationen wurde die Initialgeschwindigkeit bestimmt. Zur graphischen

Auswertung wurde die Initialgeschwindigkeit gegen die Kinasekonzentration aufgetragen (Abb. 4.8.7).

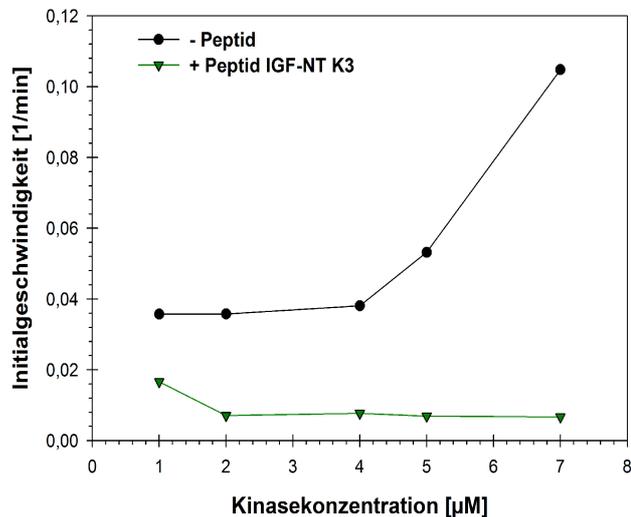


Abbildung 4.8.7: IGF-NT K3 inhibiert die Autoaktivierung der monomeren IGFΔC.

Graphische Auswertung der konzentrationsabhängigen Autophosphorylierung der monomeren Kinase in An- und Abwesenheit von IGF-NT K3. Es wurden steigende Kinasekonzentrationen (1-7 µM Kinase) +/- 100 µM IGF-NT K3 zeitabhängig autophosphoryliert. Ausgewertet wurden die jeweiligen Phosphorylierungen über die SDS-PAGE. Für die verschiedenen Kinasekonzentrationen wurde die Initialgeschwindigkeit bestimmt und in Abhängigkeit von der Kinasekonzentration aufgetragen.

Ohne Peptid ist eine Konzentration von 4-5 µM an monomerer Kinase notwendig, damit die Kinase sich autoaktiviert. Erst bei dieser Konzentration steigt die Initialgeschwindigkeit an. In Anwesenheit von 100 µM Peptid IGF-NT K3 aktiviert sich die Kinase bis hin zu 7 µM nicht. Die Anwesenheit des Peptids verhindert die Dimerisierung und damit Aktivierung der Kinase. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde der Einfluss von IGF-NT K3 auf eine schon aktivierte, monomere Kinase untersucht. Wird die monomere Kinase phosphoryliert, so wird sie dimerisierungs-unabhängig aktiviert⁴¹. Sofern das Peptid die Autoaktivierung der Kinase verhindert, sollte es keinen Einfluss auf die phosphorylierte, aktive Kinase haben. Dazu wurde die monomere Kinase in einer Konzentration von 10 µM unter Standardbedingungen für 15 min autophosphoryliert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die Kinase auf Eis gestellt. Anschließend wurden 0,5 µM vorphosphorylierte Kinase einer Substratphosphorylierung von 25 µM Tyrtide in An- und Abwesenheit von 25 µM IGF-NT K3 unterzogen. Analysiert wurde der Versuch über SDS-PAGE. Wie zu erwarten hat das Peptid keinen Einfluss auf diese

Kinase (Abb. 4.8.8). Initialgeschwindigkeit und maximaler Umsatz werden nicht verändert durch das Peptid. Es entfaltet seine inhibitorische Wirkung also nur im Aktivierungsprozess, die aktivierte Kinase ist kein Target für IGF-NT K3.

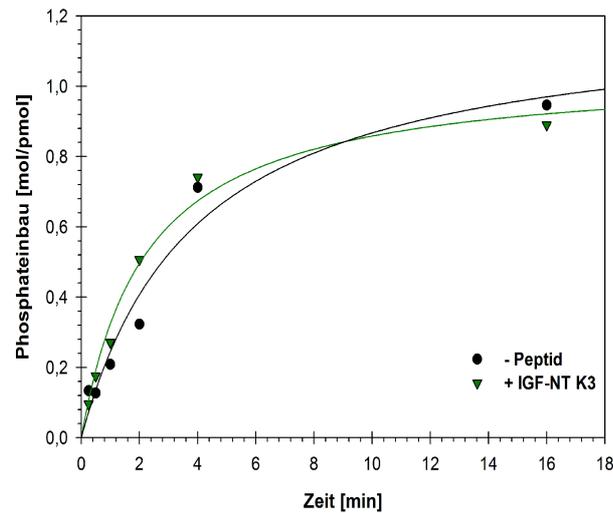


Abbildung 4.8.8: Die aktivierte, monomere IGFAC wird nicht von IGF-NT K3 inhibiert.

Dargestellt ist die graphische Auswertung der zeitabhängigen Substratphosphorylierung von 25 μM Tyrtide durch 0,5 μM vorphosphorylierte IGFAC in An- und Abwesenheit von 25 μM IGF-NT K3. Ausgewertet wurde die Phosphorylierung über die SDS-PAGE. Aufgetragen ist der Phosphattransfer auf Tyrtide in Abhängigkeit von der Zeit.

4.8.6 IGF-NT K3 interferiert mit der Kinasedimerisierung

Um den Einfluss des Peptids IGF-NT K3 auf den Aktivierungsprozess genauer zu untersuchen, wurde die Substratphosphorylierung der katalytisch inaktiven Kinasemutante des IR, IRKD-D1120A-His untersucht. Der Austausch der katalytischen Base D1120 führt dazu, dass die für die Katalyse essentielle Koordination des Kofaktors Mg^{2+} nicht gegeben ist, was zu einem Verlust der Transferaseaktivität führt. Die katalytisch inaktive Kinase stellt ein sehr gutes Substrat für die aktive Kinase des IR bzw. IGF-1R dar. Bevor aber das inaktive Enzym als Substrat bedient werden kann, muss eine produktive Dimerisierung zwischen inaktiver und aktiver Kinase erfolgen. Diese Hetero-Dimerisierung kann als Modell für die Homo-Dimerisierung zweier monomerer, aktiver Kinasen betrachtet werden¹³¹. Als Enzym wurde erneut auf die vorphosphorylierte, aktivierte, monomere IGFAC zurückgegriffen. Diese Kinase ist in der Tyrtide-Phosphorylierung kein Target für IGF-NT K3. Sollte der Inhibitor

allerdings die Dimerisierung der monomeren Kinase verhindern, so sollte die Phosphorylierung der IRKD-D1120A-His durch die vorphosphorylierte, aktivierte monomere IGF Δ C inhibiert werden. Die IRKD-D1120A-His ist im Gegensatz zur IGF Δ C nicht deletiert und beinhaltet zusätzlich zu den fünf Tyrosin-Phosphorylierungsstellen der Juxtamembran- und Kinasedomäne noch zwei Tyrosin-Phosphorylierungsstellen im C-Terminus. In diesem Versuch wurden 0,5 μ M vorphosphorylierte IGF Δ C und 5 μ M IRKD-D1120A-His eingesetzt. Für den Fall, dass der Inhibitor auch an die IRKD-D1120A-His bindet, wurde er in einem 50-fachen, molaren Überschuss zu der Summe aus aktivem und inaktivem Enzym eingesetzt (275 μ M). Inhibitor und Kinase wurden für 30 min bei 4 °C vorinkubiert. Anschließend wurde die Substratphosphorylierung unter Standardbedingungen durchgeführt. Ausgewertet wurde die Phosphorylierung auf der SDS-PAGE. Die graphische Auswertung des Versuchs ist in Abbildung 4.8.9 gezeigt. Aufgetragen ist der Phosphateinbau in das Substrat gegen die Zeit. Es wird deutlich, dass die Phosphorylierung der inaktiven Kinase durch die aktive IGF Δ C von IGF-NT K3 signifikant gehemmt wird. In Abwesenheit des Inhibitors erreicht die Kinase einen maximalen Einbau in das Substrat von etwa 5 mol/mol. Der maximale Einbau in

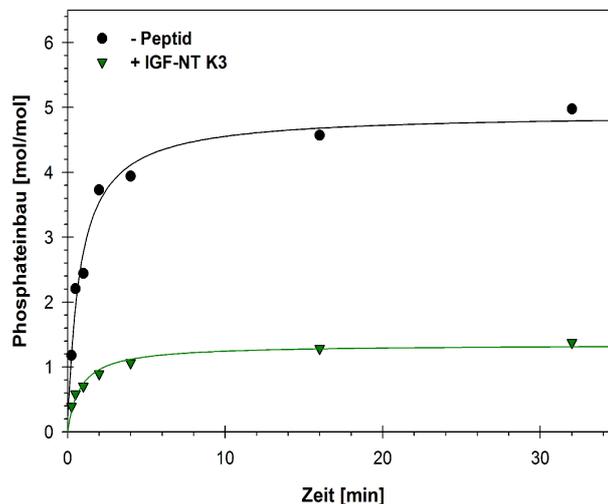


Abbildung 4.8.9: IGF-NT K3 interferiert mit der Kinasedimerisierung.

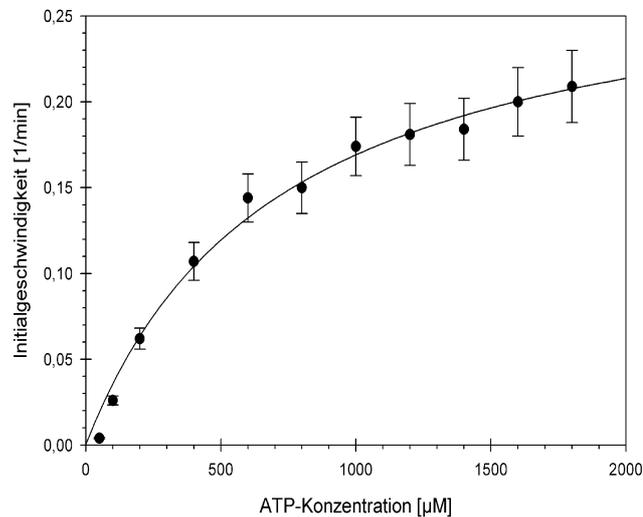
Dargestellt ist die graphische Auswertung der Phosphorylierung der katalytisch inaktiven IRKD-D112A-His durch die vorphosphorylierte, aktive IGF Δ C in An- und Abwesenheit von IGF-NT K3. 5 μ M IRKD-D1120A-His wurden durch 0,5 μ M vorphosphorylierte IGF Δ C +/- 275 μ M IGF-NT K1 phosphoryliert. Ausgewertet wurde die Phosphorylierung über die SDS-PAGE. Aufgetragen ist der Phosphateinbau in das Substrat gegen die Zeit.

Anwesenheit des Inhibitors beträgt etwa 1,4 mol/mol. Auch die Initialgeschwindigkeit wird gesenkt. Da die Aktivität der vorphosphorylierten Kinase durch IGF-NT K3 nicht beeinträchtigt wird, muss in diesem Fall das Peptid IGF-NT K3 die Hetero-Dimerisierung der IGF Δ C mit der IRKD-D1120A-His verhindern.

4.8.7 Beeinflusst IGF-NT K3 die Bindung von ATP?

Im Targetprotein, gegen das IGF-NT K3 selektioniert wurde, ist die ATP-Bindestelle der Kinase vorhanden. Der inhibitorische Einfluss des Peptids könnte somit durch eine Bindung des Peptids an dieser Stelle und damit Konkurrenz mit ATP herrühren. Um dies zu untersuchen, wurde der K_M für ATP der monomeren Kinase in Anwesenheit von IGF-NT K3 bestimmt und mit dem der Kinase in Abwesenheit des Peptids verglichen (Abb. 4.8.10). K_M für ATP und k_{cat} wurden über einen radioaktiven Assay ermittelt (siehe Abschnitt 4.5.2). Hierbei wurden 50 μ M IGF-NT K3 eingesetzt. Die erhaltene Michaelis-Menten-Kurve zur Bestimmung der kinetischen Parameter ist in Abbildung 4.8.10.A gezeigt. Ein Vergleich der Daten mit denen der monomeren Kinase in Abwesenheit des Peptids ist in Abbildung 4.8.10.B zu sehen. Die aufgelisteten Werte entsprechen dem arithmetischen Mittelwert mehrerer Messungen. Der angegebene Fehler entspricht der Standardabweichung. Der K_M -Wert für ATP wird durch das Peptid nicht verändert, die Affinität zum Nucleotid bleibt gleich. Nur k_{cat} wird durch die Bindung des Peptids herabgesetzt, die Effizienz der Katalyse also verringert.

A)



B)

	K_M	k_{cat}
- Peptid	873,87 +/- 89,02 µM	0,042 +/- 0,004 s ⁻¹
+ IGF-NT K3	768,28 +/- 75,99 µM	0,004 +/- 0,001s ⁻¹

Abbildung 4.8.10: Bestimmung der kinetischen Daten für die Substratphosphorylierung der monomeren Kinase in Anwesenheit von IGF-NT K3.

A:Zur Ermittlung des K_M für ATP und k_{cat} in Anwesenheit von IGF-NT K3 wurde ein ein radioaktiver Assay durchgeführt. Es wurden 1 µM IGFAC, 200 µM Tyrtide und 50 µM IGF-NT K3 verwendet. Aus dem hyperbolischen Fit wurde ein K_M für ATP von 715 µM und ein k_{cat} von 0,005 s⁻¹ erhalten. **B:** Tabelle zum Vergleich der kinetischen Parameter der ATP-abhängigen Substratphosphorylierung der monomeren Kinase +/über den radioaktiven Assay. Die Werte entsprechen dem arithmetischen Mittelwert mehrerer Messungen. Der angegebene Fehler entspricht der Standardabweichung.

4.8.8 Bestimmung des IC₅₀

Um die inhibitorische Stärke des Peptids zu charakterisieren, sollte der IC₅₀ bestimmt werden. Der IC₅₀ gibt die Inhibitorkonzentration an, bei der die halb maximale Hemmung des Enzyms erreicht wird. Zur Bestimmung dieses Parameters wurde die Kinaseaktivität mit ansteigender Inhibitorkonzentration in der Substratphosphorylierung bestimmt. In Anlehnung an andere Arbeiten^{125,132,133} wurde zur Bestimmung der Kinaseaktivität der maximale Phosphattransfer nach einer bestimmten Zeit ermittelt. Somit wurde die Aktivität von 1 µM Kinase in der Phosphorylierung von 50 µM Tyrtide mit ansteigender Inhibitorkonzentration gemessen und in Bezug gesetzt zur Aktivität in Abwesenheit des Inhibitors. Zur Bestimmung der

Kinaseaktivität wurde der Phosphattransfer auf das Substrat nach 40 Minuten bestimmt, ein Zeitpunkt, bei dem 1 μM Kinase in Abwesenheit des Peptids seine maximalen Transfer auf das Substrat erreicht hat. Die graphische Auswertung des Versuchs ist in Abbildung 4.8.11 zu sehen. Aufgetragen wurde die Kinaseaktivität gegen die Konzentration des Inhibitors. Bei der Auswertung wurde die Kinaseaktivität ohne Inhibitor gleich 100 % gesetzt. So wurde ein IC_{50} von 25,18 μM für den Inhibitor IGF-NT K3 bestimmt.

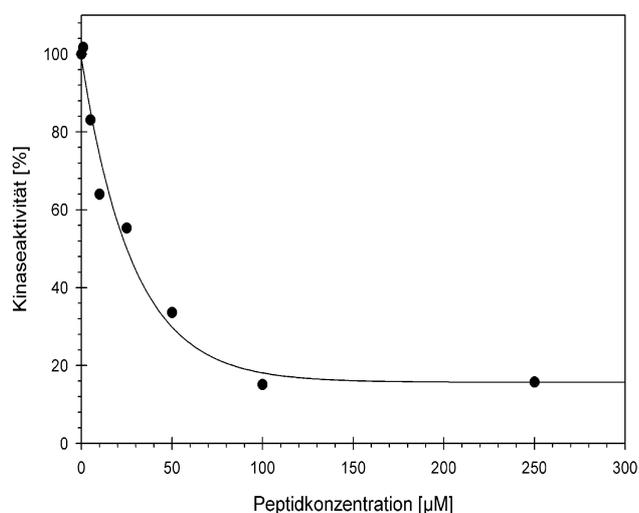


Abbildung 4.8.11: IC_{50} -Bestimmung

Zur Bestimmung des IC_{50} wurde die Kinaseaktivität der monomeren IGFAC bei steigender Peptidkonzentration bestimmt. Dazu wurden 50 μM Tyrtide durch 1 μM Kinase bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen phosphoryliert. Zur Bestimmung der Kinaseaktivität wurde der Phosphattransfer auf das Substrat nach 40 Minuten bestimmt, einem Zeitpunkt, bei dem 1 μM Kinase in Abwesenheit des Peptids den maximalen Transfer auf das Substrat erreicht hat. Dieser Wert wurde in Bezug gesetzt zur Kinaseaktivität in Abwesenheit des Peptids. Bei der Auswertung wurde die Kinaseaktivität ohne Inhibitor gleich 100 % gesetzt. Aus der Auftragung der Kinaseaktivität gegen die Peptidkonzentration wurde ein IC_{50} von 25,18 μM bestimmt.

4.8.9 Nachweis der Bindung der Peptide an die Kinase

Die Bindung der Peptide an die Kinase konnte bisher nur indirekt über die Hemmung der Kinaseaktivität und der Verhinderung der PTB-Bindung nachgewiesen werden. Auch der ELISA ist kein direkter Nachweis der Bindung, er weist lediglich die Bindung der Phagen an das Targetprotein nach. Ein direkter Nachweis sollte über die Methode des Far Western-Blots durchgeführt werden. Der Far Western wird zum Nachweis von Proteininteraktionen genutzt. Hierzu wird ein Protein, das „Beute“-Protein, auf einer Membran oder in einer PAGE fixiert. Dieses fixierte „Beute“-Protein wird mit einem zweiten Protein, dem „Köder“-Protein

inkubiert. Die Interaktion wird über die Visualisierung des „Köder“-Proteins nachgewiesen. Dazu muss das „Köder“-Protein mit Antikörpern nachweisbar sein oder radioaktiv bzw. Fluoreszenz-gelabelt sein.

In dieser Arbeit wurden als „Beute“-Protein die IGF Δ C und die IR Δ C verwendet. Zusätzlich wurde GST als Negativkontrolle auf die Membran aufgetragen. Als „Köder“-Protein wurden die Fluoreszenz-markierten Peptide verwendet. Hierzu wurden die Peptide wie unter 4.3 beschrieben generiert, mit Tetramethylrhodamin-5-maleimid markiert und gespalten. Die Kinasen wurden durch Dot-Blot auf der Membran fixiert (7.3.11.2). Nach dem Abblocken mit BSA wird die Membran mit markiertem Peptid inkubiert (7.3.12). Dokumentiert wird die Bindung des Peptids an die gecoateten Proteine unter UV, da so nur das markierte Peptid sichtbar wird. In Abbildung 4.8.12 ist der *Far Western* zum Nachweis der Bindung der Peptide IGF-NT K1-Cys und K3-Cys an die IGF Δ C gezeigt.

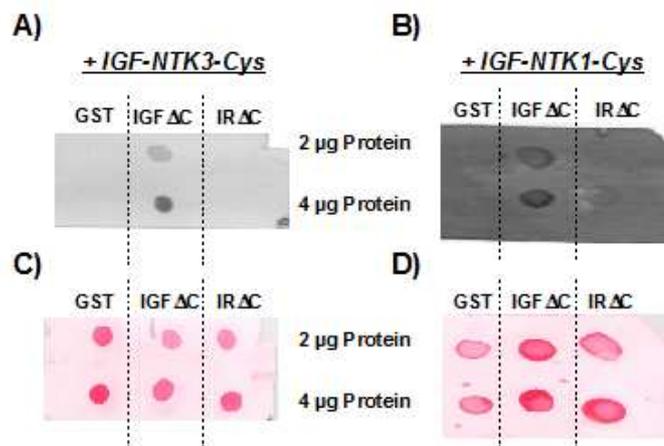


Abbildung 4.8.12: Far Western zum Nachweis der Bindung von IGF-NT K1 und K3 an die IGF Δ C.

Dargestellt sind die Membranen des *Far Western* auf die 2 bzw. 4 μ g der Kinasen IGF Δ C und IR Δ C und GST über den Dot-Blot fixiert wurden. Die Membranen wurden mit markierten IGF-NT K3-Cys bzw. IGF-NTK1-Cys inkubiert. **A** und **B**: Membran unter UV. Es werden nur die markierten Peptide sichtbar. **C** und **D**: Membran angefärbt mit Ponceau rot.

Die spezifische Bindung von IGF-NT K3 an die IGF Δ C wird bei der Dokumentation des Blots unter UV deutlich. Die Spots von GST und IR Δ C fluoreszieren nicht, an diesen Stellen wird kein Peptid nachgewiesen. An den Spots der IGF Δ C wird hingegen das fluoreszierende Peptid nachgewiesen. Auch für das Peptid IGF-NT K1 kann eine Bindung an die IGF Δ C nachgewiesen werden. Hier ist zusätzlich eine schwache Fluoreszenz bei den Spots der IR Δ C zu erkennen. Der Nachweis der Bindung von IGF-NT K1 erwies sich als schwierig, da das

Peptid durch die Waschschrirte nach der Inkubation wieder vom Blot entfernt wurde, besonders, wenn Salz im Puffer vorhanden war. Dies deutet auf eine ionische Interaktion zwischen Peptid und Kinase hin. Auf Grund dessen wurde im Falle des IGF-NT K1 der Blot nach der Inkubation mit dem Peptid nur kurz in 50 mM Tris pH 7,5 gewaschen. Auf Grund dessen ist die Hintergrundfärbung stärker. Um einen Einfluss des Labels Tetramethylrhodamin-5-maleimid auf die Bindung ausschließen zu können, wurden die markierten Peptide ebenfalls in Substratphosphorylierungsreaktionen der monomeren Kinase eingesetzt. Es zeigte sich, dass die markierten Peptide den gleichen inhibitorischen Einfluss auf die Kinase ausüben wie die unmarkierten, chemisch generierten Peptide (s. Anhang Abb.9.16.1, S. 176).

4.9 Charakterisierung der Peptide gegen das α D-Peptid

Sofern nicht anders vermerkt, wurden die Reaktionen mit den mit Tetramethylrhodamin-5-maleimid markierten Peptiden aus *E.coli* durchgeführt. Vor der Reaktion wurden die Peptide für 20 min bei 4 °C mit der Kinase vorinkubiert. Alle Reaktionen fanden unter Standardbedingungen (1mM ATP; 30 mM MgCl₂; 5 mM DTT; 50 mM Tris pH 7,5; Raumtemperatur) und mit radioaktiv markiertem γ^{32} P-ATP einer spezifischen Radioaktivität von etwa 100-200 Cpm/pmol statt. Die Auswertung erfolgte wie unter 4.8 beschrieben.

4.9.1 Die Peptide inhibieren die Auto- und Substratphosphorylierung der monomeren IGFAC

Wie unter 4.8.1 für die Peptide gegen den GST-IGF-NT beschrieben, wurden die Peptide α D-Peptid K2-Cys und α D-Peptid K3-Cys zunächst in der zeitabhängigen Auto- und Substratphosphorylierung der monomeren Kinase IGFAC eingesetzt. In beiden Fällen wurden 3 μ M Kinase verwendet. Das Peptid α D-Peptid K2-Cys wurde im 50 fachen Überschuss eingesetzt (150 μ M), das Peptid α D-Peptid K3-Cys konnte auf Grund der geringen Konzentration nur im 15 fachen Überschuss (45 μ M) eingesetzt werden. Ausgewertet wurde die Autophosphorylierung über SDS-PAGE. Bei der Substratphosphorylierung wurden 60 μ M Tyrtide eingesetzt. Um ausschließen zu können, dass der Effekt der Peptide auf deren Aufreinigungsmethode zurückzuführen ist, wurde die Substratphosphorylierung auch in Anwesenheit des Kontrollpeptids durchgeführt. Die Sequenz des Kontrollpeptids wurde auf die gleiche Weise generiert wie die Peptide α D-Peptid K2 und K3 (vgl. 4.3.1). Ausgewertet wurde die Tyrtide-Phosphorylierung über den Paperassay (7.3.14.3). In Abbildung 4.9.1 ist

die graphische Auswertung beider Versuche dargestellt. Die Peptide inhibieren die Autophosphorylierung der Kinase (Abb. 4.9.1.A). Im Falle von α D-Peptid K2-Cys erreicht die Kinase nur basale Aktivität, der Phosphatverbrauch nach 45 Minuten ist fast 10-fach verringert im Vergleich zur Reaktion ohne Peptid.

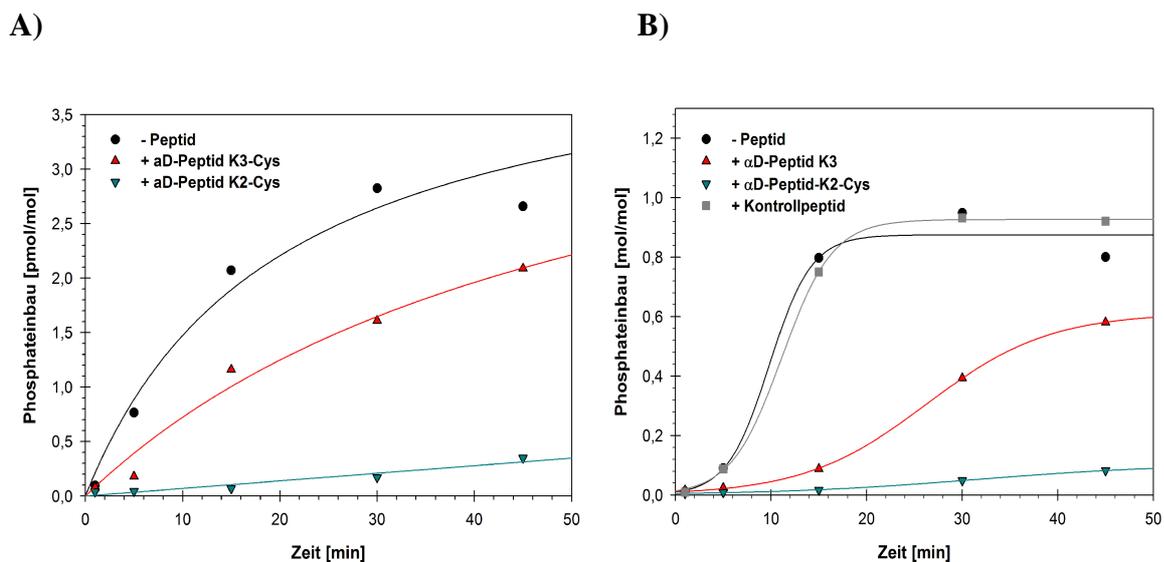


Abbildung 4.9.1: α D-Peptid K2-Cys und α D-Peptid K3-Cys inhibieren die Auto- und Substratphosphorylierung der monomeren IGF1R.

Dargestellt ist die graphische Auswertung der zeitabhängigen Autophosphorylierung bzw. Substratphosphorylierung von 3 μ M IGF1R. Es wurden 45 μ M α D-Peptid K2-Cys bzw. 150 μ M α D-Peptid K3-Cys eingesetzt. Ausgewertet wurde die Phosphorylierung über SDS-PAGE (A) bzw. Paperassay (B). **A:** Autophosphorylierung der IGF1R +/- Peptide. Aufgetragen wurde der Phosphatverbrauch in die Kinase in Abhängigkeit von der Zeit. **B:** Substratphosphorylierung von 60 μ M Tyrtide durch die IGF1R +/- Peptide. Aufgetragen wurde der Phosphatverbrauch in Tyrtide gegen die Zeit.

Auch in der Substratphosphorylierung wird die Kinaseaktivität durch α D-Peptid K2-Cys stark herabgesetzt (Abb. 4.9.1.B). Der maximale Phosphattransfer auf das Substrat ist fast 10-fach verringert und die Initialgeschwindigkeit ist deutlich herabgesetzt. Im Falle des Peptids α D-Peptid K3-Cys wird ein etwas schwächerer Effekt beobachtet. Die Kinase scheint langsamer zu sein, aber dann deutlich später einen ähnlichen Phosphattransfer zu erreichen wie die Kinase ohne Peptid, sowohl in der Auto- als auch in der Substratphosphorylierung. Das Peptid scheint die Reaktion nur zeitlich zu verzögern. Das Kontrollpeptid vermochte keine Inhibition hervorzurufen. Der Verlauf der Substratphosphorylierung in Anwesenheit dieses Peptids zeigt den gleichen Verlauf wie die Reaktion ohne Peptid.

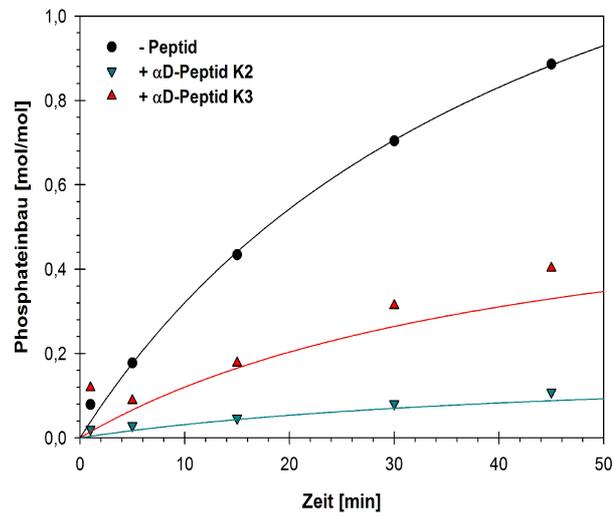
Des Weiteren musste ausgeschlossen werden, dass der inhibitorische Effekt der Peptide von dem großen hydrophoben Rest des Labels, Tetramethylrhodamin-5-maleimid, stammt. Dazu wurde eine zeitabhängig Substratphosphorylierung von 60 μM Tyrtide durch 3 μM IGF ΔC in Anwesenheit der unmarkierten, aus *E.coli* stammenden Peptide durchgeführt. Auch hier konnte das Peptid αD -Peptid K2 nur im 15 fachen Überschuss (45 μM) eingesetzt werden, αD -Peptid K3 wurde im 50 fachen Überschuss (150 μM) eingesetzt. Zu den entsprechenden Zeiten wurden den Ansätzen Proben entnommen und über den Paperassay ausgewertet. Die graphische Auswertung ist im Anhang dargestellt (Abb. 9.17.1, 176). Die Substratphosphorylierung der monomeren Kinase in Anwesenheit des unmarkierten αD -Peptid K2-Cys zeigt einen vergleichbaren Verlauf wie die in Anwesenheit des markierten Peptids. Das Label hat bei αD -Peptid K2-Cys keinen Einfluss auf die Inhibition. Der inhibitorische Effekt ist einzig auf die Sequenz zurückzuführen. Im Gegensatz dazu scheint der inhibitorische Effekt des αD -Peptid K3-Cys durch das Label geschwächt zu werden. Das unmarkierte Peptid scheint einen etwas stärkeren inhibitorischen Einfluss auf die Kinase auszuüben im Vergleich zum markierten Peptid.

4.9.2 Untersuchungen zur Spezifität

Im Folgenden sollte die Spezifität der markierten Peptide in ihrer inhibitorischen Wirkung untersucht werden. Der Einfluss auf die Kinase des IR wurde in einer Substratphosphorylierung von 60 μM Tyrtide durch 3 μM IR ΔC getestet. αD -Peptid K2-Cys wurde im 15 fachen und αD -Peptid K3-Cys im 50 fachen molaren Überschuss eingesetzt Das Diagramm der Substratphosphorylierung der IR ΔC ist in Abbildung 4.9.2.A gezeigt. Beide Peptide üben einen inhibitorischen Einfluss auf die IR ΔC aus, der vergleichbar ist mit dem Einfluss der Peptide auf die IGF ΔC ist. Zusätzlich wurde die Substratphosphorylierung der TrkB-His, EGF-His und GST-Akt in Anwesenheit der Peptide untersucht. Die Phosphorylierungen wurden wie unter 4.8.4 beschrieben durchgeführt, die graphische Auswertung ist im Anhang dargestellt (Abb. 9.18.1, S. 177). Die Ergebnisse der Versuche sind in Abbildung 4.9.2.B aufgelistet. Das αD -Peptid K2-Cys hat auf die anderen untersuchten Kinasen keinen Einfluss. Das αD -Peptid K3-Cys hingegen hemmt die Substratphosphorylierung der EGF-His, nicht aber die der Trk-His, oder GST-Akt. In Anwesenheit von αD -Peptid K3-Cys erreicht die EGF-His nur 79 % des maximalen

Phosphattransfer auf das Substrat im Vergleich zur Phosphorylierung ohne Peptid.

A)



B)

Kinasen	Einfluss des Peptids αD-PeptidK2-Cys	Einfluss des Peptids αD-PeptidK3-Cys
IGFΔC	+	+
IRΔC	+	+
TrkB-His	-	-
EGF-His	-	+
GST-Akt	-	-

Abbildung 4.9.2: Untersuchungen zur Spezifität der Peptide IGF-NT K1 und K3.

A: Dargestellt ist die graphische Auswertung der zeitabhängigen Substratphosphorylierung von 60 μM Tyrtide durch 3 μM IRΔC. Es wurden 45 μM αD-Peptid K2-Cys bzw. 150 μM αD-Peptid K3-Cys eingesetzt. Ausgewertet wurde die Phosphorylierung über den Paperassay. Aufgetragen wurde der Phosphateinbau in Tyrtide gegen die Zeit. Beide Peptide zeigen einen inhibitorischen Einfluss auf die Substratphosphorylierung der monomeren Kinase des IR **B:** Zusammenfassung der Ergebnisse zur Untersuchungen des inhibitorischen Einflusses der Peptide αD-Peptid K2-Cys und αD-Peptid K3-Cys auf die Kinasen IGFΔC, IRΔC, TrkB-His, EGF-His, GST-Akt

4.9.3 Die Aktivität der dimeren Kinase wird nicht beeinflusst

Da das Peptid α D-Peptid K3-Cys nur eine geringe wie auch unspezifische Inhibition aufwies, wurden die folgenden Untersuchungen lediglich mit dem Peptid α D-Peptid K2-Cys durchgeführt.

Auch für das Peptid α D-Peptid K2-Cys sollte untersucht werden, ob es einen Einfluss auf die prä-dimerisierte Kinase hat, die bereits in ihrer aktiven Konformation vorliegt. Dazu wurde das Peptid in einer Tyrtide-Phosphorylierung der GST-IGF Δ C wie unter 4.8.2 beschrieben eingesetzt. Die Auswertung der Phosphorylierung erfolgte über den Paperassay und ist in Abbildung 4.9.3 zu sehen. Gezeigt ist der Phosphateinbau in Tyrtide in Abhängigkeit von der Zeit. Die Reaktion in Anwesenheit des Peptids zeigt den gleichen Verlauf wie ohne Peptid. Eine dimere Kinase in ihrer aktiven Struktur ist kein Target für α D-Peptid K2-Cys und wird somit nicht von dem Peptid in ihrer Aktivität beeinflusst.

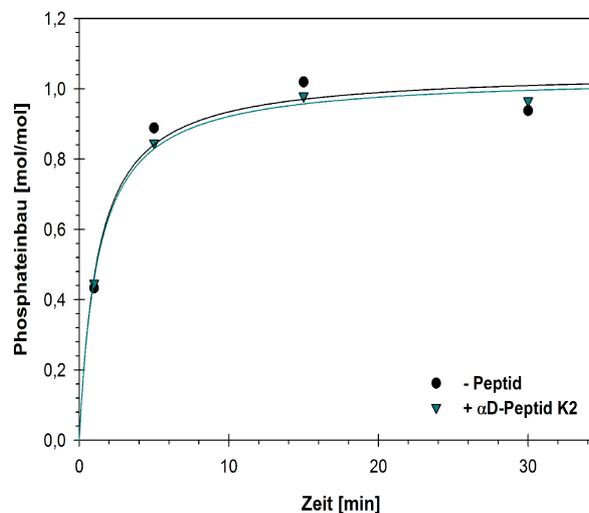


Abbildung 4.9.3: Die Aktivität der dimeren Kinase wird nicht durch α D-Peptid K2 beeinflusst.

Dargestellt ist die Substratphosphorylierung von 0,5 μ M GST-IGF Δ C +/- 25 μ M α D-Peptid K2-Cys. Als Substrat wurden 25 μ M Tyrtide verwendet. Ausgewertet wurde die Phosphorylierung über den Paperassay. Aufgetragen ist der Phosphateinbau in das Substrat in Abhängigkeit von der Zeit.

Zusätzlich zu Tyrtide sollte noch ein bindendes Substrat von der dimeren Kinase in Anwesenheit des Peptids phosphoryliert werden. Hierzu wurde wie unter 4.8.3 beschrieben die PTB-Domäne verwendet. Anders als bei Tyrtide muss bei diesem Substrat eine produktive Bindung an das Bindemotiv in der Juxtamembrandomäne erfolgen, damit eine effektive Phosphorylierung stattfinden kann. Es wurden 25 μM GST-PTB₃₇₀ durch 0,5 μM GST-IGF ΔC in An- und Abwesenheit von 25 μM αD -Peptid K2 zeitabhängig phosphoryliert und über SDS-PAGE ausgewertet (Abb. 4.9.4). Auch die Phosphorylierung der PTB-Domäne durch die dimere Kinase wird nicht von αD -Peptid K2-Cys beeinflusst. Das Peptid bindet also nicht wiegen-NT K3 an eine Substratbindestelle, sondern entfaltet seine Wirkung nur im Dimerisierungs- bzw. Aktivierungsprozess der Kinase.

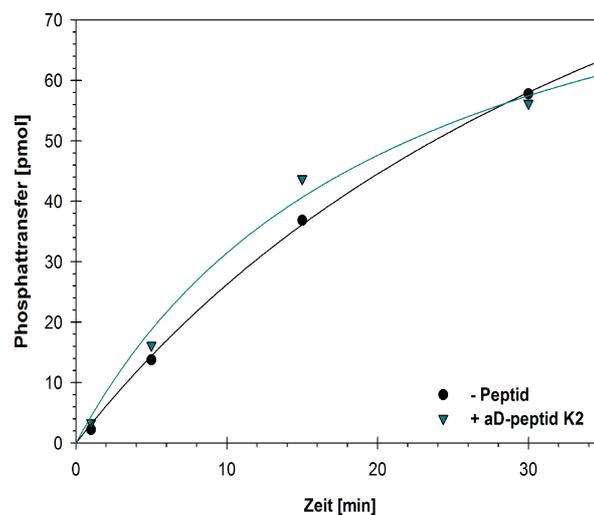


Abbildung 4.9.4: Die PTB-Phosphorylierung der dimeren Kinase wird nicht durch αD -Peptid K2 beeinflusst.

Graphische Auswertung der zeitabhängigen PTB-Phosphorylierung der dimeren Kinase. Eingesetzt wurden 0,5 μM GST-IGF ΔC , 2,5 μM GST-PTB₃₇₀ und 25 μM αD -Peptid K2-Cys. Ausgewertet wurde die Phosphorylierung über SDS-PAGE. Aufgetragen wurde der Phosphattransfer auf die PTB in Abhängigkeit von der Zeit.

4.9.4 Bindung von α D-Peptid K2-Cys verhindert die Autoaktivierung der monomeren Kinase

Wie in Kapitel 3.3.4 beschrieben, weisen dimere Kinasen im Vergleich zur monomeren Kinase eine aktive Konformation auf. Für das Peptid α D-Peptid-K2-Cys stellen die dimeren Kinasen kein Target dar, wohingegen die monomeren Kinasen von diesem Peptid in ihrer Aktivität gehemmt werden. Daraus kann geschlossen werden, dass das Peptid die Autoaktivierung der Kinase inhibiert. Um diese These zu untermauern, wurde der Einfluss von α D-Peptid-K2-Cys auf die autoaktivierte, monomere Kinase untersucht. Dazu wurde die monomere Kinase wie unter 4.8.5 beschrieben vorphosphoryliert, und in einer Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$ einer Substratphosphorylierung von $25 \mu\text{M}$ Tyrtide in Anwesenheit von $25 \mu\text{M}$ α D-Peptid K2-Cys unterzogen. Ausgewertet wurde der Versuch über den Paperassay. Das Peptid zeigt keinen Einfluss auf die aktivierte Kinase (Abb. 4.9.5). Die vorphosphorylierte Kinase zeigt in Anwesenheit des Peptids den gleichen Umsatz wie ohne Peptid. Dieser Versuch betätigt die Annahme, dass das Peptid mit der Autoaktivierung der monomeren Kinase interferiert.

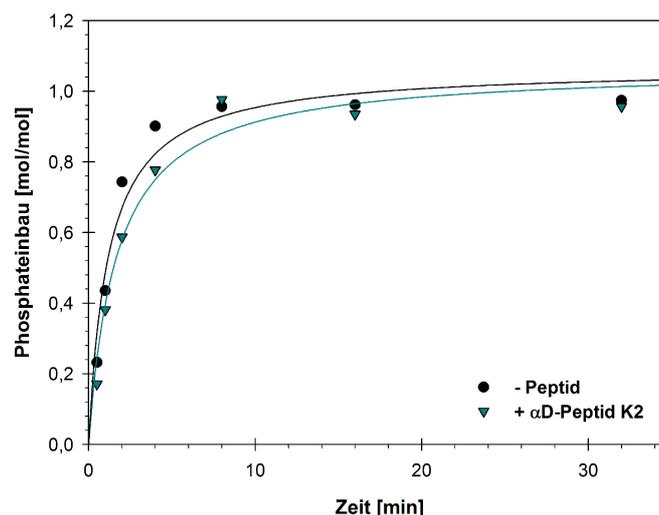


Abbildung 4.9.5: Die aktivierte, monomere IGF Δ C wird nicht von α D-Peptid K2 inhibiert.

Dargestellt ist die graphische Auswertung der zeitabhängigen Substratphosphorylierung von $25 \mu\text{M}$ Tyrtide durch $0,5 \mu\text{M}$ vorphosphorylierte IGF Δ C in An- und Abwesenheit von $25 \mu\text{M}$ α D-Peptid K2-Cys. Aufgetragen ist der Phosphateinbau in Tyrtide in Abhängigkeit von der Zeit.

Um die Autoaktivierung der monomeren Kinase in Anwesenheit des Peptids zu untersuchen, wurde eine konzentrationsabhängige Autophosphorylierung der monomeren Kinase durchgeführt. Da die monomere Kinase über Dimerisierung aktiviert wird, ist die Initialgeschwindigkeit der Kinase abhängig von ihrer Konzentration. Hier wurde die Autophosphorylierung steigender Kinasekonzentrationen (1-10 μM) \pm 3 μM Peptid ausgewertet. Dabei wurde die Initialgeschwindigkeit der jeweiligen Reaktion bestimmt und in Abhängigkeit von der eingesetzten Kinasekonzentration aufgetragen (Abb.4.9.6). In Anwesenheit des Peptids ist eine Kinasekonzentration von 8-10 μM notwendig damit sich die Kinase autoaktiviert. Ohne das Peptid reicht eine Kinasekonzentration von 4-5 μM aus. Das heißt, die Autoaktivierung findet in Anwesenheit des Peptids dann statt, wenn die Kinase die Peptidkonzentration um etwa das Doppelte überschreitet.

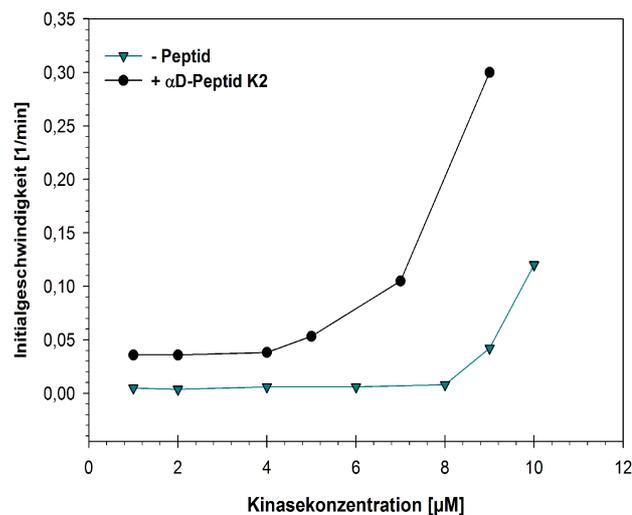


Abbildung 4.9.6: αD -Peptid K2-Cys inhibiert die Autoaktivierung der monomeren IGF ΔC .

Graphische Auswertung der konzentrationsabhängigen Autophosphorylierung der monomeren Kinase in An- und Abwesenheit von αD -Peptid K2-Cys. Es wurden steigende Kinasekonzentrationen (1-10 μM Kinase) \pm 3 μM αD -Peptid K2-Cys zeitabhängig autophosphoryliert. Ausgewertet wurden die jeweiligen Phosphorylierungen über die SDS-PAGE. Für die verschiedenen Kinasekonzentrationen wurde die Initialgeschwindigkeit bestimmt und in Abhängigkeit von der Kinasekonzentration aufgetragen.

4.9.5 Der Dimerisierungsprozess wird nicht beeinträchtigt

Um den Einfluss des Peptids α D-Peptid K2-Cys auf den Dimerisierungsprozess zu untersuchen, wurde die Substratphosphorylierung der katalytisch inaktiven Kinasemutante des IR, IRKD-D1120A-His, wie unter 4.8.6 beschrieben, untersucht. Es wurden $5 \mu\text{M}$ IRKD-D1120A-His durch $0,5 \mu\text{M}$ vorphosphorylierte IGF Δ C +/- $45 \mu\text{M}$ α D-Peptid K2 unter Standardbedingungen phosphoryliert. Inhibitor und Kinase wurden für 20 min bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ vorinkubiert. Ausgewertet wurde die Phosphorylierung über die SDS-PAGE. Die graphische Auswertung des Versuchs ist in Abbildung 4.9.7 gezeigt. Aufgetragen ist der Phosphateinbau in die katalytisch inaktive Kinase gegen die Zeit. Es zeigt sich, dass das Peptid keinen Effekt auf die Phosphorylierung der IRKD-D1120A-His durch die vorphosphorylierte IGF Δ C hat. Das Peptid beeinflusst nicht die Dimerisierung der monomeren Kinase.

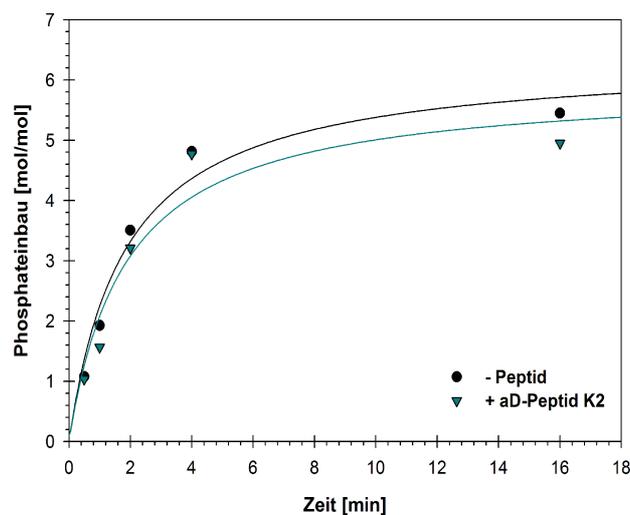


Abbildung 4.9.7: Der Dimerisierungsprozess wird nicht beeinträchtigt.

Dargestellt ist die graphische Auswertung der Phosphorylierung der katalytisch inaktiven IRKD-D1120A-His durch die vorphosphorylierte, aktive IGF Δ C in An- und Abwesenheit von α D-Peptid K2-Cys. Bevor das inaktive Enzym als Substrat bedient werden kann, muss eine produktive Dimerisierung zwischen beiden Kinasen erfolgen. $5 \mu\text{M}$ IRKD-D1120A-His wurden durch $0,5 \mu\text{M}$ vorphosphorylierte IGF Δ C +/- $50 \mu\text{M}$ α D-Peptid K2-Cys phosphoryliert. Ausgewertet wurde die Phosphorylierung über die SDS-PAGE. Aufgetragen ist der Phosphateinbau in das Substrat gegen die Zeit.

4.9.6 Die monomere Kinase wird in ihrer inaktiven Konformation fixiert

Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass das Peptid den Konformationsübergang von inaktiver zu aktiver Struktur inhibiert. Diese Vermutung ist insofern sinnvoll, da das Peptid im Bereich der α D-Helix/hinge region bindet. Dieser flexible Bereich ist maßgeblich an dem Konformationsübergang zwischen inaktiver und aktiver Kinasestruktur beteiligt. Um diese Konformationsänderung zu zeigen, eignet sich insbesondere die Limitierte Proteolyse mittels Trypsin. Dieser Ansatz wurde entwickelt, um die durch Aktivierung ausgelöste Konformationsänderung der Aktivierungsschleife zu untersuchen¹³⁴. Innerhalb der Aktivierungsschleife der Kinasedomäne des IR sowie IGF-1R gibt es eine Spaltstelle für Trypsin, R1137 (Nummerierung vom IGF-1R). Versuche haben gezeigt, dass die aktivierte Kinase eine offene Konformation besitzt und gespalten werden kann, wohingegen die inaktive Kinase eine geschlossene Konformation aufweist und somit an dieser Stelle nicht gespalten wird^{41,134}. Die Zugabe von hohen Konzentrationen an ADP reicht aus, das Gleichgewicht in Richtung der aktiven Konformation zu verschieben, sofern es sich um eine intakte Kinase handelt⁹. Um zu untersuchen, ob die Peptide die inaktive Konformation der Kinase stabilisieren, wurde die limitierte Proteolyse mittels Trypsin durchgeführt.

Im Spaltungsansatz wurden 3 μ M monomere IGF1C in An- und Abwesenheit von 45 μ M α D-Peptid-K2-Cys eingesetzt. Zur Kontrolle wurde ein Spaltungsansatz der Kinase in Anwesenheit des Kontrollpeptids durchgeführt. Die Spaltung wurde in 50 mM Tris pH 7,5, 30 mM MgCl₂ und 2 mM DTT und mit bzw. ohne Zugabe von 10 mM ADP durchgeführt⁹. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Trypsin gestartet. Die Spaltung lief für 7 min bei Raumtemperatur und wurde durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt. Anschließend wurden die Ansätze auf einer 15 % SDS-PAGE analysiert (Abb. 4.9.8). Zur Kontrolle wurden alle Ansätze auch ohne Trypsin aufgetragen. Die monomere Kinase allein wird bei Zugabe von Trypsin ohne ADP nicht gespalten. Trypsin hat keinen Zugang zur Aktivierungsschleife, die Kinase liegt in der inaktiven Struktur vor. Durch Zugabe von ATP findet eine Konformationsänderung statt, die Kinase wird nun durch das Trypsin gespalten. Zusätzlich zu der Bande der ungeschnittenen Kinase bei ca. 37 kDa treten die zwei Spaltungsfragmente von etwa 24 und 12 kDa auf. Gleiches gilt für die Kinase in Anwesenheit des Kontrollpeptids. In Anwesenheit von α D-Peptid K2-Cys findet jedoch selbst bei Zugabe von ADP keine Spaltung statt. Der durch ADP eingeleitete Konformationsübergang in die aktive Struktur wird durch

die Bindung von α D-Peptid K2-Cys verhindert .

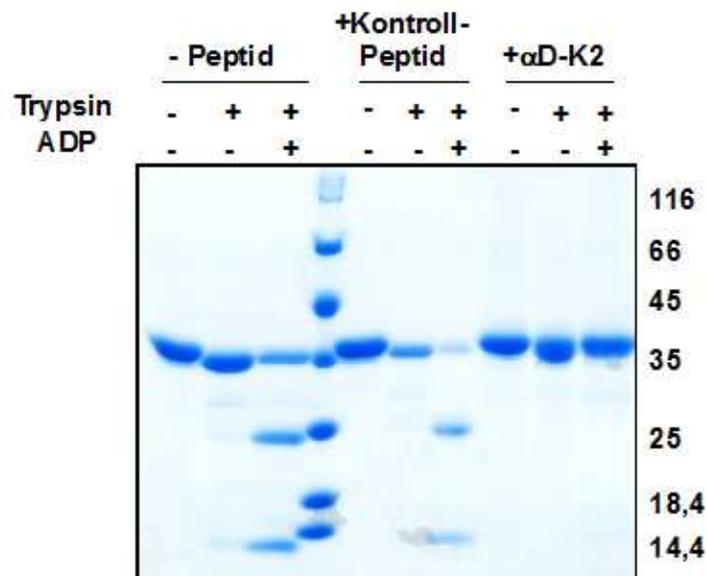


Abbildung 4.9.8: Die Bindung von α D-Peptid K2-Cys fixiert die Kinase in ihrer inaktiven Konformation.

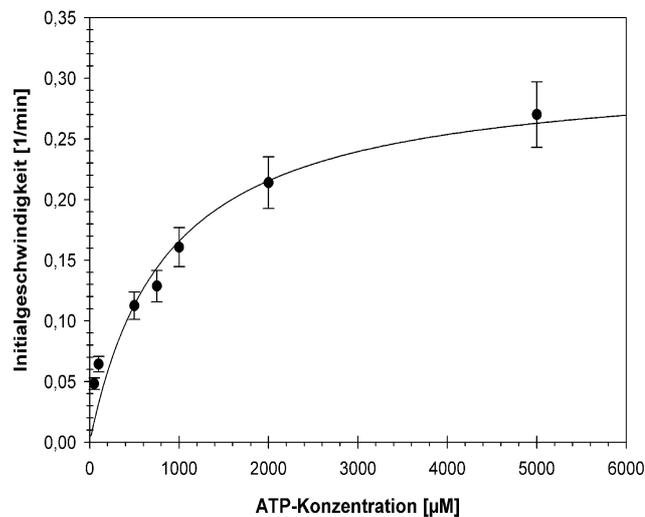
Gezeigt ist die 15 % SDS-PAGE zur Dokumentation der limitierten Proteolyse der IGF1R durch Trypsin. 3 μ M Kinase +/- 45 μ M α D-Peptid K2-Cys bzw. 150 μ M Kontrollpeptid wurden in An- und Abwesenheit von 10 mM ADP durch 0,1 μ M Trypsin für 7 min bei RT gespalten. Die ungespaltene Kinase läuft bei 37 kDa, die entstehenden Spaltprodukte laufen bei 25 und bei 12 kDa.

4.9.7 Beeinflusst α D-Peptid K2-Cys die Bindung von ATP?

Da das Peptid außerhalb der ATP-Bindestelle bindet, sollte es die Kinase nach einem nicht ATP-kompetitiven Mechanismus inhibieren. Um dies zu bestätigen, wurde der K_M für ATP der monomeren Kinase in Anwesenheit von α D-Peptid K2-Cys bestimmt und mit dem der Kinase in Abwesenheit des Peptids verglichen. Zum einen wurde ein gekoppelter Assay mit 1 μ M IGF1R, 200 μ M Tyrtide und 10 μ M unmarkiertem α D-Peptid K2 durchgeführt. Die erhaltene Michaelis-Menten Kurve zur Bestimmung der kinetischen Parameter ist in Abbildung 4.9.9.A gezeigt. Zum Vergleich wurde ein radioaktiver Assay mit 1 μ M IGF1R, 200 μ M Tyrtide und 10 μ M markiertem α D-Peptid K2 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte über den Paperassay. Die Michaelis-Menten-Kurve ist im Anhang dargestellt (Abb. 9.20.1, S.178). Ein Vergleich der Daten mit denen der monomeren Kinase in Abwesenheit des Peptids ist Abbildung 4.9.9.B zu sehen. Der K_M -Wert für ATP wird durch das Peptid nicht verändert, die

Affinität zum Nucleotid bleibt gleich. Nur k_{cat} wird durch die Bindung des Peptids herabgesetzt, die Effizienz der Katalyse also verringert. Ein Vergleich der Daten für das markierte Peptid (gekoppelter Assay) und unmarkierte Peptid (radioaktiver Assay) bestätigt, dass das Label keinen Einfluss auf die inhibitorische Wirkung hat.

A)



B)

	Gekoppelter Assay		Radioaktive Substratphosphorylierung	
	K_M	k_{cat}	K_M	k_{cat}
- Peptid	801,02 +/- 85,92 µM	0,027 +/- 0,002 s ⁻¹	873,87 +/- 89,02µM	0,042 +/- 0,004 s ⁻¹
+ αD-Peptid K2-Cys	890,94 +/- 45,36µM	0,003 +/- 0,0004s ⁻¹	1087,15 +/- 124,92 µM	0,004 +/- 0,001 s ⁻¹

Abbildung 4.9.9: Ermittlung der kinetischen Daten für die Substratphosphorylierung der monomeren Kinase in Anwesenheit von αD-Peptid K2-Cys.

A: Michaelis-Menten Kurve der ATP-abhängigen Substratphosphorylierung der monomeren Kinase in Anwesenheit von αD-Peptid K2-Cys. Zur Ermittlung des K_M für ATP und k_{cat} in Anwesenheit der Peptide wurde ein gekoppelter Assay durchgeführt. Es wurden 1 µM IGFΔC, 200 µM Tyrtide und 10 µM αD-Peptid K2 verwendet. Aus der Michaelis-Menten-Kurve werden die kinetischen Daten ($K_M = 858 \mu\text{M}$; $k_{cat} = 0,005 \text{ s}^{-1}$) bestimmt. **B:** Tabelle zum Vergleich der kinetischen Parameter ermittelt aus dem gekoppeltem Assay bzw. dem radioaktiven Assay. Die Werte entsprechen dem arithmetischen Mittelwert mehrerer Messungen. Der angegebene Fehler entspricht der Standardabweichung.

4.9.8 Bestimmung des IC₅₀

Auch für das Peptid α D-Peptid K2-Cys wurde wie in Kapitel 4.8.8 beschrieben der IC₅₀ bestimmt. Da für 1 μ M Kinase nur wenig Konzentrationen unterhalb des IC₅₀ einen Abfall der Kinaseaktivität zeigten, wurde zusätzlich der Wert für 3 μ M Kinase bestimmt. Hier wurde der Phosphattransfer auf Tyrtide nach 20 min bestimmt, ein Zeitpunkt, bei dem 3 μ M Kinase in Abwesenheit des Peptids den maximalen Transfer auf das Substrat erreicht hat. Die Kinaseaktivität mit ansteigender Inhibitorkonzentration wurde in Bezug gesetzt zur Aktivität in Abwesenheit des Inhibitors (Abb. 4.9.10). Die Kinaseaktivität ohne Peptid wurde gleich 100 % gesetzt. Aufgetragen wurde die Kinaseaktivität gegen die Konzentration des Peptids. Für 3 μ M Kinase wurde ein IC₅₀ von 5,51 μ M ermittelt. Die graphische Auswertung für 1 μ M Kinase ist im Anhang (Abb. 9.20.2, S.178) abgebildet, hier wurde ein Wert von 1,80 μ M ermittelt.

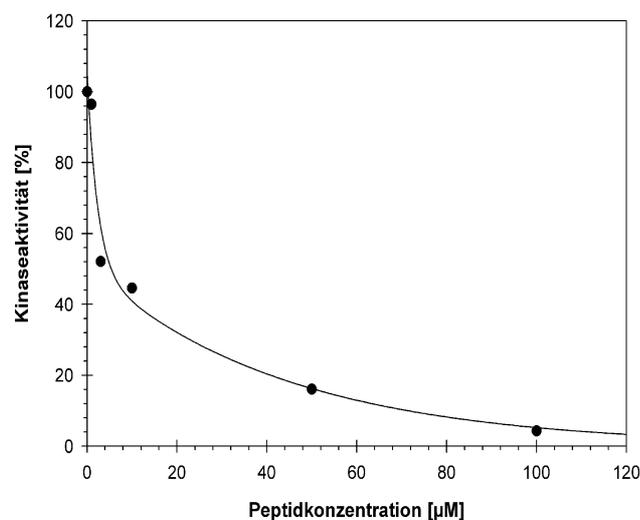


Abbildung 4.9.10: IC₅₀-Bestimmung für 3 μ M Kinase.

Zur Bestimmung des IC₅₀ wurde die Kinaseaktivität bei steigender Peptidkonzentration bestimmt und in Bezug gesetzt zur Kinaseaktivität in Abwesenheit des Peptids. Dazu wurden 150 μ M Tyrtide durch 3 μ M Kinase bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen phosphoryliert. Die Kinaseaktivität ohne Inhibitor wurde gleich 100 % gesetzt. Die Auftragung der Kinaseaktivität gegen die Peptidkonzentration liefert den IC₅₀ von 5,51 μ M bestimmt.

4.9.9 Nachweis der Bindung der Peptide an die Kinase

Auch für die Peptide gegen die α D-Helix/*hinge region* sollte die Bindung an die Kinase über den *Far Western* nachgewiesen werden (vgl. 4.8.9). Dazu wurden die IGF Δ C und die IR Δ C sowie die Negativkontrolle GST mittels Dot-Blot auf der Membran fixiert. Nach dem Abblocken erfolgte die Inkubation mit den markierten Peptiden α D-Peptid K2-Cys und K3-Cys. Dokumentiert wurde die Interaktion unter UV. In Abbildung 4.9.11 ist der *Far Western* zum Nachweis der Bindung der Peptide α D-Peptid K2-Cys und K3-Cys an die IGF Δ C gezeigt. In A und B erfolgte die Dokumentation unter UV, C und D zeigen die reversible Färbung in Ponceau Rot zur Dokumentation der aufgetragenen Proteinmengen. Für beide Peptide wird eine Bindung an die IGF Δ C und an die IR Δ C detektiert. Sowohl bei α D-Peptid K2-Cys als auch beim Peptid α D-Peptid K3-Cys) ist die Fluoreszenz bei den Spots der IR Δ C deutlich schwächer als bei denen der IGF Δ C. In beiden Fällen wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen (Abb. 4.9.11.C und D). Dieses Ergebnis ist verwunderlich, da die Peptide auf beide Kinasen den gleichen inhibitorischen Einfluss zeigten.

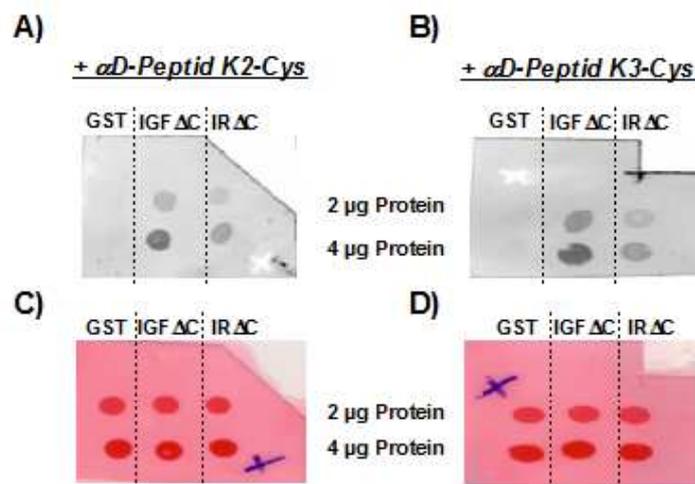


Abbildung 4.9.11: *Far Western* zum Nachweis der Bindung von α D-Peptid K2-Cys und K3- an die IGF Δ C.

Dargestellt sind die Membranen des *Far Western*, auf die 2 bzw. 4 μ g der Kinasen IGF Δ C und IR Δ C und GST über den Dot-Blot fixiert wurden. Die Membranen wurden mit markierten α D-Peptid K2-Cys bzw. α D-Peptid K3-Cys inkubiert. **A und B:** Membran unter UV. Es werden nur die markierten Peptide sichtbar. **C und D:** Membran angefärbt mit Ponceau rot.

5 Diskussion

Proteinkinasen regulieren Prozesse wie die Proliferation, Differenzierung, Migration und das Überleben einer Zelle. Daher führen Defekte in der Kinaseregulation häufig zur Bildung von Tumoren und nachfolgend zur Aufrechterhaltung der Tumorphysiologie⁸⁷. Die zielgerichtete Inhibition von Proteinkinasen hat sich daher als attraktive Strategie in der Entwicklung von Krebs-Therapeutika herausgestellt. Sie verspricht eine verbesserte Wirksamkeit der Therapie mit verminderten toxischen Nebenwirkungen⁹⁰⁻⁹². Die Fähigkeit des *insulin-like growth factor-1 receptor* (IGF-1R), gleichzeitig proliferative und anti-apoptotische Signale zu initiieren, macht auch diesen Rezeptor zu einem möglichen Target für die Entwicklung von Inhibitoren¹¹⁴. Die gängigen Kinaseinhibitoren sind ATP-kompetitive, niedermolekulare Inhibitoren. Die ATP-Bindestelle ist jedoch unter Kinasen hoch konserviert. So weisen solche Inhibitoren meist keine hohe Spezifität auf, was wiederum zu Nebenwirkungen führen kann. Gerade im Falle des IGF-1R ist eine spezifische Inhibition essentiell. Der IGF-1R weist innerhalb der Kinasedomäne eine Sequenzhomologie von 85 % zum Insulinrezeptor auf⁵³. Eine gleichzeitige Inhibition des IR kann fatale Konsequenzen haben wie die Ausbildung eines diabetischen Phänotyps. Ein weiterer Nachteil der niedermolekularen Inhibitoren ist, dass meist nur ein Aminosäurerest in der Kinase für die Bindung des Inhibitors essentiell ist, der sogenannte „Gatekeeper“-Rest. Oft reicht der Austausch dieses einen Restes in der Kinase aus, um die Inhibition wieder aufzuheben^{135,136}. Daher ist die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von Inhibitor-resistenten Kinase-Mutanten sehr hoch¹⁰³. Daher sollten für eine spezifische und auch nachhaltige Inhibition der Kinaseaktivität andere Wege eingeschlagen werden. Der Fokus sollte sich weg bewegen von den katalytisch essentiellen, konservierten Bereichen hin zu intrinsischen, einzigartigen, regulatorischen Bereichen einer Kinase.

5.1 Welche Bereiche einer Kinase kommen für eine spezifische Inhibition in Frage?

Ziel der Arbeit war die Entwicklung strukturbasierter, peptidischer Kinaseinhibitoren gegen den IGF-1R. Dabei machte ich mir zu Nutzen, dass Kinasen generell über Dimerisierung aktiviert werden³. Das gilt selbst für die konstitutiven Dimere der Insulinrezeptorfamilie¹²⁴. Daher basierte mein Ansatz zur Inhibition des IGF-R auf der Unterbindung der Dimerisierung über Konkurrenz mit sequenzspezifischen Peptiden. Realisiert wurde dieses Konzept an zwei

Bereichen des IGF-1R:

- Am Juxtamembranbereich: Hier ist ein autoregulatorischer Bereich lokalisiert (s. Kap. 3.3.3). Die Kinase selbst verfügt über eine niederaffine, aber spezifische „Dimerisierungsdomäne“ (s. Kap. 3.3.4.1). Über limitierte Proteolyse mit Chymotrypsin konnte unsere Arbeitsgruppe eine Dimerisierungsdomäne der Kinase im Juxtamembranbereich lokalisieren (Parvaresh, unveröffentlichte Ergebnisse). Ein Peptid, das in diesem Bereich bindet, könnte mit der Dimerisierung der Kinase interferieren. In diesem Bereich existieren zudem große Sequenzunterschiede zum nah-verwandten Insulinrezeptor (IR) (vgl. Abb.5.5.1). Diese Sequenzunterschiede versprechen die Generierung von sehr spezifischen Inhibitoren.
- Am Bereich aus α D-Helix/*hinge region*: Die *hinge region* ist maßgeblich an der Konformationsänderung zwischen inaktiver und aktiver Kinase-Konformation beteiligt. Die dimeren Kristallstrukturen der löslichen Kinasedomänen, in denen die beiden Monomere über die Fläche der α D-Helix dimerisieren, sprechen dem Bereich eine Rolle in der Dimerisierung zu⁴². Die Rolle der α D-Helix in der Substratbindung wurde schon für einige Kinasen beschrieben^{137,138,21,139}. Dieser Bereich ist hoch konserviert zwischen Kinasen. IR und IGF-1R unterscheiden sich hier nur um eine Aminosäure. Allerdings gibt es in diesem Bereich große strukturelle Unterschiede zwischen den inaktiven Konformationen der IGF-Kinase und IR-Kinase^{18,42}. Ein aus Vorarbeiten stammendes Peptid aus der α D-Helix/*hinge region* hemmt die Kinase des IGF-1R. In dieser Arbeit konnte mittels Kreuzmutationsexperimenten gezeigt werden, dass dieses Peptid an die *hinge region* der IGF-1R-Kinase bindet (Kap. 4.6).

Für die Suche nach bindenden Peptiden sollte eine Technik gewählt werden, die mögliche Interaktionspartner nicht bereits im Voraus einschränkt. Hierbei fiel die Wahl auf das *Phage Display* (vgl. Kap. 5.3). Für die Charakterisierung der aus dem *Phage Display* erhaltenen Peptidsequenzen wurde als Modell-Kinase die lösliche Kinasedomäne des IGF-1R verwendet. Diese wurde im Laufe der Arbeit kloniert, expremiert, gereinigt und die grundlegenden kinetischen Parameter bestimmt.

5.2 Generierung und Charakterisierung der Kinasen

Als Modell-Enzym wurde in dieser Arbeit die lösliche, C-terminal deletierte Kinase des IGF-1R. Um eine mögliche Interaktionen von aus dem *Phage Display* gewonnenen Peptide mit

regulatorischen Regionen bzw. Dimerisierungsdomänen im C-Terminus des Rezeptors ausschließen zu können, wurde dieser Bereich deletiert. Die Kinase wurde als Monomer (IGFAC) sowie als GST-getagtes Dimer (GST-IGFAC) generiert. GST-Fusionsproteine sind nicht-kovalente stabile Dimere, die sich während der Proteinsynthese formen¹⁴⁰. Die über GST-dimerisierten Kinasen sind ein Modell für den Hormon-gebundenen, aktivierten Rezeptor, ohne dass es *per se* einer Phosphorylierung in der Aktivierungsschleife bedarf. Sie weisen die aktive, offene Struktur der Aktivierungsschleife auf⁴¹. Die Kinasekonstrukte wurden über Standardmethoden nahezu homogen erhalten und mit einem gegen die Kinasedomäne gerichtetem Antikörper nachgewiesen. Aus $5\text{-}6 \times 10^8$ Sf9-Zellen konnten 4-5 mg dimere Kinase bzw. 1-2 mg monomere Kinase isoliert werden.

Zur Charakterisierung der Kinasen wurden die kinetischen Daten der Substratphosphorylierung bestimmt. Um die ATP-Affinität und die katalytische Effizienz zu ermitteln, wurden mit Hilfe des gekoppelten Assays Michaelis-Menten-Kurven aufgenommen (vgl. Kap. 4.4.2 bzw. 4.5.2). Bei den Untersuchungen der monomeren Kinase wurde beobachtet, dass die Umsatzkurven einen mehrphasigen Verlauf zeigten, was auf eine Überlagerung mehrerer Prozesse hindeutet. Eine Ursache hierfür könnte sein, dass die Kinase in der ersten Phase unphosphoryliert vorliegt und eine mäßige katalytische Effizienz aufweist. Dann findet Autophosphorylierung statt und der Phosphoryltransfer kann deutlich schneller und effizienter erfolgen¹⁴¹. Daher wurden für die Berechnung der Initialgeschwindigkeiten für die Michaelis-Menten-Kurve nur die Steigungen in der ersten Katalysephase ausgewertet. ATP-Konzentration oberhalb 5 mM wurden nicht mehr ausgewertet, da hier eine Substratinhibition statt zu finden scheint¹³¹. Dennoch konnte mit den vorhandenen ATP-Konzentrationen eine Sättigung erreicht werden, so dass eine Bestimmung der kinetischen Daten möglich war. Um diese Werte zu überprüfen, wurden für die monomere Kinase zusätzlich Michaelis-Menten-Kurven basierend auf dem radioaktiven Assay aufgenommen. Die ermittelten kinetischen Parameter beider Methoden stimmen innerhalb der Fehlergrenzen überein. Die kinetischen Daten (K_M - und k_{cat} -Werte) der Kinasen sind in Tabelle 5.1 aufgeführt. Ein Vergleich der kinetischen Daten für die monomere und die dimere IGFAC mit den Daten unserer Arbeitsgruppe für die C- und N-terminal deletierte, monomere Kinase des IGF-1R (IGF Δ N Δ C) sowie die GST-getagte Variante dieser Kinase (GST-IGF Δ N Δ C)¹³¹ zeigt, dass diese gut korrelieren. Ein Vergleich der Parameter der monomeren IGFAC mit denen der

dimeren verdeutlicht, dass durch die GST vermittelte Dimerisierung die ATP-Affinität um den Faktor 3 gesenkt wird und die katalytischen Effizienz um das 17-fache gesteigert wird. Dieses Ergebnis bestätigt das von unserer Arbeitsgruppe veröffentlichte Modell zur Kinaseaktivierung. Die GST-Kinasen weisen eine aktive Konformation der Aktivierungsschleife auf, was zu einem erleichterten Zugang des Nucleotids sowie einer signifikant gesteigerten Aktivität führt ⁴¹.

Tabelle 5.1: Vergleich der Michaelis-Menten-Parameter für ATP mit den Daten unserer Arbeitsgruppe für die IGF Δ NAC und GST-IGF Δ NAC ¹³¹.

Die Werte entsprechen dem arithmetischen Mittelwert mehrerer Messungen. Der angegebene Fehler entspricht der Standardabweichung.

	K_M [μ M]	k_{cat} [s^{-1}]
GST-IGF Δ C	247,84 +/- 59,02	0,62 +/- 0,07
IGF Δ C, radioaktiver Assay	873,87 +/- 89,02 μ M	0,042 +/- 0,004 s^{-1}
IGF Δ C, gekoppelter Assay	801,02 +/- 85,92 μ M	0,037 +/- 0,002 s^{-1}
GST-IGF Δ NAC	482	0,55
IGF Δ NAC	>1000	0,03

5.3 Phage Display

Mit dem *Phage Display* wurde in dieser Arbeit eine Methode gewählt, mit der aus einer nahezu unbeschränkten Anzahl an verschiedenen, randomisierten Peptiden solche heraus gefiltert werden, die spezifisch an ein bestimmtes Zielprotein binden. Als Target für das *Phage Display* wurde zum einen der Juxtamembranbereich des IGF-1R (GST-IGF-NT) verwendet. Zur Kontrolle der Spezifität wurde das *Phage Display* ebenfalls gegen den Juxtamembranbereich des IR (GST-IR-NT) durchgeführt. Zur Optimierung des aus Vorarbeiten stammenden Peptidinhibitors wurde das *Phage Display* gegen ein Peptid aus der Region der α D-Helix/*hinge region* durchgeführt. Hier stellte sich die Frage, ob es möglich ist, gegen ein Target aus nur 22 Aminosäuren zu „screenen“. Das kleine Peptid könnte nicht die gleiche Struktur aufweisen wie die entsprechende Region im nativen Protein. Es wäre also möglich gewesen, dass sich spezifisch bindende Sequenzen gegen das Target finden, die aber nicht an die entsprechende Region in der nativen Kinase binden. Das *Phage Display* gegen

GST-IGF-NT lieferte zwei Sequenzen (Abb. 5.3.1.A). Bemerkenswert ist, dass eine dieser Sequenzen (IGF-NT K1) identisch ist mit einer Sequenz, die gegen GST-IR-NT (IR-NT K2) gefunden wurde (s. Abb. 4.7.1 S.48). Klon IGF-NT K3 weist keine Ähnlichkeit zu den Klonen gegen GST-IR-NT auf.

Das *Phage Display* gegen das α D-Peptid ergab zwei Sequenzen, die keine Sequenzhomologie zueinander aufwiesen (Abb. 5.3.1.B). Die Sequenz des Klons α D-Peptid K2 weist jedoch Homologie zu der Sequenz des Targetpeptids auf.

Dass die Methode des *Phage Displays* korrekt durchgeführt wurde, konnte über eine Selektion gegen Streptavidin bestätigt werden. Zudem wurde im ELISA eine Bindung der selektierten Phagenklone gegen Plastik und GST ausgeschlossen.

A)	Target:	Juxtamembrandomäne
	IGF-NT K1	TQWLPSLLEHPM
	IGF-NT K3	HLHVHVKFADRQ
B)	Target:	LKSYLRSLRPEMENN
	α D-Peptid K2	HSALRPPASAAP
	α D-Peptid K3	TTPDNSVFAAS

Abbildung 5.3.1: Darstellung der aus dem Phage Display gegen die Juxtamembrandomäne (A) und der α D-Helix/hinge region (B) erhaltenen Sequenzen.

Die Peptidsequenzen IGF-NT K1 und IGF-NT K3 wurden kommerziell von der Firma Coring System Diagnostix GmbH bezogen, die diese mittels Festphasensynthese generiert. Anschließend mussten die Peptide über *Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC) gereinigt werden. Als Nachteil erwies sich, dass die kommerziellen Peptide nur in geringen Mengen bezogen werden konnten. Als ein weiterer Nachteil stellte sich heraus, dass es nicht möglich war, die Peptide mit einem Fluoreszenz-Marker zu modifizieren. Auf Grund dessen wurde im Laufe der Arbeit eine Technik entwickelt, kleine Peptide in *E.coli* zu exprimieren.

5.4 Generierung der Peptide in *E.coli*

In der Regel lassen sich kleine Peptide in *E.coli* nicht exprimieren, da sie leicht abgebaut werden. Daher wurde eine Methode entwickelt, in der Peptide als Fusionspeptide mit einem gut exprimierbaren „Carrier“-Protein exprimiert werden. Dazu wurde zunächst ein Expressionsvektor generiert. Dieser ist so konzipiert, dass er N-terminal zum „Carrier“-Protein einen His-Tag und C-terminal der Peptidsequenz ein reaktives Cystein vermittelt. Dieses kann mit einem Fluoreszenzfarbstoff modifiziert werden. Zwischen „Carrier“-Protein und Peptid befindet sich eine Protease-Erkennungssequenz, so dass das Peptid vom „Carrier“-Protein inklusive His-Tag abgetrennt werden kann. Über die in dieser Arbeit entwickelte und optimierte Methode zur Expression, Zellyse, Aufreinigung und Markierung konnten die Peptide nahezu homogen erhalten werden. Die Methode der Generierung kleiner Peptide in *E.coli* ist viel kostengünstiger als die chemische Generierung über Festphasensynthese. Die Peptidsequenz kann einfach über Oligonucleotid-Linker in den im Zuge dieser Arbeit generierten Expressionsvektor inseriert werden. Dadurch ist die Länge der Peptidsequenz praktisch unbegrenzt. Wenn das Plasmid einmal generiert wurde, können viel größere Mengen in kurzer Zeit über die Überexpression in *E.coli* generiert werden. Zudem ist die Reinheit der Peptide aus *E.coli* sehr viel größer als die der chemisch generierten Peptide. Bei der Festphasensynthese kann es durch eine nicht quantitative Kupplungsreaktion zur Bildung von Fehlsequenzen innerhalb des Peptids kommen. Je größer das gewünschte Peptid, um so größer ist die Verunreinigung durch Peptide mit Fehlsequenzen. Somit ist bei der chemischen Synthese von Peptiden die Ausbeute bzw. Reinheit abhängig von der Anzahl an Reaktionsschritten und deren Umsetzungsgrad. Die Synthese ist zudem auf Peptide einer Größe von 30-40 Aminosäuren begrenzt.

5.5 Inhibitionswirkung der aus Phage Display gewonnenen Peptide

Die von mir beschriebenen Peptide hemmen die Aktivität der monomeren Kinase (vgl. Kap. 4.8.1 bzw. 4.9.1). Die Peptide, die gegen den Juxtamembranbereich selektioniert wurden, inhibieren signifikant die Auto- und Substratphosphorylierung der monomeren IGF1R, gleichgültig, ob chemisch synthetisiert oder aus *E.coli* generiert. Ein Kontrollpeptid mit randomisierter Sequenz zeigte wie erwartet keine Inhibition. Der inhibitorische Einfluss der Peptide ist somit sequenzspezifisch. Da eines der Peptide gegen die Juxtamembranregion des IGF-1R (IGF-NT K1) auch eine Inhibition der Kinase des IR

zeigte, wurde dieses von den folgenden Untersuchungen ausgeschlossen (vgl. Kap. 4.8.4).

Die Peptide gegen die α D-Helix/ *hinge region*, die in *E.coli* generiert wurden, unterscheiden sich in der Effizienz ihrer Inhibition. Während das Peptid K2 den Phosphattransfer der Kinase bis zu 90 % herabsetzte, schien Peptid K3 die Reaktion nur zeitlich zu verzögern. Aus diesem Grunde wird nicht weiter auf dieses Peptid eingegangen. Für den inhibitorischen Einfluss des Peptids K2 machte es keinen Unterschied, ob dieses in markierter oder unmarkierter Form eingesetzt wurde.

Das angestrebte Ziel, einen Inhibitor gegen die Aktivierung der Kinase über Konkurrenz mit Interaktionspartnern gegen zwei unterschiedliche regulatorische Bereiche zu generieren, war erfolgreich. Das *Phage Display* stellt eine geeignete Methode dar nach Bindungspartnern zu suchen und konnte auf kleine Peptide als Target ausgeweitet werden.

Zur Charakterisierung der inhibitorischen Stärke der Peptide IGF-NT K3 und α D-Peptid K2 wurde der IC_{50} für die monomere IGFAC bestimmt (Kap. 4.8.8 bzw. 4.9.8). Dieser Parameter gibt die Inhibitorkonzentration an, bei der die Kinase nur noch 50 % ihrer Aktivität zeigt und ist damit ein Maß für die Inhibitionsstärke. In Tabelle 5.2 sind Literaturdaten für den IC_{50} Wert verschiedener Inhibitoren angegeben.

Im Falle von IGF-NT K3 wurde für 1 μ M Kinase ein IC_{50} von 25,18 μ M ermittelt. Im Vergleich zu den niedermolekularen, ATP-kompetitiven¹¹⁴ bzw. Substratkompetitiven Inhibitoren^{113,104} für die Kinase des IGF-1R erscheint der Wert für IGF-NT K3 sehr hoch zu sein. Allerdings muss hierbei beachtet werden, dass diese niedermolekulare Inhibitoren schon durch Modulation der Reste optimiert wurden. Außerdem wurden zur Bestimmung des IC_{50} sehr geringe Kinasekonzentrationen im nanomolaren Bereich gewählt, während der IC_{50} für IGF-NT K3 für 1 μ M Kinase bestimmt wurde. Dennoch liegt der IC_{50} für peptidische Inhibitoren deutlich höher als für niedermolekulare. Die aufgelisteten Peptide sind alle strukturbasierte, aus regulatorischen Bereichen der jeweiligen Kinase abgeleiteten Inhibitoren und somit nicht optimiert^{142,132}. Ein Vergleich des IC_{50} für IGF-NT K3 mit diesen Peptiden erscheint sinnvoller. Hier werden in der Literatur Werte von 1,5-75 μ M angegeben. Somit liegt die Inhibitionsstärke von IGF-NT K3 im Bereich von anderen peptidischen Inhibitoren.

Im Falle von α D-Peptid K2 wurde für 1 μ M Kinase ein IC_{50} von 1,80 μ M ermittelt, für 3 μ M Kinase lag der Wert bei 5,51 μ M. Die Inhibition der IGF-Kinase durch α D-Peptid K2 ist somit deutlich stärker als die von IGF-NT K3. Ein Vergleich mit den Literaturdaten (Tab. 5.2)

zeigt, dass die Inhibitionsstärke von α D-Peptid K2 selbst mit der einiger niedermolekularer Inhibitoren mithalten kann. Der IC_{50} des Ausgangspeptid, α D-Peptid, lag bei 30 μ M. Die Optimierung des inhibitorischen Peptids gegen die α D-Helix/hinge region war somit erfolgreich.

Tabelle 5.2: Literaturdaten für den IC_{50} Wert für die Tyrosinkinase des IGF-1R, EGFR, des Stammzellofaktor-Rezeptors (c-Kit), der Src related Proteinkinase Lyn und der Ser/Thr Kinase Akt und PKA^{104,113,114,132,142}.

Kinase	Inhibitor	IC_{50}
IGF-1R	niedermolekulare, ATP-kompetitive Inhibitoren	0,05 - 6,1 μ M
IGF-1R	niedermolekulare, Substratkompetitive Inhibitoren	0,06 - 59 μ M
EGFR	niedermolekularer, ATP-kompetitiver Inhibitor <i>Iressa</i>	0,027 μ M
c-Kit	Peptid aus der Sequenz der Region der α D-Helix der c-Kit-Kinasedomäne	7 μ M
Lyn	Peptid aus der Sequenz der Region der HJ-Schleife und α G-Helix der Lyn-Kinasedomäne	1,5 μ M
Akt	Peptid aus der Sequenz der Region der HJ-Schleife und α G-Helix der Akt-Kinasedomäne	3 μ M
PKA	Peptid aus der Sequenz der A-Helix der PKA	75 μ M

Mit Hilfe eines ATP-abhängigen Substratphosphorylierungsassays konnte ausgeschlossen werden, dass die Peptide einen Einfluss auf die ATP-Bindung der Kinase haben (Kap. 4.8.7 bzw. 4.9.7). Die ermittelten kinetischen Daten sind in Tabelle 5.3 aufgelistet.

Die Peptide verändern nicht den K_M -Wert für ATP der IGF1R. Jedoch wird der k_{cat} und damit die katalytische Effizienz der Kinase durch die Peptide drastisch gesenkt. Hierbei muss allerdings bemerkt werden, dass auf Grund der niedrigen Kinaseaktivität in Anwesenheit der Peptide die Bestimmung der Initialgeschwindigkeit sehr schwierig war. Die Graphen der Umsatzkurven wiesen nur eine sehr geringe Steigung auf.

Die von mir gefundenen Peptide haben gegenüber den gängigen, ATP-kompetitiven Inhibitoren den Vorteil, dass sie nicht gegen die hohen ATP-Konzentrationen der Zelle konkurrieren müssen^{88,89}. Durch die hohe Konservierung der ATP-Bindestelle treten bei den gängigen Inhibitoren zusätzlich Komplikationen für die Spezifität der Inhibition auf, wie im folgenden Kapitel genauer diskutiert wird. Generell ist für die in dieser Arbeit generierten

peptidischen Inhibitoren zu erwarten, dass gegenüber den niedermolekularen Inhibitoren die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von Inhibitor-resistenten Kinasemutanten gering ist. Ein peptidischer Inhibitor weist erwartungsgemäß mehrere essentielle Bindestellen in der Kinase auf, so dass eine Mutation der Kinase allein die Inhibition nicht aufheben würde.

Tabelle 5.3: Vergleich der kinetischen Daten für die ATP-Abhängige Substratphosphorylierung der monomeren Kinase +/- Peptid.

Die Werte entsprechen dem arithmetischen Mittelwert mehrerer Messungen. Der angegebene Fehler entspricht der Standardabweichung. Für die Kinase ohne Peptid und + α D-Peptid K2 wurden die aus dem gekoppelten Assay ermittelten Daten angegeben. Die Daten in Anwesenheit von IGF-NT K3 stammen aus einem radioaktiven Assay.

	K_M [μ M]	k_{cat} [s^{-1}]
- Peptid	801,02 +/- 85,92 μ M	0,037 +/- 0,002 s^{-1}
+ IGF-NT K3	768,28 +/- 75,99 μ M	0,004 +/- 0,001 s^{-1}
+ α D-Peptid K2	890,94 +/- 45,36 μ M	0,003 +/- 0,0004 s^{-1}

5.5.1 Die Inhibition ist spezifisch

Ein großes Problem der gängigen Kinaseinhibitoren ist ihre Unspezifität. Inzwischen gibt es allerdings auch die Strategie, Multi-Target Inhibitoren zu entwickeln^{95,103,143}. Die meisten Krebserkrankungen haben mehrere molekulare Defekte zur Ursache¹⁴⁴. Außerdem kann die Inhibition einer spezifischen Kinase zur Resistenzbildung führen. Aus diesem Grund könnte man zu dem Schluss kommen, dass die Inhibition eines gesamten Pools an Kinasen zu einer höheren Effizienz bei der Krebs-Therapie führen kann. Dennoch muss dabei beachtet werden, dass eine Inhibition von solch essentiellen Enzymen immer zu Nebenwirkungen führt. Gerade beim IGF-1R ist ein solches Szenario denkbar. Der Insulinrezeptor zeigt eine sehr hohe Homologie zum IGF-1R, übernimmt aber *in vivo* ganz andere Funktionen (vgl. Kap 3.4). Der IR spielt eine zentrale Rolle im Glukose Metabolismus, während der IGF-1R eine Funktion in der Wachstumsregulation einnimmt. Eine gleichzeitige Inhibition des IR kann somit fatale Konsequenzen für Patienten haben, wie z.B. die Ausbildung eines diabetischen Phenotyps. Außerdem ist es schwierig, Inhibitoren zu generieren, die einen bestimmten Pool an Kinasen hemmen, andere Kinasen aber nicht in ihrer Aktivität beeinflussen. Ein besserer Weg scheint die Entwicklung von spezifischen Inhibitoren für die verschiedenen Kinasen zu sein, die dann für eine nachhaltige, effiziente Inhibition in Kombination eingesetzt werden können. Das

Peptid IGF-NT K3 zeigt keinen Einfluss auf die Aktivität der löslichen Kinasedomänen der Rezeptortyrosinkinasen TrkB-R und EGFR und die zytosolische Ser/Thr Kinase Akt. Sogar die zur IGF-Kinase stark homologe Kinase des IR wird weder von dem Peptid erkannt (4.8.9), noch in ihrer Aktivität beeinflusst (4.8.4). Diese Spezifität lässt vermuten, dass IGF-NT K3 an eine Region der Juxtamembrandomäne bindet, in der große Sequenzunterschiede zum IR bestehen. Vermutlich bindet das Peptid an den Bereich, in dem der IGF-1R die Deletion von 5 Aminosäuren gegenüber dem IGF-1R aufweist (Abb. 5.5.1).

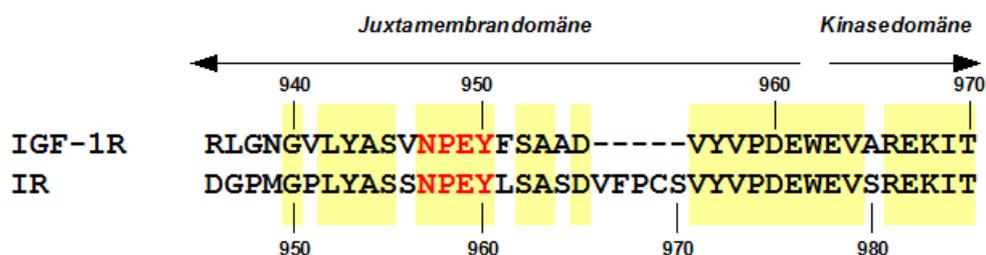


Abbildung 5.5.1: Alignment der Juxtamembransequenz des IGF-1R und IR.

Gelb hinterlegte Reste sind identisch unter den beiden Rezeptoren. Die Querstriche symbolisieren Deletionen. Reste der PTB-Bindestelle sind in Rot dargestellt.

Bei α D-Peptid K2 wurde als Target mit der α D-Helix/hinge region ein hoch konservierter Bereich gewählt, so dass eine Inhibition von nah verwandten Rezeptortyrosinkinasen nicht auszuschließen war. Dieses Peptid hemmt auch die Kinase des IR (Abb. 4.9.2). Der Einfluss auf die IR-Kinase ist vergleichbar mit dem auf die IGF1R. Bemerkenswert ist jedoch, dass das Peptid keinen Einfluss auf die Aktivität der Kinasen des TrkB-R und EGFR hat. Ebenso die zytosolische Ser/Thr-Kinase Akt wird nicht von dem Peptid in ihrer Aktivität beeinflusst. α D-Peptid K2 bindet somit in einer Region des Targets, in der sich der IGF-1R von EGFR, TrkB-R und der Akt unterscheidet. Abbildung 5.5.2 zeigt einen Sequenzvergleich der Kinasen des IGF-1R, IR, EGFR, TrkB-R und der Akt. Es fällt auf, dass die größere Homologie unter den Kinasen innerhalb der α D-Helix liegt. In der hinge region weisen lediglich die Kinasen des IGF-1R und IR Sequenzhomologie auf. Auf Grund dessen kann davon ausgegangen werden, dass α D-Peptid K2 in der hinge region bindet.

		<u>αD-Helix</u>	<u>hinge region</u>	
IGF-1R	1055	GDLKSYLRSLRPEMENN		1071
IR	1069	GDLKSYLRSLRPEAENN		1085
TrkB-R	598	GDLNKFLRAHGPDVLM		614
EGFR	1082	GELFFHLSRERVFTEER		1098
Akt	234	GELLDYVREHKDNIGSQ		250

Abbildung 5.5.2: Alignment der Sequenzen des Bereichs der α D-Helix/hinge region der Rezeptortyrosinkinasen IGF-1R, IR, TrkB-R, EGFR und der Ser/Thr-Kinase Akt.

In grün sind hydrophobe Reste, in hell-blau hydrophile Reste, in rot saure Reste und in blau basische Reste dargestellt. Die Nummerierung der Reste der jeweiligen Kinase ist angegeben. Das Alignment zeigt die Gemeinsamkeiten und Unterschiede im Bereich der α D-Helix/hinge region der unterschiedlichen Kinasen.

Im Far Western-Blot wurde eine signifikant schwächere Bindung von α D-Peptid K2 an die IR Δ C beobachtet (Abb. 4.9.11). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass es für die Peptide innerhalb der Kinase des IGF-1R mehrere Bindungsstellen gibt, die auch außerhalb der konservierten Kinasedomäne liegen könnten. Nur die Bindung an die α D-Helix/hinge region führt zur Inhibition. In der Kinasedomäne des IR gibt es nur die eine Bindestelle. Somit binden mehr Moleküle des Inhibitors an die Kinase des IGF-1R, der Inhibitionstyp wäre jedoch der gleiche. Für ein zelluläres System, in dem beide Rezeptoren vorliegen, ließe sich demnach postulieren, dass das Peptid auf Grund der höheren Affinität die Kinase des IGF-1R bevorzugt binden und damit hemmen würde.

5.5.2 Die *Phage Display*-Peptide zeigen nur gegen die inaktive Kinase eine inhibitorische Wirkung

Wie in der Einleitung beschrieben, sind die löslichen Kinasedomänen etablierte Modelle um Mechanismen der Kinaseaktivierung zu untersuchen (Kap. 3.3.1). Die monomere Kinase stellt ein Modell einer inaktiven Kinasedomäne des Rezeptors dar. Darauf weist insbesondere die autoinhibierte, geschlossene Konformation der Aktivierungsschleife hin⁴¹. In hohen Konzentrationen kann sich die monomere Kinase über *trans*-Autophosphorylierung aktivieren. Die über GST-dimerisierte Kinase stellt hingegen ein Modell des Hormon-gebundenen, aktiven Rezeptors dar. Sie weist eine offene, aktive Konformation der Aktivierungsschleife auf. Sowohl das Peptid gegen die Juxtamembrandomäne als auch das

gegen die α D-Helix/*hinge region* inhibiert nicht die dimere Kinase des IGF-1R (Kap.4.8.2 bzw. 4.9.3). Auch die über Vorphosphorylierung aktivierte monomere Kinase stellt kein Target für beide Peptide dar. Die Peptide binden gezielt die inaktive Kinase und verhindern den Aktivierungsprozess (s. Kap. 4.8.5 bzw. 4.9.4). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die Targetregion in der dimeren Kinase für das jeweilige Peptid nicht zugänglich ist oder eine andere Struktur aufweist. Eine zweite Möglichkeit ist, dass die dimere Kinase auf Grund ihrer aktiven Konformation von der Regulation des jeweiligen Bereiches, Juxtamembranbereich bzw. α D-Helix/*hinge region* unabhängig ist.

In vivo liegt der IGF-1R als konstitutives Dimer vor. Ob auch dieser Rezeptor von den Peptiden gebunden und inhibiert wird, ist nicht klar und muss am Holorezeptor untersucht werden. In der Literatur wird allerdings beschrieben, dass der unligandierte Rezeptor in einem unproduktiven Dimer vorliegt, das einen räumlichen Abstand der Kinasedomänen aufweist^{39,40}. Dieses unproduktive Dimer verhindert eine Liganden-unabhängige Aktivierung des Rezeptors. Die Ligandenbindung an die extrazelluläre Domäne führt zur Ausbildung eines produktiven Dimers, in dem die Kinasedomänen in räumliche Nähe gebracht und optimal ausgerichtet werden. So kann die Autoinhibition überwunden werden. Da die Peptide gezielt die inaktive Struktur der Kinase binden, ist es durchaus möglich, dass auch der inaktive Rezeptor von den Peptiden gebunden und die Aktivierung verhindert wird.

Unabhängig von dem Einfluss auf die Kinaseaktivität zeigt das Peptid IGF-NT K3 über die Bindung an die Juxtamembrandomäne einen Einfluss auf die Signalweiterleitung der Kinase. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die PTB-Bindungsstelle in der Juxtamembrandomäne der Kinase des IGF-1R (NPEpY-Motiv) in ihrer Sequenz intakt sein muss, damit es zu einer Phosphorylierung von IRS-1 durch die Kinase kommt¹⁴⁵. Sowohl die PTB-Phosphorylierung der monomeren als auch die der dimeren Kinase wird durch IGF-NT K3 gehemmt (s. Kap. 4.8.3). Da die Transferaseaktivität der dimeren Kinase durch die Peptide nicht beeinflusst wird, muss IGF-NT K3 die Bindung des PTB-Substrats an die Kinase verhindern. In der Literatur wird beschrieben, dass die Komplexbildung zwischen Kinase und Substrat einen großen Teil der Signalweiterleitung ausmacht¹⁴⁶. Somit kann das Peptid als ein Inhibitor der Signalweiterleitung angesehen werden. Da auch die dimere Kinase betroffen ist, kann davon ausgegangen werden, dass auch der Holorezeptor in der PTB-Bindung von dem Peptid beeinträchtigt wird. In dem von mir untersuchten Modell wurde

allerdings mit der isolierten PTB-Domäne gearbeitet. IRS-1 ist mit 118 Da ein sehr viel größeres Protein, das noch über weitere Domänen als die PTB-Domäne verfügt. Es muss somit überprüft werden, in wie weit IRS-1 von der Bindung der PTB-Domäne an den Rezeptor abhängig ist.

5.6 Kinaseinhibitionsmechanismen

Wie eingangs beschrieben sind die gängigen Kinaseinhibitoren niedermolekulare, ATP-kompetitive Inhibitoren. Solche Kinaseinhibitoren werden häufig zur Kristallisation genutzt¹⁴⁷⁻¹⁵⁰. Zusätzlich können Inhibitoren bei der Aufklärung des Aktivierungsmechanismus sowie der zellulären Funktion einer Kinase helfen. Des Weiteren sind niedermolekulare Inhibitoren sind auch pharmakologisch Interessant. Ein großer Vorteil dieser Inhibitoren ist, dass sie sehr leicht moduliert werden können, um eine bessere Bindung zum Target bzw. eine stärkere Inhibition oder eine höhere Löslichkeit zu erreichen. Da aber die ATP-Bindestelle unter Kinasen hoch konserviert ist, weisen solche Inhibitoren meist keine hohe Spezifität auf. Ein weiterer Nachteil dieser kleinen Moleküle ist, dass oft nur ein Aminosäurerest („Gatekeeper“-Rest) in der Kinase für die Bindung des Inhibitors essentiell ist. Dadurch können sich leicht über die Substitution des „Gatekeeper“-Rest Inhibitorresistente Mutanten ausbilden. In der Natur hat sich ein anderer Mechanismus für eine spezifische, nachhaltige Inhibition entwickelt. Für die unterschiedlichen Kinasen haben sich einzigartige Mechanismen zur Aufrechterhaltung des inaktiven Zustandes zur Regulation der Kinaseaktivität entwickelt. Ein häufig beteiligtes strukturelles Element ist die N-terminale Region mit der hoch konservierten α C-Helix. Die CDK wird im unligandierten Zustand in einer inaktiven Struktur fixiert, die α C-Helix befindet sich in einer unproduktiven Konformation, so dass die für die Katalyse essentielle Salzbrücke nicht ausgebildet werden kann (vgl. Kap 3.3.2.1)²⁶. Aktiviert wird die CDK über die Heterodimerisierung mit Cyclin, das mit dem N-terminalen Bereich der Kinase interagiert und so die autoinhibitorische Struktur dieser Region aufhebt. Inhibitoren der INK Familie binden an die inaktive CDK und verändern die Cyclin-Bindestelle, so dass die für die Aktivierung essentielle Heterodimerisierung der CDK mit Cyclin nicht erfolgen kann³⁰. Die Inhibition der CDK wird somit über die Verhinderung der Heterodimerisierung erreicht. Ein weiteres Struktur-belegtes Beispiel für eine Regulation außerhalb des katalytischen Zentrums ist die Src Kinase. In der autoinhibierten Struktur der Src kommt dem Linker zwischen SH2- und Kinasedomäne eine

essentielle Rolle zu. Die Kristallstrukturen der Kinase verdeutlichen, dass ein Leucinrest (Leu 255) innerhalb des Linkers in dieser Struktur mit der α C-Helix in Kontakt steht und diese in einer inaktiven Position fixiert (vgl. Kap. 3.3.2.2)¹³. Auch die Src wird über Protein-Protein-Wechselwirkungen aktiviert. Binden die SH2 und SH3 Domäne der Kinase an Signalmoleküle, so wird die autoinhibierte Struktur aufgehoben. Der Linker der Src kann in seiner Position mit der Juxtamembrandomäne von Rezeptortyrosinkinasen verglichen werden. Die Rolle des Leucins entspricht dabei der des autoinhibitorischen Tyrosins in der Juxtamembrandomäne des IR bzw. IGF-1R. Neben der autoinhibitorischen Funktion kommt dem Juxtamembranbereich des IGF-1R eine Rolle in der Dimerisierung zu. Über limitierte Proteolyse mit Chymotrypsin konnte unsere Arbeitsgruppe eine Dimerisierungsdomäne der löslichen Kinase im Juxtamembranbereich lokalisieren (Parvaresch, unveröffentlichte Ergebnisse). Auch aus den Röntgenstrukturdaten der dimeren Kinase des IGF-1R wird eine Rolle dieses Bereiches für die Dimerisierung ersichtlich (vgl. Kap 3.3.4.1)⁴². Der Juxtamembranbereich des einen Monomers interagiert mit zahlreichen Aminosäuren der Aktivierungsschleife des anderen Monomers. Beim EGFR wurden ebenfalls Dimere im Kristall beobachtet. Hier wurde der Juxtamembranbereich nicht mit kristallisiert. Im EGFR ist dieser Bereich jedoch sehr kurz. Dafür besitzt der Rezeptor eine N-terminale Verlängerung, die eine ähnliche Funktion übernehmen könnte wie der Juxtamembranbereich beim IGF-1R. Im *CDK/Cyclins-like* asymmetrischen Dimer des EGFR, das für die Aktivierung des Rezeptors essentiell sein soll⁴⁸, wird das Interface des Dimers unter anderem aus Resten der N-terminalen Verlängerung gebildet. Werden diverse Reste dieses Bereiches substituiert, weist die Kinase nur noch basale Aktivität auf. Wie beim IGF-1R besitzt die Kinase des EGF-1R selbst eine Tendenz zu dimerisieren, die intrinsische Dimerisierungsdomäne scheint im N-terminalen Bereich lokalisiert zu sein. Die vergleichbare regulatorische Funktion des N-terminalen Bereichs beim IGF-1R und EGFR wird durch die Beobachtung der Heterodimerisierung der Rezeptoren bestätigt⁹⁶. Durch die Heterodimerisierung wird der IGF-1R aktiviert und der PI3K/Akt- sowie MAPK-Signalweg angeschaltet. Dieses Szenario macht Patienten, die mit dem EGF-Inhibitor *Erlotinib* behandelt werden, über die Dauer der Behandlung resistent gegenüber dem Wirkstoff.

Auch für die α D-Helix gibt es Hinweise, dass diese an der Regulation der Kinaseaktivität beteiligt ist. Die Bedeutung dieser Region für die Kinaseaktivität belegen zielgerichtete

Mutagenese Experimente¹⁵¹⁻¹⁵⁴ bzw. natürlich auftretende Mutationen^{155,156} in diesem Bereich, die die Kinasefunktionen beeinträchtigen und zu strukturellen Fehlordnungen führen. Niv *et al* konnten zeigen, dass ein Peptid aus der α D-Helix Region der Kinase des des *Stammzellularfaktor-Rezeptors* (c-Kit) spezifisch die Aktivität dieser Kinase inhibiert¹⁴².

Schulte und Sefton konnten eine Inhibition der Src Kinase durch einen ihrer natürlichen Interaktionspartner, Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (WASP), beobachten. Die inhibitorische Wirkung konnte auf ein kleines Peptidfragment von WASP eingegrenzt werden¹⁵⁷. Ein Sequenzvergleich dieses Peptids mit der Kinasesequenz des IR bzw. IGF-1R verdeutlicht, dass das Peptid Identität zu der α D-Helix zeigt¹²⁵. In unserer Arbeitsgruppe wurde der Einfluss eines Peptids aus der Sequenz der α D-Helix/*hinge region* auf die Kinaseaktivität untersucht. Es zeigte sich, dass das Peptid die Kinasen des IGF-1R und IR inhibiert. Mittels Kreuzmutationsexperimenten konnte in dieser Arbeit gezeigt werden dass dieses Peptid an die *hinge region* der IGF-Kinase bindet. Diese Beobachtungen waren ein indirekter Hinweis für eine regulatorische Funktion dieser Region. Zusätzlich sprechen die dimeren Kristallstrukturen der löslichen Kinasedomänen, in denen die beiden Monomere über die Fläche der α D-Helix dimerisieren, dem Bereich eine Rolle in der Dimerisierung zu⁴².

Aus den obigen Beispielen lässt sich entnehmen, dass eine spezifische und nachhaltige Inhibition über die Bindung an regulatorische Bereiche der Kinase außerhalb des katalytischen Zentrums erfolgen kann. Über das *Phage Display* gegen zwei potentielle regulatorische Bereiche des IGF-1R wurden zwei Peptidsequenzen generiert, welche die Kinase in der inaktiven Konformation binden und fixieren. Das Peptid IGF-NT K3 bindet an die Juxtamembrandomäne und verhindert spezifisch die Dimerisierung der Kinase (4.8.6). Die Dimerisierung ist notwendig für die Aktivierung der Kinase. Sie leitet den Übergang von der autoinhibierten zur aktiven Kinasekonformation ein und ermöglicht damit die Autophosphorylierung. Der inhibitorische Mechanismus von IGF-NT K3 ist somit vergleichbar mit dem der INK-Inhibitor Familie der CDKs, die eine Heterodimerisierung der Kinase mit Cyclin verhindern.

In Abbildung 5.6.1 ist ein möglicher Mechanismus zur Kinaseaktivierung bzw. Kinaseinhibition durch die beiden Peptide angegeben. Die monomere Kinase liegt in einer autoinhibierten, geschlossenen Konformation vor. In Lösung existiert ein Gleichgewicht

zwischen monomerer und dimerer Kinase, die eine offene, aktive Konformation der Aktivierungsschleife aufweist. In der dimeren Kinase ist eine Autophosphorylierung möglich. Die phosphorylierte Aktivierungsschleife wird in der offenen Konformation fixiert. Diese Kinase ist nun Dimerisierungs-unabhängig aktiv und wird somit dem Gleichgewicht entzogen. Die aktive Kinase ist nun auch in der Lage Substrate zu phosphorylieren.

Wird die Dimerisierung inhibiert, wie es für den Inhibitor IGF-NT K3 der Fall ist, so kann sich kein Gleichgewicht zwischen monomerer und dimerer Kinase ausbilden (Punkt b in Abb. 5.6.1). Die Kinase bleibt inaktiv. Zusätzlich verhindert das Peptid die Interaktion der aktivierten, dimeren Kinase mit dem Substrat (Punkt c in Abb. 5.6.1). Das Peptid greift also nicht nur in den Aktivierungsprozess ein, es verhindert auch die Weiterleitung der nachgeschalteten Signale. Das Peptid gegen die α D-Helix/hinge region, α D-Peptid K2, interferiert nicht mit der Kinasedimerisierung (Kap. 4.9.5), greift aber dennoch in den Aktivierungsprozess der Kinase ein (Kap. 4.9.4). Die Limitierte Proteolyse der monomeren Kinase veranschaulicht, dass das Peptid die Kinase daran hindert, die aktive, offene Konformation einzunehmen (Kap. 4.9.6). Es bindet an die α D-Helix/hinge region, die für den Konformationsübergang von der autoinhibierten in die aktive Struktur verantwortlich ist und verhindert dadurch diesen, für die Aktivierung essentiellen Übergang. Die Kinase wird in der geschlossenen, autoinhibierten Struktur fixiert. So wird das Gleichgewicht auf Seiten der inaktiven, monomeren Kinase verschoben (Punkt a in Abb. 5.6.1). Die lösliche Kinase stellt nur ein Modell dar. Für den Rezeptor unterliegt einem anderen Mechanismus der Aktivierung (Abb. 5.6.1.B). Der unligandierte Rezeptor liegt als unproduktives Dimer vor. Die Hormon-Bindung führt zur Ausbildung des produktiven Dimers¹²⁴. Die Autoinhibition wird aufgehoben und die Autophosphorylierung der Aktivierungsschleife des produktiven Dimers kann statt finden. Der aktivierte Rezeptor kann nun die Signalweiterleitung durch die Phosphorylierung seiner Substrate aktivieren. Ob die Peptide IGF-NT K3 und α D-Peptid K2 auch das unproduktive Dimer des Rezeptors binden und damit den Aktivierungsprozess inhibieren, ist nicht klar. Hier sollte allerdings der zweite Inhibitionsmechanismus des Peptids IGF-NT K3 greifen (Punkt d in Abb. 5.6.1). Die Inhibition der Signalweiterleitung des aktivierten Rezeptors über die Konkurrenz mit der Substratbindung erwies sich unabhängig von der Kinasestruktur.

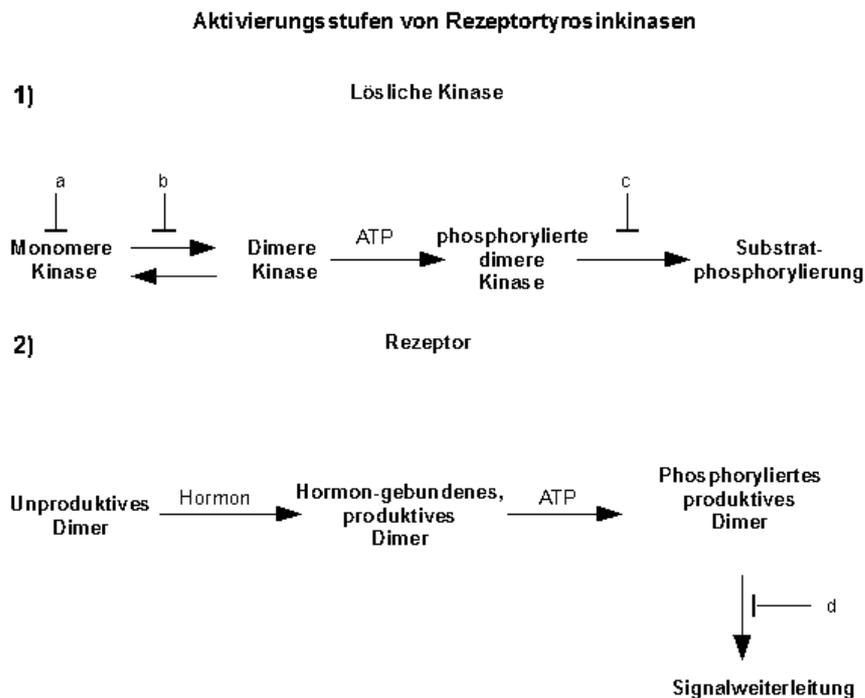


Abbildung 5.6.1: Möglicher Aktivierungsmechanismus einer löslichen Kinasedomäne (1) und des IGF-1-Rezeptors (2).

1: In Lösung existiert ein Gleichgewicht zwischen der monomeren und dimeren Kinase. Die Phosphorylierung der dimeren Kinase macht diese Dimerisierungs-unabhängig aktiv und entzieht sie dem Gleichgewicht. Die aktivierte Kinase ist nun in der Lage, Substrate zu phosphorylieren. Die roten Pfeile (**a-c**) markieren Bereiche in die die Inhibitoren α D-Peptid K2 (**a**) und IGF-NT K3 (**b** und **c**) in den Aktivierungsprozess eingreifen. **2:** Der unligandierte Rezeptor liegt als unproduktives Dimer vor. Die Hormon-Bindung führt zur Ausbildung eines produktiven Dimers, die Autoinhibition wird aufgehoben. Die Autophosphorylierung der Aktivierungsschleife des produktiven Dimers kann statt finden. Der aktivierte Rezeptor kann die Signalweiterleitung durch die Phosphorylierung seiner Substrate einleiten. Der rote Pfeil (**d**) markiert die Stelle, an der der Inhibitor IGF-NT K3 in den Aktivierungsprozess eingreift.

5.7 Ausblick

In dieser Arbeit ist es gelungen, über *Phage Display* zwei spezifische Inhibitoren für die Kinase des IGF-1R zu generieren. Das Prinzip, Inhibition über Bindungspartner gegen regulatorische Bereiche außerhalb des katalytischen Zentrums zu erreichen, war erfolgreich. Sehr viel versprechend ist der Inhibitor, der gegen die Juxtamembrandomäne selektioniert wurde. Dieser verhindert nicht nur die Aktivierung der Kinase, sondern unterbindet zusätzlich die Signalweiterleitung. Dieser Inhibitor ist allerdings noch nicht optimal. Eine Möglichkeit, das Peptid in seiner inhibitorischen Wirkung zu optimieren, wäre ein Alanin-Scan um die essentiellen und variablen Positionen im Peptid zu lokalisieren. Über gezielte Substitution an den variablen Positionen könnte die Bindung des Peptids an die Kinase und damit die Inhibition verstärkt werden.

Um Versuche mit den Peptiden *in vivo* durchführen zu können, müssen diese die Zellmembran überwinden. Dazu kann der peptidische Inhibitor mit einem *cell penetrating peptide* (CPP) verlinkt werden. CPPs sind kurze Peptide, die in einer Rezeptor und Energie-unabhängigen Weise durch die Membran gelangen¹⁵⁸⁻¹⁶⁰.

Ein großer Nachteil von peptidischen Inhibitoren ist, dass sie von Proteasen in der Zelle abgebaut werden könnten. Bei der Optimierung des Peptids über gezielte Aminosäuresubstitution muss daher darauf geachtet werden, dass keine Protease-Spaltstellen entstehen. Eine weitere Möglichkeit ist die Generierung von inhibitorischen Peptiden, die aus D-Aminosäuren aufgebaut und damit Protease-resistent sein sollten¹⁶¹. Zur Generierung eines solchen Peptids kann das *Mirror Image Phage Display* eingesetzt werden¹⁶²⁻¹⁶⁴. Diese Art von *Phage Display* „screent“ gegen ein Target aus D-Aminosäuren. Die Peptidsequenzen der Phagenbibliothek sind aus L-Aminosäuren aufgebaut. Die aus diesem *Phage Display* erhaltene Peptidsequenz kann in ein Peptid, aufgebaut aus D-Aminosäuren, transformiert werden. Nach dem Prinzip des Spiegelbildes sollte das erhaltene D-Peptid das Target aus L-Aminosäuren binden.

6 Material

6.1 Bakterienstämme, Viren, Kulturmedien und –zusätze

<i>Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus</i>	Pharming, San Diego, CA, USA
<i>Spodoptera frugiperda (Sf9)</i> Zellen	Dr. S. Stabel, Max-Delbrück-Laboratorien, Köln
<i>Escherichia coli</i> DH5a	Dr. S. Stabel, Max-Delbrück-Laboratorien, Köln
<i>Escherichia coli</i> BL21	Dr. S. Stabel, Max-Delbrück-Laboratorien, Köln
<i>Escherichia coli</i> BL21DE3	
<i>Escherichia coli</i> ER2738 host strain	New England Biolabs, Frankfurt
Amphotericin B (Fungizoneâ)	Life Technologies, Eggenstein
Ampicillin, Natriumsalz	Fluka, Buchs, Schweiz
Tetracyclin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fötale Kälberserum (FCS)	Life Technologies, Eggenstein
Gentamycinsulfat (G418)	Life Technologies, Eggenstein
Grace's Insektenzellenmedium	Life Technologies, Eggenstein
TNM-FH-Insektenzellenmedium	PAN Biotech, Aidenbach
LB-Broth Base Medium	Life Technologies, Eggenstein
LB-Agar	Life Technologies, Eggenstein
Neutralrot (3-Amino-7-dimethylamino-2-Methylphenazin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, 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

Aceton	Roth, Karlsruhe
Acetonitril, <i>gradient grade</i>	Merck, Darmstadt
Acrylamid, p.a.	Serva, Heidelberg
Adenosin-5'-diphosphat	Roche Diagnostics, Mannheim
Adenosin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
[g- ³² P]-Adenosin-5'-Triphosphat, > 5000 Ci/mmol	Perkin Elmer, bzw. Hartmann, Braunschweig
Agarose, <i>electrophoresis grade</i>	Seakem, Hameln

MATERIAL

Ammoniumacetat	Fluka, Buchs, Schweiz
Ammoniumhydroxid-Lösung, 25%	Serva, Heidelberg
Ammoniumper(oxodi)sulfat	Serva, Heidelberg
B	
Borsäure, p.a.	Merck, Darmstadt
Bradford-Färbereagenz	BioRad, München
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid	Biomol, Hamburg
5-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphat (BCIP)	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau, Natriumsalz, <i>research grade</i>	Serva, Heidelberg
C	
Complete Proteaseinhibitor Cocktailltabletten	Boehringer, Mannheim
(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	
Eosin Y (2',4',5',7'-Tetrabromfluorescein-Dinatriumsalz)	Applichem, Darmstadt
Essigsäure, >97%, p.a.	Roth, Karlsruhe
Ethanol, absolut, p.a	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
F	
Floram (Fluorescamin)	Applichem, Darmstadt
Formaldehyd, 35 %	Roth, Karlsruhe
G	
GelRed TM Nucleic Acid Gel Stain, 3X in Wasser	Biotrend, Köln
Glutathion, oxidiert	Serva, Heidelberg
Glutathion, reduziert	Boehringer, Mannheim
Glycerin	Serva, Heidelberg
Glycin, <i>electrophoresis grade</i>	ICN, Aurora, OH, USA
H	
N-(2-Hydroxyethyl)piperizin-N-2-	
Ethylsulfonsäure (HEPES)	Applichem, Darmstadt
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, <i>research grade</i>	Serva, Heidelberg
N	
Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH), Dinatriumsalz	Roche Diagnostics, Mannheim
Natriumacetat, wasserfrei, p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumazid, reinst	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid p.a.	Roth, Karlsruhe
tri-Natriumcitrat-2-Hydrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Merck, Darmstadt
Ninhydrin, p.a.	Merck, Darmstadt
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Sigma, Taufkirchen
Natrium-orthovanadat	Sigma, Taufkirchen
P	
PCR-Nucleotidmix	Boehringer, Mannheim
Perchlorsäure, 70%	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Taufkirchen
Phosphoenolpyrovat (PEP)	Roche Diagnostics, Mannheim
ortho-Phosphorsäure	Fluka, Buchs, Schweiz
Ponceau-S	Merck, Darmstadt
i-Propanol, p.a.	Merck, Darmstadt

S

D(+)-Saccharose, p.a.	Roth, Karlsruhe
Salzsäure, 37 %	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure, 98 %	Merck, Darmstadt
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Streptavidin	New England Biolabs, Frankfurt

T

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Applichem, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Tetramethylrhodamine-5-maleimid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
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
Trypsin	Aldrich, Taufkirchen
Tween-20 (Polyoxyethylensorbitmonolaureat)	BioRad, München

X

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

6.3 Chromatographie Material

Matrixmaterial:

Glutathion-Sepharose-4B	Pharmacia, Freiburg
Nickel-NTA-Agarose	Quiagen, Hilden
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 Kitsysteme

BaculoGold™-Transfection Kit	PharminGen, San Diego (USA)
GenElute™-Plasmid Miniprep Kit	Sigma, Steinheim
Nucleobond™ AX 100 Plasmid Kit	Macherey & Nagel, Düren
Ph.D.-12™ Phage Display Peptide Library Kit	New England Biolabs, Frankfurt
QIAquick™ Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick™ PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick™ Spin M13 Kit	Qiagen, Hilden

6.5 Laborgeräte

A

Autoklaven:

Tischautoklav Tuttbauer 2540 EL

Tuttbauer, Jerusalem, Israel

Varioklav Dampfsterilisator

H+P Labortechnik, München

B

BioLogic Workstation

BioRad, München

(inkl. Molecular Analyst Software)

Blockthermostat BT1301

Sel Laboratory Products, England

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

Gelgießsystem

Biorad, München

H

Heizblock HB-130

Unitek, Böblingen

Heto-Vac VR1 + Heto Trap CT 110

Heto, Birkerød, Dänemark

Homogenisator

Braun, Melsungen

I

Inkubatoren:

EB 28 WTB

Binder, Tuttlingen

FD 53 WTB

Binder, Tuttlingen

Incubator Shaker Innova 4000

New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, USA

MATERIAL

L

Leuchttisch	Nonius, Delft, NL
UV-Leuchttisch N90 MW 312 nm	Konrad Bend, Wiesloch

M

<i>Microplate Reader</i>	Model 550 BioRad, München
Mikroskop Wilovert	S Hund, Wetzlar

Molecular Imager System GS 363:

Molecular Imaging Screen-C	BioRad, München
Molecular Imaging Screen-BI	BioRad, München
Eraser GS 505	BioRad, München
Sample Exposure Platform GS 505	BioRad, München

P

PCR-Gerät:

Mastercycler 5330 (incl. Heizdeckel 5330plus)	Eppendorf, Hamburg
Peristaltikpumpe Minipuls 2	Gilson, Arnouville Les Gonesse, Frankreich

Pipetten:

Eppendorf Research (0,5-10 µl; 2-20 µl; 10-100 µl; 200-1000 µl)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Hamilton Microliter™ Spritze	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Photometer DU 7400	Beckmann, München

R

Rühr- Schüttel und Mischgeräte:

Ikamag Magnetrührer mit Heizplatte	Janke & Kunkel, Staufen
Ikamag Magnetrührer Reverstir Model RS 8	Toyo Kagagu Sagyo Co., Japan
IKA-Vibrax-VXR	Janke & Kunkel, Staufen
Rollschüttler RM-5	Braun, Melsungne
Inkubator Shaker innova 4000	New Brunswick Sci., USA

Rotoren:

45Ti und 70Ti	Beckmann, Fullerton, CA, USA
HFA 12.500 und 22.50	Heraeus, düsseldorf

S

Spannungsgeräte:

EPS 3.500	Pharmacia, Freiburg
3000 Xi	BioRad, München
PowerPac 3000	BioRad, München
SpeedVac SC110 +	BioRad, München

Refrigerator Vapor Trap RVT 1404	Savant, Farmingdale, NY, USA
Sterilbank LB-48-C Lamin Air â	Heraeus, düsseldorf
T	
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
U	
Ultraschallprozessor UP 200H	Dr. Hielscher GmbH, Teltow
Ultraschallquelle (inkl. Branson Sonifier Power Supply)	Branson Instruments, Danbury, USA
V	
Vakuumpumpe	Vakuumband, 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
Mini 2D-Cell (WetBlot)	BioRad, München
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
Zählkammer nach Neubauer, improved	Brand GmbH, Wertheim

6.6 Software und EDV

6.6.1 Datenerfassung

- Bio-Rad Imaging System Software Molekular Analyst; Version: 1.5 (1996); BioRad Laboratories, Kalifornien, USA
- CanonScan D1250 U2F; Canon Deutschland GmbH, Krefeld
- Adobe Photoshop CS2 (Version 9.0); Adobe Systems Inc.

- Sigma Plot 9.0
- Open Office
- Pymol
- Zotero
- ChemSketch

6.6.2 Molekularbiologische Standardanwendungen

In dieser Arbeit dargestellte Plasmidkarten und Sequenzen wurden mit dem Programm „GENtle“ bearbeitet und graphisch aufbereitet.

„GENtle“: verwendete Version: 1.8.0; Autor: Magnus Manske; veröffentlicht unter GPL 2003; Quelle: <http://gentle.magnusmanske.de>

6.7 Molekulargewichts- und Längenstandards

SDS Molecular Weight Marker (Broad Range)	MBI Fermentas, Wilna, Litauen
Prestained SDS Molecular Weight Marker (Broad Range)	MBI Fermentas, Wilna, Litauen
Prestained Protein Marker (Broad Range)	New England Biolabs, Frankfurt
GeneRuler™ DNA Lader Mix	MBI Fermentas, Wilna, Litauen
MassRuler™ DNA Lader Mix	MBI Fermentas, Wilna, Litauen

6.8 Nukleinsäuren

6.8.1 Plasmidvektoren

pAcG2T	PharminGen, San Diego
pVL-1393	PharminGen, San Diego
pET21a(+)	Novagen, Bad Soden
pUcSIGFRD	Baer
pGex-IGF-JM	Baer
pGex-IR-JM	Baer
pET21a(+)-Tyrtide	Baer

6.8.2 Oligonucleotide

Sämtliche Primer wurden von der Firma Sigma-Genosys (Steinheim) bezogen. Der typische Reinheitsgrad war entsalzt.

6.8.2.1 Primer zur Konstruktion der C-terminal deletierten IGF-Kinasedomäne

5'-Primer: 5'-GTGCGGATCCCGCGATGAGAAAGAGAAATAACAGCAGG-3'

3'-Primer: 5'-CGGAATTCCGGTCACTTGTTCTCCTCGCTGTAGTAGAAG-3'

6.8.2.2 Primer zur Konstruktion der Mutante E1069K der IGF-Kinasedomäne

5'-Primer: 5'-TCTCCGGTCCCTGAGGCCAGAAATGAAGAATAATCC-3'

3'-Primer: 5'- TGGATTATTCTTCATTTCTGGCCTCAGGGACCGGAG-3'

6.8.2.3 Primer zur Konstruktion der Doppelmutante E1067/1069K der IGF-Kinasedomäne

5'-Primer: 5'-TCCGGTCCCTGAGACCAAAGATGAAGAATAATCC-3'

3'-Primer: 5'- GGACTGGATTATTCTTCATCTTTGGTCTCAGGGACC-3'

6.8.2.4 Linker zur Generierung des Pet-21(a)+-mod-Nt-His (Linker-Pet-1)

5'-Linker: 5'-AATGCACCATCATCACCATCATCATATGGATATCCTCGAGGGATCCGAATTCT-3'

3'-Linker: 5'-TCGAAGAATTCGGATCCCTCGAGGATATCCATATGATGATGGTGTGATGGTGCAT-3'

6.8.2.5 Linker zur Generierung des Pet-21(a)+-mod-Nt-His-TS-rCys (Linker-Pet-2)

5'-Linker: 5'-GATCGGAGAATCTTTATTTTCAGGGGGGATCCGAGCTCCGGAATTCCCATTGTCAA-
AGAGAATGAT-3'

3'-Linker: 5'- AATTATCATTCTCTTTGACAATGGGAATTCGGAGCTCGGATCCCCCCTGAAAAT-
AAAGATTCTCC-3'

6.8.2.6 Linker zur Generierung der DNA Bam-IGF-NTK3-Eco

5'-Linker: 5'-GATCGCATCTTCATGTTTCATGTTAAGTTTGCTGATCGTCAG-3'

3'-Linker: 5'-AATTCTGACGATCAGCAAACCTTAACATGAACATGAAGATGC-3'

6.8.2.7 Linker zur Generierung der DNA Bam-IGF-NTK1-Eco

5'-Linker: 5'-GATCGACGCAGTGGCTTCCCTTCGCTTTTGGAGCATCCTATG-3'

3'-Linker: 5'-AATTCATAGGATGCTCCAAAAGCGAAGGAAGCCACTGCGTC-3'

6.8.2.8 Linker zur Generierung der DNA Bam- α D-Peptid-Eco

5'-Linker: 5'-GATCACTGAAAAGCTATCTGCGTAGCCTGCGTCCGGAAGCGGAAAATAAT-3'

3'-Linker: 5'-AATTATTATTTTCCGCTTCCGGACGCAGGCTACGCAGATAGCTTTTCAGT-3'

6.8.2.9 Linker zur Generierung der DNA Bam-Kontrollpeptid-Eco

5'-Linker: 5'-GATCGCGTCTGATTGGCAATCTGCGTTTTTATGCGAGCGGCTTTAAA-3'

3'-Linker: 5'-AATTTTAAAGCCGCTCGCATAAAAACGCAGATTGCCAATCAGACGC-3'

6.8.2.10 Linker zur Generierung der DNA Bam- α D-Peptid K3-Eco

5'-Linker: 5'-GATCAACCCCGACCCCGGATAACAGCGTGTGGCGGCGAGCGGG-3'

3'-Linker: 5'-AATCCCGCTCGCCGCAAACACGCTGTTATCCGGGGTTCGGGGTT-3'

6.8.2.11 Linker zur Generierung der DNA Bam- α D-Peptid K2-Eco

5'-Linker: 5'-AATTCGGCGCCGCGCTCGCCGGCGGGCGCAGCGCGCTATGC-3'

3'-Linker: 5'-GATCGCATAGCGCGCTGCGCCCGCCGGCGAGCGCGGGCGCCG-3'

6.8.2.12 Sequenzierungsprimer

Pac-G2T-Sequenzierprimer-5': 5'-CACGTTTGGTGGTGGCGACC-3'

Pac-G2T-Sequenzierprimer-3': 5'-CAACAACGCACAGAATCTAGCG-3'

pVL1393-Sequenzierprimer-5': 5'-TCCGGATTATTCATACCGTCC-3'

pVL1393-Sequenzierprimer-3': 5'-AAAGGATCAGATCTGCAGC-3'

pET-21a(+)- Sequenzierprimer-5': 5'-CTATAGGGGAATTGTGAGC-3'

pET-21a(+)- Sequenzierprimer-3': 5'-CTTTCGGGCTTTGTTAGC-3'

Phage Display Sequenzierprimer Ph.D12 96: 5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3'

6.9 Antikörper und Enzyme

6.9.1 Antikörper

a-GST-Exon20

Lehr (1995)

a-Rabbit IgG-Alkalische Phosphatase (AP)

Roche Diagnostics, Mannheim

6.9.2 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

Pfu-DNA-Polymerase

Promega, Mannheim

Cloned *Pfu* Buffer

Promega, Mannheim

6.9.3 Restriktionsenzyme und zugehörige Puffer

*Bam*HI

Roche Diagnostics, Mannheim

*BSU*36

New England Biolabs, Frankfurt

*Eco*RI

Roche Diagnostics, Mannheim

Eco RV

New England Biolabs, Frankfurt

*Nde*I

New England Biolabs, Frankfurt

<i>SacI</i>	New England Biolabs, Frankfurt
<i>XhoI</i>	New England Biolabs, Frankfurt
Puffer B	Roche Diagnostics, Mannheim
Puffer NEB2	New England Biolabs, Frankfurt
Puffer NEB3	New England Biolabs, Frankfurt
Puffer NEB4	New England Biolabs, Frankfurt

6.9.4 Sonstige

Faktor Xa	Roche Diagnostics, Mannheim
Lactat-Dehydrogenase (LDH)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pyrovatkinase (PK)	Roche Diagnostics, Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA), Fraction V, <i>pure</i> (Protease- und Phosphatase-frei)	Serva, Heidelberg
Thrombin	Pharmingen, San Diego (USA)
Trypsin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

6.10 Peptide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden von der Firma Coring System Diagnostix GmbH(Gernsheim) kommerziell bezogen. Es wurden jeweils 10-20 mg in der Reinheit *crude* (>50% rein) erhalten. Alle kommerziell bezogenen Peptide sind in der Tabelle 6.1 aufgelistet.

Tabelle 6.1: Auflistung der kommerziell bezogenen Peptide

Name	Sequenz
α D-Peptid	LKSYLRSLRPEMENN
α D-Mutante	LESYLESLRPEMENN
Kontrollpeptid	RLIGNLRFYASGFK
IGF-NT K1	TQWLPSLLEHPM
IGF-NT K3	HLHVHVVKFADRQ

6.11 Puffer und Lösungen

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

Ampicillin (1000x):

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

ADP-Stocklösung:

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

ATP-Stocklösung:

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

BCIP

20 mg/ml in DMF gelöst

Blockierungspuffer:

1% (w/v) BSA in PBS (0,5 g BSA, 50 ml 1x PBS, 0,04 ml NaN_3 (nur, wenn der Puffer mehrfach verwendet werden soll))

Bradford-Färbereagenz:

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

Chloramphenicol (100x)

35 mg/ml in Ethanol lösen, steril filtriert über 0,2 μm Spritzenfilter

Coomassie-Entfärbelösung

30 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure

Coomassie-Färbelösung

0,25 % (w/v), Coomassie Brilliant Blau R-250; 45,5 % (v/v) Methanol, 9,2 % (v/v) Essigsäure

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

ELISA-GALLATI-CHRIS-Puffer:

130 mM tri-Natriumcitrat-2-Hydrat, 0,01 % (v/v) H_2O_2

ELISA-(TMB)-Substrat

10 mM Tetramethylbenzidin (TMB), 50 % (v/v) DMSO, 50 % (v/v) Ethanol

ELISA-TMB-Färbepuffer

1% TMB-Substrat in GALLATI-CHRIS-Puffer

ELISA-STOP-Puffer

2M H_2SO_4

Eosin Y-Färbelösung

0,25 % (w/v) Eosin Y in 0,1 N NaOH

Ethidiumbromid-Lösung

5,25 mg/ml Ethidiumbromid

Fluorescamin Lösung

3 mg Fluorescamin in 100 μl Aceton lösen

IEX A (Äquibrierung, Waschen):

1 mM DTT; 50 mM Tris/ HCl; pH 7,5 (steril filtrieren und entgasen)

IEX B (Elution):

1 M NaCl; 1 mM DTT; 50 mM Tris/ HCl; pH 7,5 (steril filtrieren und entgasen)

FPLC-Puffer für Gelchromatographie

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

GSH-Elutionspuffer

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

10 mM red. L-Glutathion (GSH); 50 mM Tris/ HCl, pH 8,5

GSH-Regenerationspuffer 1:

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

GSH-Regenerationspuffer 2:

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

GSH-Waschpuffer 1:

1 x PBS , pH 7,5

GSH-Waschpuffer 2:

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

GSH-Waschpuffer 3:

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 Sf9-Zellkultur

Grace's Insektenmedium, 10% FCS

Fungizone (Endkonzentration: 2,5 µg/ml)

Gentamycin, steril filtriert (Endkonzentration: 50 µg/ml)

Leupeptin-Stammlösung (1000X):

10 mg/ml Leupeptin

Lysispuffer für Protein aus Sf9-Zellen

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 (4x):

250 mM EDTA pH 7,5, 100mM DTT, 16,5% Saccharose, 375 mM TRIS/HCl pH 8,8, 0,5% Bromphenolblau

Natriumacetat-Lösung:

3 M NaOAc/AcOH, pH 5,2

Nickel-NTA-Elutionspuffer:

50 mM Tris/HCl, 250 mM Imidazol, pH 8

Nickel-NTA-Lysispuffer:

50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8

Nickel-NTA-Waschpuffer:

50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 40 mM Imidazol, pH 8

PBS-Puffer:

140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,5

Phage Display Blocking Puffer:

0,1 M NaHCO₃ pH 8,6, 5 mg/ml BSA, 0,02 % Natriumazid. Sterilfiltriert.

Phage Display Elutionspuffer:

0,2 M Glyci/HCl pH 2,2, 1 mg/ml BSA

Phage Display Iodidpuffer:

10 mM Tris/HCl pH 8, 1mM EDTA, 4 M NaI.

Phage Display Neutralisationspuffer:

1 M Tris/HCl pH 9,1

Phage Display PEG/NaCl:

20 % (w/v) polyethylen glycol 8000, 2,5 M NaCl. Autoklaviert.

Phage Display Wasch Puffer (TBST):

1 x TBS/0,1% Tween

Phosphorylierungs-Puffer (10X), Standardbedingungen:

300 mM Mg²⁺; 50 mM DTT; in 50 mM TRIS/ HCl pH 7,5

PMSF-Stammlösung (100X):

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

Ponceau-S Färbelösung

0,25 % (w/v) Ponceau-S, 1,5 % (v/v) Essigsäure

Puffer für DNA-Midipräparation

Schägger-Gel Anodenpuffer:

0,2 M Tris/HCl, pH 8,9

Schägger-Gel Kathodenpuffer:

0,1 M/HCl, 0,1 M Tricin, 0,1 % SDS, pH 8,25

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

Silberfärbung Entwicklungslösung

20 ml 6 % Natriumcarbonat-Lösung, 26 µl 35 % Formaldehyd, 25 µl Thiosulfatstock auf 60 ml

Silberfärbung Impregnierungslösung

0,8 ml 20 % Silbernitrat, 0,6 ml 35 % Formaldehyd 60 ml

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

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

TEV-Spaltungspuffer

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

Thiosulfatstock

10 % (w/v) Natriumthiosulfat-Pentahydrat

Thrombin-Spaltungspuffer:

10 mM Tris/HCl, 2 mM DTT, pH 8,0

TNES-Puffer:

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

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

6.12 Verbrauchsmaterial

A

Amicon®Ultra Microcentrator Devices (30 kDa)

Milipore, Bedford MA, USA

Autoklavierkontrollband

KMF Laborchemie, St. Augustin

MATERIAL

C

Centrikon®-Mikrokonzentrator (3/5/10/30 kDa)

Millipore, Bedford, USA

Complete Protease Inhibitor Tabletten

Roche Diagnostics, Penzberg

E

Einmachhaut, extra schwere Qualitt

Alba, Gehrig & Neiweiser, Bielefeld

F

Filtermaterial:

0,2 µm Dyngard ME Sterilfilter

Microgon, California, USA

0,22 µm Type GS (Æ4,9 cm)

Millipore, Bedford, USA

0,45 µm Type GS (Æ4,9 cm)

Millipore, Bedford, USA

Membranfilter ME 24 (0,2m Æ47 mm)

Schleicher & Schuell GmbH, Dassel

Filterpapier:

Munktell Grade 1F

LKB, Pharmacia, Freiburg

Whatman 3T

Whatman, Maidstone, GB

Faltenfilter (Æ 125 und 270 mm)

Schleicher & Schuell GmbH, Dassel

Kodak Scientific Imaging Film

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

G

Gelkassetten 1,5 mm

Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

K

Einmalküvetten, Halbmikro, Schichtdicke 10 mm

Ratiolab GmbH, Dreieich-Brunschlag

Quarzküvetten, Typ 105.200-QS,

Schichtdicke 10 mm, Zentrum 8,5 mm

Hellma, Mannheim

P

Sarstedt Serological Pipette (1-25 ml, steril)

Sarstedt, Nümbrecht

Pipettenspitzen

Ratiolab GmbH, Dreieich-Brunschlag

PVDF-Membran Immobilon P

Millipore, Bedford, PA, USA

R

Reaktionsgefäße:

Falcon BLUE MAXTM

(aus Polypropylen, 15 ml; 50 ml)

Beston Dickinson, Franklin Lakes, USA

Reagiergefäß Safety Cap (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)

Sarstedt, Nümbrecht

PCR Tubes (0,5 ml)

Sarstedt, Nümbrecht

7 Methoden

7.1 Molekularbiologische Methoden

Folgende molekularbiologischen Methoden wurden gemäß Standardprotokollen nach Sambrook *et al.* durchgeführt¹⁶⁵:

- Agarose-Gelelektrophorese, Ethanol-fällung von DNA, Restriktionsendonukleolytische Spaltung, Ligation, Konzentrationsbestimmung von DNA.
- Plasmid-"Mini"-Präparationen für Restriktionsanalysen erfolgten nach Zhou *et al.* (1990)¹⁶⁶ bzw. mit dem Sigma-Kitsystem nach Herstellerangaben.
- Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem Qiaex-Kitsystem (Quiagen.)
- Die Sequenzierung von DNA wurde von der Firma GENTERprise durchgeführt. Dazu wurden 500 µg Plasmid mit 1 µM Primer in einem Gesamtansatz von 6 µl analysiert.
- Zellen des *E. coli* Stammes DH5a bzw. BL21 wurden bei 37 °C in Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) und auf LB-Agarplatten kultiviert¹⁶⁵.
- Chemisch-Kompetente Bakterien wurden nach Chung *et al.* (1989)¹⁶⁷ mit TSS Puffer (85 % LB-Medium, 10 % (w/v) Polyethylenglycol, 5 % (v/v) DMSO, 50 mM MgCl₂, pH 6,5) hergestellt und bei -80 °C gelagert. Die transformation dieser Zellen erfolgte durch Hitzeschock (1,5 min bei 42 °C).
- Elektrokompente Zellen wurden Dower *et al.*, hergestellt¹⁶⁸. Die Transformation dieser Zellen erfolgte mittels elektroporation.
- Zur langfristigen Lagerung von (transformierten) Bakterienstämmen eignen sich der Glycerolstock, bestehend aus 85 % (v/v) der Bakterienkultur (OD₆₀₀ von 0,5) und 15 % (v/v) Glycerol (steril) bestehen. Glycerolstocks werden bei -80 °C gelagert.

7.1.1 Konstruktion der Transfervektoren pVL-IGFRKDΔC und PAC-G2T-IGFRKDΔC

Die DNA der C-terminal verkürzten Kinasedomäne des IGFR (IGFΔC) wurde mittels PCR generiert. Mittels der unter 6.8.2 beschriebenen Oligonucleotidprimer wurde das verkürzte Stück amplifiziert. Als Template wurde PUC-IGFRKD verwendet, der die kodierende Sequenz für die cytoplasmatische domäne des IGFR trägt. Die Primer flankierten das 5'-Ende der resultierenden DNA mit der Restriktionsschnittstelle BamHI und das 3'-Ende mit der Restriktionsschnittstelle EcoRI. Die resultierende DNA wurde mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und EcoRI geschnitten und in die BamHI/EcoRI linearisierten Vektoren PVL1393 und PAC-G2T ligiert. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde mittels Sequenzierung überprüft.

Der Transfervektor PVL1393 führt zur Expression der monomeren Kinasen, während der Transfervektor PAC-G2T Vektor einen N-terminalen GST-Tag vermittelt und somit über GST

dimerisierte Kinasen erzeugt.

7.1.2 Konstruktion der Transfervektoren PAC-G2T-IGFRKD Δ 72C- E1069K und PAC-G2T-IGFRKD Δ 72C-E1067/1069K

Der Austausch der Aminosäure Glutamat zu Lysin an den Positionen 1067 und 1069 in der *hingeregion* der IGF-Rezeptorkinasedomäne zur Generierung der Einzelmutante E1069 K und der Doppelmutante E1067/1069K wurde mit Hilfe 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 zur Generierung der Einzelmutante wurde pAC-G2T-IGF Δ C verwendet. Dieses Kinasekonstrukt umfasst die Aminosäuren R941-K1271 der IGFKD und ist N-terminal mit GST fusioniert. Als Ausgangsvektor für die Doppelmutante wurde das Plasmid der generierten Einzelmutante pAC-G2T-IGF Δ C-E1069K verwendet. Die Primer für diese Substitutionen sind unter 6.8.2 aufgelistet. Zusätzlich zum Austausch der Aminosäuren wird während der *Site-Directed Mutagenesis* PCR eine Punktmutation durchgeführt, so dass im Falle der Einzelmutante eine neue Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease BSU36 erzeugt wird, bzw. im Falle der Doppelmutante die erhaltene Schnittstelle für Restriktionsendonuklease BSU36 entfernt wird. Das Einfügen bzw. Entfernen der Schnittstelle des mutierten Plasmids kann mittels Restriktionsanalyse im Agarosegel überprüft werden, so dass das mutierte Plasmid eindeutig identifiziert werden kann. Das Verfahren basiert auf einer 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 enthaltenden 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.

7.1.3 Konstruktion des *E.coli*-Expressionsvektor Pet21a(+)-NtHis-Tyrtide-TS-CtCys

Zur Expression von kleinen Peptiden in *E.coli* sollte ein Vektor generiert werden, in dem die Peptide an ein größeres, gut zu exprimierendes Protein („Carrier-Protein“) fusioniert werden, das wiederum

einen N-terminalen His-Tag zur Reinigung besitzt. Zwischen diesem *Carrier*-Protein und dem Peptid soll eine Erkennungssequenz für die TEV-Protease vorhanden sein, so dass das Peptid nach der Reinigung einfach von dem Carrier-Protein abgeschnitten werden kann. Weiterhin soll der Expressionsvektor C-Terminal an das Peptid die Sequenz HCQRE, die ein reaktives Cystein erhält, vermitteln.

Ausgegangen wurde vom Pet21a(+)-Vektor. Zunächst wurde mittels Linker-Pet-1 das Startcodon, der N-terminale His-Tag und Restriktionsschnittstellen für die Endonucleasen NdeI, EcoRV, XhoI, BamHI, EcoRI. Dazu wurden die Oligonucleotide 6.8.2.4 nach Standardmethode hybridisiert und in den NdeI/XhoI linearisierten Pet-21a(+)-Vektor ligiert (Pet-21a(+)-mod-NtHis). Die erfolgreiche Ligation konnte mittels der neuen Schnittstelle EcoRV überprüft werden. Anschließend wurde C-Terminal zu der NdeI/EcoRV/XhoI-Schnittstelle (*Cloning Site 1*) mittels Linker Linker-Pet-2 die TEV-Site, neue Restriktionsschnittstellen für die Endonucleasen BamHI SacI und EcoRI (*Cloning Site 2*), die Sequenz für das reaktive Cystein und das Stopcodon eingeführt. Dazu wurden die Oligonucleotide 6.8.2.5 nach Standardmethode hybridisiert und in den BamHI/EcoRI linearisierten Pet-21a(+)-NtHis-Vektor ligiert (Pet-21a(+)-NtHis-TS-CtCys). Die erfolgreiche Ligation konnte mittels der neuen Schnittstelle SacI überprüft werden. Das erhaltene Plasmid wurde mittels Sequenzierung überprüft. Die DNA des *Carrier*-Proteins Tyrtide, das für einen Teil der mittleren Domäne des Insulinrezeptorsubstrats (M515-D631) kodiert wurde durch einen Restriktionsverdau mit den Endonucleasen NdeI/XhoI aus dem Plasmid Pet-21a(+)-IRS1-Y612 erhalten, aufgereinigt und in den NdeI/XhoI linearisierten Pet-21a(+)-NtHis-TS-CtCys-Vektor ligiert. Das erhaltene Plasmid Pet-21(a) +mod-NtHis-Tyrtide-TS-CtCys wurde über Restriktionsanalyse mit NdeI/XhoI und mittels DNA-Sequenzierung auf das Vorhandensein dieses Fragments hin untersucht.

7.1.4 Klonierung der Peptide in den E. Coli-Expressionsvektor Pet21a(+)-NtHis-Tyrtide-TS-CtCys

In der Tabelle 7.1 sind alle Peptide, die in diesen Vektor ligiert wurden aufgelistet. Die Peptide wurden mit den Linkern unter 6.8.2 zwischen die TEV-Site und die Sequenz des reaktiven Cysteins in den *E.coli*-Expressionsvektor Pet21a(+)-NtHis-Tyrtide-TS-CtCys kloniert. Dazu wurden die Oligonucleotide nach Standardmethode hybridisiert, mit der Polynukleotidkinase phosphoryliert und anschließend in den BamHI/EcoRI linearisierten Pet-21a(+)-NtHis-TS-CtCys-Vektor ligiert. Die Linker sind so konzipiert, dass durch die Ligation die BamHI-Schnittstelle weg fällt, so dass die Klone durch Restriktionsanalyse mit den Endonucleasen BamHI und NdeI auf die Erfolgreiche Ligation hin untersucht werden konnten. Die erhaltenen Plasmide wurden mittels DNA-Sequenzierung analysiert.

Tabelle 7.1: Auflistung der Peptidsequenzen, die durch Expression im *E. Coli*-Expressionsvektor *Pet21a(+)-NtHis-Tyrtide-TS-Ct-Cys* generiert wurden.

Name	Sequenz
α D-Peptid	LKSYLRSLRPEMENN
Kontrollpeptid	RLIGNLRFYASGFK
IGF-NT K1	TQWLPSLLEHPM
IGF-NT K3	HLHVHVKFADRQ
α D-Peptid K2	HSALRPPASAAP
α D-Peptid K3	TTPDNSVFAAS

7.2 Phage Display

Das *Phage Display* ist eine Technik mit deren Hilfe eine große Anzahl an kurzen randomisierten Peptiden in relativ kurzer Zeit auf ihre Bindung gegenüber eines bestimmten Zielproteins untersucht werden können. Hierbei nutzt man den Bakteriophagen M13, der zu der Familie der Filamentösen Phagen gehört. Dieser Phage hat ein Genom von ca. 5kb einzelsträngiger DNA und dieses Genom codiert für 11 Gene. An die Hüllproteine pIII bzw. pVIII können kurze Peptide (an pVIII) oder auch längere Domänen (an pIII) angehängt werden, so dass sie durch den Phagen an dessen Oberfläche präsentiert werden. Durch Zyklen aus Bindung, Waschen, Eluieren und Amplifizieren werden die Peptide selektioniert, die am besten an das Zielprotein binden. Die folgenden Anleitungen sind dem Handbuch des „Ph.D.-12TM Phage Display Peptide Library Kit“ weitgehend entnommen, auf etwaige Abweichungen gegenüber des Handbuchs wird nicht ausdrücklich hingewiesen.

7.2.1 Selektionsschritte des *Phage Display*

Erster Tag

- Lösung des Zielproteins 0,1 μ g/ μ l in 0,1M NaHCO₃ herstellen. Als Kontrolle anstatt des Zielproteins Streptavidin (im Lieferumfang des Kits vorhanden) benutzen.
- 150 μ l der Lösung werden in die Vertiefung einer Mikrotiterplatte aufgebracht, wobei darauf zu achten ist, dass die gesamte Oberfläche benetzt wird.
- Anschließend wird die Mikrotiterplatte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Umgebung (Glasschale mit feuchtem Apura-Papier) inkubiert.
- Ausstreichen von *Escherichia coli* ER2738 von Glycerol-Stock (im Lieferumfang des Kits vorhanden) auf LB-Tet Platten.

Zweiter Tag

- Animpfen von 10ml LB-Medium mit ER2738 von der Platte (Für spätere Titerbestimmung der Eluate) und animpfen von 20ml LB-Medium pro zu untersuchendem Protein je in einem 250ml Erlenmeyerkolben. Inkubation bei 37°C unter heftigem Schütteln(180rpm – 230rpm).
- Abnehmen der Zielproteinlösung aus jeder gecoateten Vertiefung. Hierzu wird die Platte kräftig

mit der Oberseite nach unten auf ein sauberes Stück Küchenrolle oder Apura-Papier geschlagen, bis keine Feuchtigkeit mehr herauskommt. Anschließend wird jede gecoatete Vertiefung komplett mit Blocklösung (0,1M NaHCO₃ (pH 8,6), 5mg/ml BSA, 0,02% NaN₃) gefüllt und die Platte mindestens eine Stunde bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Während dieser Zeit wird TBST (TBS + 0,1% [v/v] Tween-20) hergestellt.

- Für die Streptavidin – Kontrolle wird 1µg/µl Streptavidin zum Blockpuffer gegeben, um jegliches Biotin in der Lösung zu komplexieren.
- Die Blocklösung wird abgenommen, wie in Schritt 6 und jede Vertiefung wird 6 mal mit TBST gewaschen. Hierzu werden 300µl der Lösung zugegeben und direkt wieder abgenommen und anschließend die Platte wieder auf einem Papierhandtuch getrocknet. Es sollte schnell gearbeitet werden, um ein Austrocknen zu verhindern.
- 4x10¹⁰ Phagen (10µl der Original Bibliothek) werden in 100µl TBST verdünnt. Diese Lösung wird in die Vertiefung pipetiert und unter leichtem Schütteln für 10-60 min bei RT inkubiert.
- Die nicht-gebundenen Phagen werden durch erneutes Ausschlagen verworfen. Anschließend wird die Platte 10mal mit TBST wie in Schritt 7 gewaschen, wobei immer frisches Papier benutzt werden, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.
- Eluiert werden die Phagen mit 100µl 0,2M Glycin/HCl (pH 2,2), 1mg/ml BSA Elutions Puffer. Dieser wird zugegeben und die Platte höchstens 10 Minuten bei RT unter schütteln inkubiert. Das Eluat wird abgenommen und mit 15µl 1MTris/HCl (pH 9,1) neutralisiert. Dies ist das 1. Eluat.
- Für die Streptavidin – Kontrolle wird 0,1mM Biotin in TBS als Elutions Puffer genommen.
- Von einem kleinen Teil des Eluats (2-3µl) wird der Titer bestimmt (siehe M13-Titerbestimmung). An diesem Punkt kann das Eluat über Nacht aufbewahrt werden und am nächsten Tag mit dem nächsten Punkt fortgefahen werden.
- Der Rest des Eluates wird zu den am Anfang angeimpften 20ml Kulturen gegeben und bei 37°C unter kräftigen schütteln für 4,5 Stunden inkubiert.
- Die Kultur wird in ein sauberes Zentrifugen-Röhrchen gegeben und für 10 Minuten bei 10.025g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Tube gegeben und erneut zentrifugiert.
- Die oberen 80% des Überstandes werden in ein frisches Zentrifugen-Röhrchen überführt und 1/6 dieses Volumens an PEG/NaCl hinzu pipetiert. Anschließend werden die Phagen mindestens eine Stunde bei 4°C prezipitiert (oder auch über Nacht).

Dritter Tag oder zweiter Abend

- Das PEG-Prezipitat wird für 15 Minuten bei 10.025g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und der Rest kurz erneut zentrifugiert, woraufhin der restliche Überstand mit einer Eppendorfpipette abgenommen wird.
- Das weißliche Pellet wird in 1ml TBS resuspendiert, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und anschließend für 5min bei max. rpm und 4°C in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert, um restliche Zellen zu pelletieren.
- Der Überstand wird in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und reprecipitiert mit 166,7µl PEG/NaCl. Der Ansatz wird 15-60 min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei max. rpm. und 4°C in einer Eppendorfcentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und nach kurzen rezentrifugieren der restliche Überstand mit einer Eppendorfpipette abgenommen.
- Das wiederum weißliche Pellet wird in 200µl TBS 0,02% NaN₃ gelöst. Die Lösung wird ein

letztes Mal für 1min bei max. rpm. und 4°C zentrifugiert, um die letzten unlöslichen Bestandteile zu pelletieren und der Überstand in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Bei der Lösung handelt es sich um das amplifizierte 1. Eluat.

- Von dem amplifizierten Eluat wird eine Titerbestimmung durchgeführt und der Rest bei 4°C aufbewahrt.
- Eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte wird wie in den Punkten 1-3 beschrieben gecoatet.

Vierter und fünfter Tag (Dritter Tag)

- Der Phagentiter (siehe Titerbestimmung) wird anhand der blauen Plaques bestimmt, um berechnen zu können, welches Volumen einem Titer von 1-2x10¹¹ pfu entspricht. Bei zu geringem Titer kann die Selektion mit einer Menge von nur 109 Phagen durchgeführt werden.
- Eine zweite Selektionsrunde wird durchgeführt wie in den Schritten 6-19, wobei im Gegensatz zu der ersten Runde 1-2x10¹¹ pfu des ersten Eluats genutzt werden. Zudem wird die Konzentration an Tween 20 in den Waschschrritten auf 0,5% [v/v] erhöht, um unspezifische Wechselwirkungen mit dem hydrophoben Plastik zu verringern.
- Der Titer des zweiten Eluats wird mit Hilfe der IPTG/Xgal Platten bestimmt und der Rest bei 4°C aufbewahrt.
- Eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte wird wie in den Punkten 1-3 beschrieben gecoatet.

Siebter Tag (Vierter Tag)

- Der Phagentiter wird bestimmt, so dass die dritte Selektionsrunde mit 1-2x10¹¹ pfu nach den Punkten 6-19 durchgeführt wird. Auch in der dritten Selektionsrunde wird die Tween Konzentration in den Waschschrritten bei 0,5% [v/v] gehalten.
- Der Titer des unamplifizierten Eluats der dritten Runde wird nach dem Protokoll der M13 Titerbestimmung bestimmt, wobei darauf zu achten ist, dass von diesen Platten später Plaques gepickt werden sollen, weshalb darauf zu achten ist, dass die Platten nicht länger als 18 Stunden inkubiert werden, da sonst Deletionen in den Peptiden auftreten und amplifiziert werden können. Das restliche Eluat wird bei 4°C aufbewahrt.

Anmerkung: Die Eluate, sowie die einzelnen gepickten Klone können für mehrere Wochen mit geringem Verlust des Titers im Kühlschrank aufbewahrt werden, für eine längere Lagerung jedoch sollte ein Glycerolstock angelegt werden, indem zu der vorhandenen Menge an Phagensuspension die gleiche Menge an autoklavierten 100 %igen Glycerol gegeben wird. Die Ansätze werden anschließend sehr gründlich gemischt durch vortexen und anschließend bei -20° C gelagert.

- Eine neue ER2738 Übernacht-Kultur wird angesetzt, indem eine Kolonie von der Platte gepickt wird.

Plaque Amplifikation:

- Die Übernacht Kultur aus dem letzten Schritt der Selektion wird 1:100 in LB Medium verdünnt. Anschließend wird pro zu pickenden Klon 3ml der Verdünnung in ein Falcon Tube gegeben. Zu Beginn sollten 10 Klone untersucht werden, oft reicht dies laut NEB, um eine Konsensussequenz zu finden.
- Mit einer sterilen Eppendorfpipettenspitze wird ein blauer Plaque gepickt und in ein Falcon Tube

überführt, dabei verbleibt die Spitze in der Kultur.

Wichtig: Es sollten nur Plaques von solchen Platten gepickt werden, die nicht mehr als ca. 100 Plaques aufzeigen, um eine Kreuzkontamination von mehreren Phagenklonen zu vermeiden.

- Die Ansätze werden für 4,5 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Wichtig: Die Inkubationszeit sollte nicht 5 Stunden überschreiten, da sonst Deletionsmutanten mit stark erhöhter Wahrscheinlichkeit auftreten können.
- Die Kulturen werden in Eppendorf – Reaktionsgefäße gegeben und für 30 Sekunden bei max. rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wird jeweils in ein neues Gefäß gegeben und wie oben zentrifugiert. Die oberen 80% des Überstandes werden wiederum in ein neues Gefäß gegeben. Dieser Überstand ist der amplifizierte Phagen-Stock. Er kann bei 4°C für mehrere Wochen bei dieser Temperatur gelagert werden, ohne eine große Veränderung des Titers. Für längere Lagerung ist es ratsam einen Glycerolstock anzulegen, wie oben beschrieben.

7.2.2 Titerbestimmung von M13 Phagen

Der *E. Coli* Wirt-Stamm ER2738, der von NEB mitgeliefert wird ist ein robuster F+ Stamm, welcher eine schnelle Verdopplungsrate hat, eine Tetracyclin Resistenz trägt und sehr gut zur M13 Propagation geeignet ist. Obwohl ER2738 ein recA+ Stamm ist wurden laut NEB niemals spontane Rekombinationsereignisse *in vivo* mit M13 oder anderen Phagemid-Vektoren beobachtet. Der M13 Phage ist ein Bakteriophage, der spezifisch für „männliche“ Bakterien ist. Deshalb muss darauf geachtet werden, dass alle Kulturen, die zur Vermehrung des Phagen benutzt werden, in einem Medium gehalten werden, welches den F-Faktor selektioniert, in diesem Fall über die Tetracyclin-Resistenz. Kulturen sollten immer von einem Klon eines Verdünnungsausstriches ausgehen. Hierzu wird von dem Glycerol-Stock auf eine LB-Tet Platte ausgestrichen und diese anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert. Diese Platte kann einen Monat mit Parafilm abgedichtet bei 4°C im Dunklen aufbewahrt werden. Die zu infizierenden Kulturen können sowohl in LB, als auch in LB-Tet Medium herangezogen werden, da der Verlust des F-Faktors in der Zeitspanne von max. 5 Stunden unerheblich ist. Nur bei serieller Verdünnung dieser Kulturen könnte es zu einem Problem kommen, weshalb Übernacht-Kulturen immer in LB-Tet Medium zu machen sind.

- 5-10 ml LB Medium werden mit einer Übernacht-Kultur oder mit einem von einer LB-Tet-Agar-Platte gepickten Klon angeimpft und bis zu einer OD600 von ca. 0,5 herangezogen.
- Während die Zellen wachsen wird ein Wasserbad auf 45°C vorgeheizt, anschließend wird Agarose-Top in der Mikrowelle geschmolzen und pro zu untersuchenden Klon eine Menge von 3ml in ein steriles Falcon Tube gegeben. Die Tubes werden im 45°C Wasserbad bis zum Gebrauch flüssig gehalten.
- Pro Klon und Verdünnung wird eine LB/IPTG/Xgal Platte bei 37°C vortemperiert.
- Es wird eine 10-fache Verdünnungsreihe der Phagen angesetzt.

Anmerkung: Für amplifizierte Phagen sollten die Verdünnungen 108-1011 untersucht werden. Für unamplifizierte Eluate sollten die Verdünnungen 101-104 untersucht

werden.

- Wenn die Zellen gut angewachsen sind werden 200µl pro Verdünnung abgenommen und in ein Eppendorf – Reaktionsgefäß gegeben.
- Zu den Bakterien werden 10µl einer Phagen-Verdünnung gegeben, wobei darauf zu achten ist, dass mit der größten Verdünnung angefangen werden sollte, um eine Verfälschung zu vermeiden. Nach der Zugabe werden die Proben kurz gevortext und 1-5´ bei RT inkubiert.
- Für jede Verdünnung einzeln wird nach der anderen die Zellen in die Falcon-Tubes mit Agarose Top gegeben diese dann schnell gevortext, augenblicklich auf die vorgewärmten LB/IPTG/Xgal Platten geschüttet und durch hin und her bewegen einheitlich auf der Platte verteilt.
- Die Platten bleiben einen Moment unter der Bank stehen, bis der Agarose Top erstarrt ist. Dann können die Platten invertiert werden und über Nacht bei 37°C inkubiert.
- Am nächsten Tag werden die blauen Plaques auf den Platten ausgezählt. Um den Titer zu errechnen muss die Zahl der Plaques mit der Verdünnung multipliziert werden und durch die Menge an eingesetzter Phagenlösung (10µl) geteilt werden, so erhält man einen Titer von [pfu/µl].

7.2.3 DNA-Extraktion aus Phagen Nach QIAprep® Spin M13 Kit

- 3 ml LB – Medium werden 1:100 mit Übernacht-Kultur von *E. coli* ER2738 angeimpft. Anschließend wird ein Plaque einer Titerbestimmung gepickt und zu der Kultur gegeben. Ist kein Plaque vorhanden kann die Kultur auch mit 5µl des Phagen-Überstandes angeimpft werden, wobei aber das Picken von Plaques zu bevorzugen ist. Die Kultur wird 4,5-5 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Auch hier gilt, zu lange Inkubation begünstigt Deletionsmutanten und zudem kann es zur Verunreinigung der Proben durch chromosomale DNA von lysierten Zellen kommen.
- Zentrifugation der Kulturen bei 5000 rpm für 15min bei RT.
- Abnehmen des Überstandes in frische Reaktionsgefäße. Hierbei darf das Pellet nicht gestört werden, um keine Bakterien zu verschleppen.
- Rezentrifugation des Überstandes wie oben. Hierdurch kann sichergestellt werden, dass der Überstand wirklich sauber ist.
- Zugabe von 1/100 Volumen Puffer MP zur M13 Präzipitation (30 µl). Vortexen und bei Raumtemperatur mindestens 2min inkubieren. Bei diesem Schritt werden die Phagen aus dem Medium präzipitiert.
- Säule auf ein frisches 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß geben und Auftragen von 700 µl der Probe auf das Sälchen. Das Beladen der Sälchen muss in 700 µl Schritten erfolgen, da die Säulen nicht mehr Volumen fassen können.
- Zentrifugation 15sec bei 8000 rpm und RT in einer Eppendorf-Zentrifuge, Durchfluss verwerfen. In diesem Schritt werden die intakten Phagen auf der Säule zurück gehalten.
- Wiederholung der Schritte letzten beiden Schritte bis die gesamte Probe aufgebracht ist.
- Zugabe von 700 µl Puffer MLB, zur M13 Lyse und Bindung, auf das Sälchen. Anschließende Zentrifugation 15 sec, 8000 rpm, RT. Die Säule wird äquilibriert und die Lyse der Phagen beginnt.
- Zugabe von weiteren 700 µl Puffer MLB auf das Sälchen. Inkubation für 1 min bei RT zur vollständigen Lyse der Phagen. Zentrifugation: 15 sec, 8000 rpm, RT. Nach der Lyse werden die Proteine von der bindenden ssDNA getrennt

- Waschen mit 700 µl Puffer PE und Zentrifugation 15 sec, 8000 rpm, RT. Überschüssiges Salz wird hier entfernt.
- Der Durchfluss wird verworfen und die Säule erneut zentrifugiert, wie oben. In diesem Schritt wird das Ethanol entfernt, welches bei weiteren Reaktionen stören würde.
- Säule auf ein frisches 1,5 ml Eppendorf – Reaktionsgefäß geben und Auftragen von 100 µl auf 50 °C vorgewärmten Puffer EB (10mM Tris/HCl, pH 8,5) in die Mitte der Säulenmembran. Inkubation 10 min bei RT und abschließende Zentrifugation für 30 sec bei 8000 rpm und RT.
- Die Konzentration der erhaltenen DNA wird photometrisch bestimmt (siehe DNA-Konzentrationsbestimmung mit dem Photometer) und kann sequenziert werden.

7.2.4 ELISA

Der *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) dient qualitativen und quantitativen Nachweis von Proteinen und hat eine sehr geringe Nachweisgrenze. Die Basis jedes ELISA stellen drei chemische Prozesse dar:

1. Die spezifische Interaktion von Antigen und Antikörper
2. Die Adsorption von Antikörper oder Antigen an eine Plastikoberfläche
3. Die enzymatische Nachweisreaktion

Beim ELISA wird eine Festphase (Plastikoberfläche) zuerst mit einer Antigen-haltigen Lösung beschichtet (*gecoatet*). Danach wird die überschüssige Lösung abgenommen und nicht-gebundene Antigene durch mehrmaliges Waschen entfernt. Anschließend wird die beschichtete Phase (z.B. Mikrotiterplatte) mit einem spezifischen Antikörper inkubiert und wiederum ungebundene oder unspezifisch gebundene Antikörper weg gewaschen. Hieran schließt sich eine Inkubation mit einem zweiten Antikörper, der gegen den ersten bindet und mit einem Marker-Enzym konjugiert ist. Nachdem erneut die überschüssigen Antikörper entfernt wurden, erfolgt der Nachweis des gebundenen zweiten Antikörpers über eine farbliche enzymatische Reaktion. Hierbei ist die Menge an gebundenem Sekundäntikörper und damit die Menge an Enzym proportional zur Menge an gebundenem Primäntikörper.

In dieser Arbeit wurde eine abgewandelte Form des ELISA benutzt. Es wurden bei den Experimenten nicht direkt die Menge an gecoatetem Protein nachgewiesen, sondern er diente dazu die Qualität der Bindung der isolierten Phagen Klone zu bestimmen. Hierzu wurde ein Mikrotiterplatte mit dem Zielprotein beschichtet und anschließend verschiedene Konzentrationen von Phagen darauf inkubiert, die schließlich dann mit Hilfe des ELISA´s nachgewiesen werden.

7.2.4.1 Amplifikation der Phagenklone für ELISA

- Ein Rest (10µl) des Phagen beinhaltenden Überstandes aus der Phagenamplifikation zur DNA-Extraktion muss aufbewahrt werden
- Für jeden zu charakterisierenden Klon werden 20 ml LB-Medium mit einer Übernacht-Kultur

von ER2738 1:100 angeimpft.

- Die 20ml Kultur wird mit 5µl Phagen Überstand angeimpft und 4,5 h bei 37° C unter schütteln inkubiert.
- Die Kultur wird in ein Zentrifugen-Röhrchen überführt und 10 min bei 10.025g zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Röhrchen gegeben und erneut zentrifugiert, wie oben.
- Die oberen 80 % des Überstandes werden in ein drittes Röhrchen gegeben (ca. 15 ml) und 1/6 des Volumens (2,5 ml) PEG/NaCl zugegeben. Kurz mischen und mindestens 1 Stunde, oder besser über Nacht bei 4°C die Phagen präzipitieren lassen.
- Das Präzipitat wird 15 min bei 10.025 g und 4°C pelletiert. Der Überstand wird abgegossen, das Präzipitat kurz erneut zentrifugiert und der restliche Überstand mit einer Pipette vollständig abgenommen.
- Das verbleibende Pellet wird in 1 ml TBS resuspendiert, in ein Eppendorf Reaktionsgefäß transferiert und anschließend 5 min bei 4°C und max. rpm. zentrifugiert.
- Der Überstand wird in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und erneut mit 1/6 des Volumens (166,7 µl) PEG/NaCl versetzt. Anschließend wird das Gemisch 15-60 min auf Eis inkubiert.
- Der Ansatz wird für 10 min bei 4° C und max. rpm. zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und der Rest des Überstandes nach kurzem erneutem zentrifugieren mit der Pipette abgenommen.
- Das Pellet wird in 50µl TBS resuspendiert, und der Titer der Lösung bestimmt (7.2.2).

7.2.4.2 ELISA der Klone des Phage Display's

- Eine Reihe pro zu untersuchenden Klon einer Mikrotiterplatte (96-Well) wird mit 100-200 µl einer 100 µg/ml Zielproteinlösung in 0,1M NaHCO₃ (pH 8,6) gecoatet, eine weitere Reihe pro Klon wird nicht gecoatet. Die Platte wird über Nacht bei 4 °C in einer feuchten luftdicht verschlossenen Box inkubiert.
- Die überschüssige Lösung wird abgenommen, indem die Platte umgekehrt auf ein Stück Küchenrolle ausgeschlagen wird. Anschließend wird jede Vertiefung vollständig mit Blockpuffer gefüllt. BEACHTET: Zusätzlich sollte eine Reihe pro zu untersuchenden Klon nur geblockt werden, um die Bindung des Klons gegen BSA geblocktes Plastik zu untersuchen. Eine weitere Mikrotiterplatte wird ebenfalls geblockt, um später darin die
- Phagen Verdünnungen vor zu nehmen, damit bei der Verdünnungen die Phagen nicht schon an das Zielprotein bindet. Die Blocklösung wird 1-2 h bei 4°C inkubiert.
- Der Blockpuffer wird wiederum verworfen und die Platte 6 x mit 1x TBS/Tween gewaschen(Hierbei sollte die Konzentration an Tween gleich der Konzentration, die bei den Selektionsschritt verwandt wurde.)
- Während die Zielproteinplatte weiter geblockt wird, wird eine vierfache serielle Verdünnung der Phagen in 270µl TBS/Tween (s.o.) durch geführt. Start 1.Reihe mit ca. 2,5x10¹¹ Phagen (in 200 µl => 4/3 x 2,5 x 10¹¹ pfu in 270 µl) und nach rechts vierfache Verdünnungen vornehmen bis hin zu ca. 5* 10⁴ Phagen.
- Die Zielproteinplatte wird gewaschen, wie oben beschrieben. Die Phagen-Verdünnungen (200 µl) werden auf die Zielproteinplatte aufgebracht, wobei mit der geringsten Konzentration angefangen wird. Anschließend wird der Ansatz für eine Stunde bei RT unter Schütteln inkubiert
- Die Zielproteinplatte wird 6 mal gewaschen s.o.

- Der 1. Antikörper (α -FD Bakteriophage / rabbit) wird 1:5000 verdünnt in Blockpuffer. 200 μ l der ersten Antikörperlösung werden aufgebracht und anschließend 1 Stunde bei RT unter Schütteln inkubiert.
- Die Zielproteinplatte wird 6 x gewaschen s.o. Der 2. Antikörper (α -rabbit/goat/HRP konjugiert) wird 1: 20000 verdünnt in Blockpuffer (Dieser Antikörper muss immer neu verdünnt werden, die Peroxidase verliert innerhalb kürzester Zeit ihre Aktivität). 200 μ l der zweiten Antikörperlösung werden aufgebracht und anschließend 1 Stunde bei RT unter Schütteln inkubiert.
- Die Zielproteinplatte wird 6 x gewaschen s.o.
- Für den Nachweis werden folgende Reagenzien verwendet:
 - ◆ 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidi (TMB)-Substrat: 120mg TMB + 2,5ml DMSO (Dimethyl-Sulfon-Oxid) + 2,5ml Ethanol
 - ◆ GALLATI-CHRIS-Puffer: 4,2g tri-Natriumcitrat-2-Hydrat lösen in 50-60 ml MQ mit HCl auf pH-Wert 3,95 einstellen und auf 100ml mit MQ auffüllen. Anschließend wird zur Fertigstellung 34 μ l 30%tiges H₂O₂ dazu gegeben (in dunkler Flasche ca. 3 Wochen im Kühlschrank lagerbar)
 - ◆ TMB-Färbepuffer: 1% TMB-Substrat in GALLATI-CHRIS-Puffer
 - ◆ STOP-Puffer: 2M H₂SO₄
- Die Farbreaktion wird gestartet durch Zugabe von 200 μ l des TMB-Färbepuffers. Anschließend wird die Platte 10 min im Dunkeln bei RT und unter Schütteln inkubiert. Dabei entsteht eine abgestufte Blaufärbung in den einzelnen Vertiefungen.
- Die Farbreaktion wird gestoppt durch Zugabe von 100 μ l STOP-Puffer. Dabei schlägt die Farbe um zu einem Gelb.
- Diese Färbung kann dann bei 450nm in einem Mikrotiterplatte ausgemessen werden. Fotografie der Platte zur optisch-quantitativen Auswertung.

7.3 Biochemische Methoden

7.3.1 Baculovirusexpressionssystem

7.3.1.1 Allgemeines

Baculoviren gehören zu der Gruppe der doppelsträngigen DNA-Viren. Jede Art befällt sehr stammes- und wirtsspezifische Insekten. Der am meisten untersuchte Virus ist der *Autographa californica nuclear polyhedrosis Virus (AcNPV)*, welcher sich in den Säulenzellen im Darmtrakt der Schmetterlinge *Autographa californica* und *Spodoptera frugiperda (Sf)* vermehrt.

Die 130 kbp große DNA ist in einer Stab-förmigen Proteinhülle verpackt, die zusätzlich mit einer Lipidmembran umgeben ist; bis zu 100 solcher Partikel bilden, in einer aus Polyhedrin bestehenden Proteinhülle das Dauerstadium des Virus (Einschlusskörper; occlusion body). Die Einschlusskörper werden vom Wirt oral aufgenommen und gelangen so in den Verdauungstrakt des Insektes. Dort wird die Polyhedrinhülle abgebaut und die infektiösen Viruspartikel verschmelzen, nach der Passage der peritrophischen Membran, mit der Zellmembran ihre Wirtszellen. Die hier freigesetzte DNA wandert

in den Zellkern und wird nach etwa sechs Stunden (post infection; p.I) repliziert und transkribiert. In der frühen Phase (10h p.I.) verlassen vornehmlich die Stäbchen-förmigen Partikel durch Knospung die Zelle und infizieren Zellen in ihrer Umgebung; die ersten Einschlusskörper sind nach 48 h p.I. detektierbar. Die Lyse der Zellen setzt nach 72 h ein.

Das Polyhedrin ist im Lebenszyklus für das Virus ein sehr wichtiges Protein, unter Zellkulturbedingungen ist es aber nicht notwendig. Ein unter Kontrolle des Polyhedrinpromotors in das virale Genom eingeschleuste Gen kann in hohen Konzentrationen in den Insektenzellen expremiert und gereinigt werden. Ein weiterer Vorteil dieses Expressionssystems ist sein eukaryotischer Ursprung. Viele posttranslationalen Modifikationen wie Faltung, Disulfidbrücken und Glykolysierungen werden von den Insektenzellen korrekt ausgeführt, so dass die gereinigten Proteine auch ihre volle biologische Funktion erhalten.

Das einbringen von Fremd-DNA in die Virus-DNA gelingt durch die homologe Rekombination eines die DNA enthaltenen speziellen Transfervektors mit linearisierter AcNPV-DNA. Isolierte Viren werden dann sukzessive vermehrt und für die Infektion großer Insektenkulturen verwendet. Die Reinigung des expremierten Proteins erfolgt nach der Lyse der Zellen mit Chromatographischen Verfahren (7.3.4).

7.3.1.2 Sf9-Zellkultur

Die Sf9-Zelllinie stammt aus dem Mitteldarmgewebe von *Spodoptera frugiperda*. Nicht infizierte Zellen sind in ihrem äußeren Erscheinungsbild gleichmäßig rund und verdoppeln sich etwa alle 18 bis 24 Stunden bei 27°C. Sie können entweder in Suspensionskultur in einer Spinnerflasche oder als „Monolayer“-Kultur in Gewebeschalen gehalten werden. Neben einer auf ihre Bedürfnisse abgestimmten Nährlösung enthält das Kulturmedium fötales Kälberserum, welches den entsprechenden Wachstumsfaktor liefert, als auch Gentamycin und Fungizone mit antibakteriellen und antifungizider Wirkung. Die Zellzahl sollte zwischen 1×10^6 Zellen pro ml Medium betragen. Die Vitalität der Zellen (Anzahl an lebender Zellen) wird durch Anfärbung der Zellen mit Trypanblau bestimmt, welches tote Zellen blau an färbt.

Mit Viren infizierte Zellen unterscheiden sich generell in ihrer Größe, dem stark vergrößerten Zellkern und einer granulären Struktur im Zytosol. Daneben ist ihre Generationsdauer stark eingeschränkt und ihre Adsorptionsfähigkeit an das Kulturgefäß nicht mehr gegeben. Als Kontrolle werden immer Negativansätze mit nicht infizierten Zellen bei allen Infektionen, Transfektionen und Plaque Assays mit angesetzt.

7.3.1.3 Transfektion von Sf9-Zellen mit dem BaculoGold™ Transfection Kit

Die zu expremierende DNA wird unter der Kontrolle des Polyhedrin-Promoters in einen sog. Transfervektor kloniert. Dieser kann aufgrund seiner Ampicillinresistenz und einem *E.coli* Replikationsursprung (ORI) in Bakterien vermehrt werden. Daneben enthält er Sequenzen der *AcNPV*-DNA. Wird er zusammen mit der im Kit enthaltenen linearisierten, letalen Form des *AcNPV* in Insektenzellen transfiziert, können Vektor und virale DNA *in vivo* rekombinieren und es entsteht eine intakte, rekombinante Virus-DNA. Die daraus gebildeten neuen infektiösen Viruspartikel enthalten das gewünschte Gen. Durch den Einsatz letaler Virus-DNA liegt die Wahrscheinlichkeit, dass die entstehenden Viren auch das gewünschte Gen enthalten bei 70-90 %.

In einer 25 cm² bzw. 15 cm² Kulturflasche werden 1 x 10⁶ bis 3 x 10⁶ Zellen in 2 oder 3 ml Medium vorgelegt und für 15 min zur Adsorption stehen gelassen. Während dieser Zeit pipettiert man 1 µg der mittels Midi-Prep gewonnen und durch Ethanolpräzipitation gereinigten Transfervektor-DNA zu 0,25 µg Virus-DNA in einem sterilen Reaktionsgefäß, mischt dieses und lässt es bei Raumtemperatur ca. 5 min stehen. Nach der Adsorptionszeit wird das Medium aus der Kulturflasche abgesaugt und 0,5 ml Transfektionspuffer A gleichmäßig auf die Zellen gegeben und die Flasche geschwenkt. Nachfolgend gibt man 0,5 ml Transfektionspuffer B zu dem Virus-Transfervektor-DNA-Gemisch und gibt diese Lösung auf die Zellen, wobei nach der Zugabe von je 2 Tropfen die Schale bewegt wird um sie mit dem Puffer A zu mischen. Das im Puffer B enthaltenen CaCl₂ bewirkt die Aufnahme der DNA in die Zellen. Die Zellen werden unter stündlichem Schwenken der Schale im Brutschrank für 4 h bei 27 °C inkubiert. Danach wird das Transfektionsgemisch abgesaugt und durch 2,5 ml frisches Kulturmedium ersetzt.

Der Überstand wird nach fünf Tagen abgenommen, durch frische 2,5 ml Kulturmedium ersetzt und weitere zwei Tage im Brutschrank inkubiert. Der abgenommene Überstand (P1*) wird bei 2300 rpm für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Dasselbe wird mit dem Überstand (P3*) zwei Tage später auch gemacht. Rekombinante Viren werden anschließend durch einen Plaque Assay isoliert und rekombinante Klone durch immunologischen Nachweis des expremierten Proteins identifiziert.

7.3.1.4 Plaque Assay

Der Plaque Assay dient zur Isolation rekombinanter Viren nach der Transfektion und kann zur Titer-Bestimmung eines isolierten und amplifizierten Virus-Stocks verwendet werden. Bei diesem Assay werden Zellen mit einem geringen Virus-Titer infiziert und die Zellen mit Agarose überschichtet. Die Überschichtung mit Agarose schützt die Zellen und limitiert die Verteilung des Virus in der

Petrischale.

Wenn jede infizierte Zelle Virus produziert und folglich lysiert, sollten nur die direkt benachbarten Zellen neu infiziert werden. Dadurch entstehen Gruppen von infizierten Zellen, die man später als Plaques bezeichnet; nicht infizierte Zellen scheinen durchsichtig. Jeder Plaque repräsentiert ein einzelnes Virus.

Durch Auszählen der Plaques in einer bestimmten Verdünnung kann auf den Virus-Titer zurückgeschlossen werden. Zur Identifizierung einzelner rekombinanter Klone wird die Position eines isolierten Plaques markiert und die über ihm befindliche Agaroseschicht, die durch die Lyse freigesetzten Virenpartikel enthält, mit einer Pasteurpipette ausgestochen und abgesaugt. Das isolierte Stück Agarose wird in ein Falconröhrchen mit 1 ml Kulturmedium überführt. Von dieser Suspension wird eine 25 cm² Kulturflasche mit 1×10^6 Zellen angeimpft. Die Kultur sollte für drei Tage bei 27 °C bis zur Ernte inkubiert werden. Dadurch erhält man ein einzelnes Virus, welche in Kulturflaschen und Spinnerkulturen amplifiziert wird

7.3.1.5 Infektion, Proteinexpression Ernte und Lyse 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 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 72 h inkubieren
- Zellen abzentrifugieren (10000 g, 4 °C, 10 min)
- Zellpellet in 1 x PBS Lösung resuspendieren und erneut abzentrifugieren (10000 g, 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).

Zellyse:

- Zellen in Aufschlußpuffer resuspendieren (10^7 Zellen/ml).
 - ◆ Aufschlußpuffer: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 0,25 M Saccharose, 1 x *Complete*
- 3 x 5 sec. Sonifizieren (100 Watt, auf Eis)
- Im Elvehjem-Potter-Homogenisator bei 700 Umdrehungen homogenisieren

- Unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation entfernen (10 min, 10000 g)
- Überstand abnehmen in Ultrazentrifugenröhrchen überführen.
- In der Ultrazentrifuge bei 40000 rpm und 4 °C für 45 min zentrifugieren.
- Den Überstand nach Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff bei -80 °C lagern oder direkt weiterverwenden.

7.3.2 Proteinexpression in *E.coli*

Zur Expression der GST-Fusionsproteine GST-IGFNT, GST-IRNT wurde der Expressionsvektor pGex-3x verwendet. Die Expression erfolgte in *E. Coli* BL21. Zur Regulation der Expression der Fusionsproteine ist in diesem Vektor ein tac-Hybridpromotor vorhanden. Dieser setzt sich aus dem trp-Promotor und aus einem Teil der Promotor-Operator-Sequenz des lac-Operons zusammen. Das Gen lacq kodiert für das Repressorprotein innerhalb dieses Regulationsmechanismus. Das überexprimierte Repressorprotein inhibiert die Transkription des Fusionsproteingens. Wird der unphysiologische Induktor Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG) zugegeben, bindet dieser an das Repressorprotein und inaktiviert dieses. Die Transkription ist nicht länger gehindert. Das Plasmid besitzt außerdem den Selektionsmarker Amp^r. Die Ampicillinresistenz ist notwendig für die Selektion der mit dem Plasmid transformierten Bakterien.

Zur Expression der His-getagten Proteine Tyrtide- His, TEV-His sowie aller Fusionspeptide wurde der Expressionsvektor Pet-21a(+) bzw. der modifizierte Pet21a(+)-NtHis-Tyrtide-TS-Ct-Cys verwendet. Der Pet-Vektor besitzt ebenfalls ein Ampicillin-Resistenzgen. Die eingebrachten Gene werden als Fusionsproteine mit einem carboxyterminalen- (Pet-21a(+)) bzw. einem N-terminalen (Pet21a(+)-NtHis-Tyrtide-TS-Ct-Cys) Hexahistidintag unter Kontrolle des T7 Promotors exprimiert. Die Expression erfolgte in BL21-DE3 Zellen. Die Anzucht der Bakterien und die Induktion der Proteinexpression erfolgte nach Smith und Johnson (1988)¹⁶⁹.

Durchführung der Expression in *E.coli*:

- Transformierte *E. coli* BL12 in LB-Amp-Medium animpfen, über Nacht inkubieren (37 °C, 220 rpm).
- Übernachtskultur 1:10 mit LB-Medium (37 °C) verdünnen.
- Inkubation für 1h, bei 37 °C und 18 rpm.
- Induktion mit IPTG (Endkonzentration 0,1 mM).
- Inkubation bei 37 °C und 180 rpm für 4 h.
- Bakterien abzentrifugieren (10 min, 3500 rpm, 4 °C).
- Zellen mit 1/50 Kulturvolumen eiskaltem 1 x PBS waschen.
- Bakterien erneut abzentrifugieren (10 min bei 5. g, 4 °C).

- Das Pellet kann in Stickstoff schockgefroren werden und dann bei -80 °C aufbewahrt werden.

7.3.3 Herstellung von Solubilisaten nach Proteinexpression in E.coli

7.3.3.1 Standardlyse

Über die Standardlyse wurden die Zellen der GST-getagten Proteine, sowie Tyrtide-His aufgeschlossen:

- Zellen in 1/100 Kulturvolumen eiskaltem 1 x PBS (1 X *Complete* Proteaseinhibitor) resuspendieren.
- Aufschluss durch Ultraschall (5 x 5 sec, 100 Watt, auf Eis).
- Zugabe von DTT (EK 1 mM).
- Unlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugation entfernen (15 min, 10.000 g, 4 °C).
- Lysat über Glutathion-Sepharose-Affinitätschromatographie bzw. Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie reinigen.

7.3.3.2 Lyse der Fusionspeptide aus dem *Pet21a(+)-NtHis-Tyrtide-TS-Ct-Cys*-Vektor

Da die Proteinausbeuten über die Standardlyse bei den Fusionspeptiden nur sehr schlecht war, wurde zur Lyse dieser Zellen ein andere Protokolle ausprobiert. Es stellte sich heraus, dass sich die Proteinausbeute durch die Zugabe von Triton-X100 (EK 1 %) und mehrmaligem Lysieren deutlich steigern lies. Die Zellen aller aus dem Expressionsvektor *Pet21a(+)-NtHis-Tyrtide-TS-Ct-Cys* wurden über das folgende Protokoll aufgeschlossen:

- Zellen in 1/50 Kulturvolumen Ni-NTA-Lysispuffer durch Ultraschall (5 x 5 sec, 100 Watt, auf Eis) lysieren.
- Zugabe von *Complete* (EK 1 x), DTT (EK: 1 mM) und Triton-X-100 (EK: 1 % (V/V)).
- Zentrifugation für 15 min, bei 10000 g, 4 °C.
- Lysat auf Eis stellen und Pellets in 1/25 Kulturvolumen Ni-NTA-Lysispuffer resuspendieren und lysieren.
- Zugabe von *Complete* (EK 1 x), DTT (EK: 1 mM) und Triton-X-100 (EK: 1 % (V/V)).
- Zentrifugation für 10 min, bei 15000 g, 4 °C.
- Lysat auf Eis stellen und Pellets in 1/25 Kulturvolumen Ni-NTA-Lysispuffer resuspendieren und lysieren.
- Zugabe von *Complete* (EK 1 x), DTT (EK: 1 mM) und Triton-X-100 (EK: 1 % (V/V)).
- Zentrifugation für 10 min, bei 15000 g, 4 °C.
- Lysate vereinigen und über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie reinigen.

7.3.4 Chromatographische Methoden

7.3.4.1 Glutathion-Sepharose Affinitätschromatographie

GST ist ein 26 kDa großes Protein aus dem *Helminthen Schistosoma japonicum*. Das Glutathion S-Transferase-Expressionsystem ist eine Methode, die es ermöglicht, auf DNA-Ebene das gewünschte Peptid an ein sehr gut charakterisiertes Protein, die Glutathion S-Transferase (GST) zu koppeln. Die Fusionsproteine werden über Affinitätschromatographie gereinigt, wobei an Sepharose immobilisiertes Glutathion (γ -Glu-Cys-Gly) als Affinitätsmatrix verwendet, der Ligand der GST. Bei den Proteinen, die aus *E.coli* stammen, muss ein weiterer Waschschritt durchgeführt werden. Grund hierfür ist das 66 kDa große, aus *E.coli* stammende Chaperon DnaK, das über die Glutathion-Sepharose-Affinitätschromatographie mit aufgereinigt wird. Durch die Einführung des ATP/Mg²⁺ enthaltenden Waschschritt (ATPase Waschschritt) lässt sich diese ATPase Kontamination vollständig entfernen¹⁷⁰. Alle GST-getagten Proteine wurden über diese Methode aufgereinigt. Die Methode eignet sich auch zur Reinigung von Spaltungsansätzen, bei denen ein GST-Tag abgespalten wird. Abgespalteses GST, sowie das GST-getagte, ungespaltene Protein bleiben auf der Säule hängen, das gespaltene Protein befindet sich im Durchlauf.

Herstellung der Affinitätssäule

- Leere Säule und Teflon-Einlage mit MQ und Ethanol spülen.
- Doppeltes Zielvolumen der Säule an Glutathion-Sepharose einfüllen (im Kühlraum).
- Matrix mit 20× Säulenvolumen 1x PBS spülen.
- Auslauf schließen, Säule in etwas 1x PBS stehen lassen (Matrix darf nie trocken laufen!).

Proteinreinigung

- Säule mit 3× Säulenvolumen an 1 x PBS äquilibrieren.
- Proteinlösung (z.B. Überstand einer Zentrifugation) auf die Säule geben, je 50 μ l von Überstand und Durchlauf in Eppi auffangen.
- Säule mit 5-10 × Säulenvolumen an GSH-Waschpuffer 1 (1 x PBS, pH 7,3) waschen, 50 μ l Durchlauf in Eppi auffangen.
- Im Falle der Proteine aus *E.Coli* Säule mit 5-10 x Säulenvolumen ATPase Waschpuffer (2,5 x ATP, 10 mM MgCl₂ in 50 mM Tris/HCl pH 7,5) waschen.
- Säule mit 5-10 × Säulenvolumen an GSH-Waschpuffer 2 (1 M NaCl in 50 mM Tris pH 7,5) waschen, 50 μ l Durchlauf in Eppi auffangen.
- Säule mit 5-10 × Säulenvolumen an GSH-Waschpuffer 3 (50 mM Tris pH 7,5) waschen, 50 μ l Durchlauf in Eppi auffangen.
- Säule 10 × mit 2 × Säulenvolumen Elutionspuffer eluieren.
- Säule 3 × abwechselnd mit je 15 ml Regenerationspuffer 1 und Regenerationspuffer 2

regenerieren Säule in 20 % Ethanol lagern.

- Eluate durch Spotttest auf Proteingehalt testen (7.3.10.1).
- Eluate einzeln im Centrikon mit 50 mM Tris pH 7,5 von Glutathion frei waschen und auf gewünschte Konzentration einstellen (7.3.6.1)

7.3.4.2 Nickel-Chelat Affinitätschromatographie

Fusionsproteine mit poly-Histidin-Resten lassen sich leicht und schnell mit Hilfe der Ni-NTA-Affinitätschromatographie reinigen. In der Ni-NTA-Chromatographie sind zweiwertige Ni-Ionen über vier ihrer sechs Bindungsstellen an NTA (Nitrilotriessigsäureacid), einem vierzähligen Liganden, der an der Agarose-Matrix gekoppelt ist, gebunden. Die Histidinreste der rekombinanten Proteine können an die beiden verbleibenden Bindungsstellen des Ni-Ions über ihre Imidazolringe binden, wodurch die Proteine an der Ni-NTA immobilisiert werden. Imidazol allein, eine Teilstruktur von Histidin, bindet ebenfalls an Ni-Ionen und kann zur Elution gebundener Proteine verwendet werden. Bei einer Imidazolkonzentration von 100-250 mM dissoziieren 6xHis-Proteine, da sie nicht länger mit Imidazol kompetieren können. Auch eine Reduktion des pH-Wertes lässt gebundene His-Tag-Proteine eluieren. Der Stickstoff des Imidazolringes von Histidin wird bei pH 4,5-5,3 protoniert, so dass so dass der Rest nicht mehr an das Nickel-Ion binden kann. Zur Verminderung der Bindung nicht-getagter, histidinhaltiger Backgroundproteine aus dem Zelllysate ist eine geringe Zugabe von Salzen (z.B. 150 mM NaCl) oder Imidazol (10-40 mM) bereits für die Adsorption und die Waschprozeduren empfehlenswert. Bei den Proteinen, die aus *E.coli* stammen, muss ein weiterer Waschschritt durchgeführt werden, um das aus *E.coli* stammende Chaperon DnaK zu entfernen. Durch die Einführung des ATP/Mg²⁺ enthaltenden Waschschritts (ATPase Waschschritt) lässt sich diese ATPase Kontamination vollständig entfernen¹⁷⁰. Über die Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie wurden alle His-getagten Proteine aus *E.coli*- bzw. *Sf9*-Zelllysaten aufgereinigt.

Die Nickel-Chelat Affinitätschromatographie eignet sich außerdem sehr gut zur Reinigung von Spaltungsansätzen, in denen His-getagte Proteine vorhanden sind. Zum einen können die TEV-Protease Spaltungsansätze der Fusionspeptide zur Abtrennung des ungespaltenen Fusionspeptids, dem abgespaltenen His-Tyrtide, sowie der TEV-Protease über die Ni-NTA-Matrix gegeben werden. Das abgespaltene, gewünschte Peptid befindet sich dann im Durchlauf. Zum Anderen wurde der Spaltungsansatz zur Monomerisierung der GST-IRKD-D1120A-His mittels Thrombin über diese Chromatographie gereinigt. Der GST-Tag, und das ungespaltene Protein wurden zuvor über eine Glutathion-Affinitätschromatographie entfernt.

Des Weiteren wurde die Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie zur Entfernung des überschüssigen Farbstoffs aus Markierungsansätzen (7.3.9) genutzt.

Herstellung der Affinitätssäule

- Leere Säule (geeignet: benutzte NucleoBond-Säule) und Teflon-Einlage mit MQ und Ethanol spülen.
- Doppeltes Zielvolumen der Säule an Nickel-NTA-Sepharose einfüllen (im Kühlraum).
- Matrix mit 20× Säulenvolumen 50 mM HEPES pH 7,5 spülen.
- Auslauf schließen, Säule in etwas 50 mM HEPES pH 7,5 stehen lassen (Matrix darf nie trocken laufen!).

Proteinreinigung

- Säule mit 3× Säulenvolumen an 50 mM HEPES pH 7,5 äquilibrieren.
- Lysat mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min über die Säulenmatrix geben.
- Matrix mit 20 x Säulenvolumen Waschpuffer (50 mM HEPES/150 mM NaCl/40 mM Imidazol pH 8,0) bei einer Geschwindigkeit von 1 ml/min waschen
- Säule mit 10 x Säulenvolumen an ATPase Waschpuffer (50 mM HEPES/2,5 mM ATP/10 mM MgCl₂) waschen (Nur für die aus *E.coli* stammenden Proteine).
- Elution mit 15x 2ml Elutionspuffer (50mM HEPES/250 mM Imidazol pH 8,0).
- Eluate durch Spotttest auf Proteingehalt testen (7.3.10.1).
- Eluate der Kinasen bzw. Tyrtideim Centrikon mit 50 mM Tris pH 7,5 von Glutathion frei waschen und auf gewünschte Konzentration einstellen (7.3.6.1)
- Eluate der Fusionspeptide über Nacht gegen 10 mM Tris/2 mM MgCl₂, pH 7,5 dialysieren (7.3.5).
- Proben der Lysate, dem Durchfluss, der Waschlösung und der Eluate werden auf einer SDS-PAGE (7.3.10.3) überprüft.

7.3.4.3 Ionen-Austausch-Chromatographie

Zur Aufreinigung der Lysate der IGFΔC und der Eluate der GSH-Reinigung der GST-IGFΔC, GST-IGFΔC-E1069K, GST-IGFΔC-E1067/1069K wurde eine *Resource Q* 1 ml Anionenaustauschersäule in einem FPLC (*Fast Performance Liquid Chromatography*)-System eingesetzt. 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.

7.3.4.3.1 ResourceQ 1 ml

Die *ResourceQ* (ResQ) 1 ml (Amersham Pharmacia Biotech) ist ein starker Anionenaustauscher. Die Säulenmatrix besteht aus monodispersen Polystyren und Divinylbenzen. Die Flussrate beträgt $F=2$ ml/min. Aufgetragen auf die Säule wurden 1 x 8 ml Lysat. Das Lysat wird im Eiswasserbad schonend aufgetaut, danach das Lysat auf jeweilige Konzentration (Tabelle 7.1) an IEX B eingestellt. Unlösliche Bestandteile werden durch Zentrifugation für 10 min bei 5000 rpm und 4 °C sedimentiert. Anschließend wird die Probe über einen 0,45 µm Luer-Filter filtriert und dann in die Probenschleife des Chromatographiesystems eingebracht. Nach Äquilibration der Säule mit der jeweiligen Konzentration an Puffer B (Flussrate 2 ml/min, für 2 ml) wird der Inhalt der Probenschleife in das Chromatographiesystem über eine 8 ml Probenschleife injiziert (Flussrate 2 ml/min).

Tabelle 7.2: Anteil an Puffer B Im Lysat, beim Äquilibrieren der Säule und beim linearen Salzgradient bei der Anionen-Austausch-Chromatographie der verschiedenen Proteine

Protein	Anteil an Puffer B im Lysat [%]	Äquilibrieren der Säule Anteil an Puffer B [%]	Isokratischer Fluss-linearer Salzgradient [%] Puffer B
IGFAC	5	7	0-30
GST-IGFAC, GST-IGFAC-E1069K, GST-IGFAC-E1067/1069K,	0	0	0-30

Nach vollständiger Beladung der Säule wird mit 8 ml des Gemisches aus der jeweiligen Konzentration an Puffer B (isokratischer Fluss, Flussrate 2 ml/min) gewaschen, um nicht gebundene Proteine mit dem Durchfluss zu entfernen. Durch kontinuierliche Erhöhung des Anteils an Puffer B in der mobilen Phase (Flussrate 2 ml/min), wird ein linearer Salzgradient angelegt. Dies führt zur Elution der Proteine von der Säule; das Elutionsprofil der an die Säule gebundenen Proteine wird durch photometrische Messung der Absorption A_{280} nm erstellt. Sind die Fraktionen (0,5 ml), die das gewünschte Protein enthalten, identifiziert worden, so können diese vereinigt werden. Zur vollständigen Freisetzung auf der Säule verbliebener Proteine wird der Anteil an Puffer B innerhalb von 3 min (Flussrate 2 ml/min) 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 nach erfolgter

Chromatographie wird diese mit MQ entsalzt (Flussrate 2 ml/min, für mindestens 5 min) und in 20 % Ethanol gelagert.

7.3.4.4 Gelfiltrationschromatographie Superdex 75 (prep. Grade)

Das Trennprinzip einer Gelfiltrationschromatographie basiert auf dem Größenausschlussverfahren. Die Superdex 75 (HiLoad™ 26/60 prep Grade) (320 ml Säulenvolumen) trennt Proteine in einem Größenbereich von 3000-70000 Da. Der Trennbereich ist abhängig von der Zusammensetzung der Gelmatrix, einem Dextran-Agarose-Gemisch. Vor dem Lauf muss die Säule über Nacht mit 500 ml Superdex-Puffer (Flussrate $F = 0,5$ ml/min) äquilibriert werden. Die Beladung der Säule und die Reinigung erfolgt mit einer Flussrate von 0,5 ml/min für 100 ml.

Kinasehaltige Fraktionen werden vereinigt und über einen Mikrokonzentrator (Amicon Ultra-4) bei 5000 x g und 4°C konzentriert. Die Säule wird anschließend mit 400 ml Superdex-Puffer gespült und danach auf 20% Ethanol gesetzt.

Reinigung:

- Auftauen der Eluate in Eiswasser.
- Eluate mit 1 mM DTT versetzen.
- Unlösliche Bestandteile werden durch Zentrifugation für 10 min bei 5000 rpm 4°C sedimentiert.
- Eluate in 1 ml – 8 ml Schleife füllen
- Beladen der Säule mit dem Eluat; $F = 0,5$ ml/min
- Starten des isokratischen Flusses, $F = 0,5$ ml/min
- Sammeln der Fraktionen (je 0,5 ml) mit Hilfe des Fraktionssammlers (nach ca. 2 ½ h)
- Die Eluate mittels Spot-Test auf Proteingehalt (7.3.10.1) und mittels SDS-PAGE auf Reinheit überprüfen
- Fraktionen mit reiner Kinase vereinigen und bei Bedarf über ein Centricon (7.3.6.1) einengen und bis zum weiteren Gebrauch bei 4°C lagern.

7.3.4.5 Reversed-phase-HPLC

Die chemisch synthetisierten Peptide wurden über die *Reversed-phase*- High Performance Liquid Chromatography (HPLC) gereinigt. Bei diesem chromatographischen Trennverfahren wird die zu untersuchende Substanz zusammen mit einem flüssigen Laufmittel, der "mobilen Phase" (auch "Eluent" genannt) auf eine sog. Trennsäule, die "stationäre Phase", gegeben. Wechselwirkt ein Bestandteil der zu untersuchenden Substanz stark mit der stationären Phase, verbleibt er auf der Säule. Wechselwirkt er hingegen schwach mit der stationären Phase, verlässt er die Säule früher. Je nach Stärke dieser Wechselwirkungen werde die Bestandteile der Substanz zu verschiedenen Zeiten (den "Retentionszeiten") von der Trennsäule eluiert. Es werden zwei Methoden unterschieden: Normal

Phase (NP) und Reversed Phase (RP). Die RP-HPLC ist in der Praxis die gängigste Methode. Hier wird eine unpolare stationäre Phase verwendet und eine polare mobile Phase. Die stationäre Phase wird hergestellt indem man mit langkettigen Kohlenwasserstoffen substituierte Silane 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:

Tabelle 7.3: Gradient an Puffer B der Reversed-phase-HPLC der chemisch generierten Peptide

Zeit [min]	Anteil an Puffer B [%]
0	0
15	30
30	45
40	50
54	100

Aufarbeitung:

- Peptidhaltige Fraktionen vereinigen.
- Lösungsmittel im Vakuum (Speed-Vac) abziehen.

- Rückstand mind. 3 x mit 5 % Ammoniumhydroxid resuspendieren und erneut abziehen (der pH-Wert der Peptidlösung darf nicht mehr sauer sein).
- Peptide in MQ aufnehmen (sollte die Lösung zu sauer sein, Zugabe von 50 mM Tris pH 10).
- Proteinkonzentrationsbestimmung über Absorptionsspektroskopie.

7.3.5 Dialyse von Proteinen

Die Dialyse dient dazu, Salze oder kleine Peptide wie Glutathion aus der Protein-Lösung zu entfernen und die Proteine zurückzuhalten. Der in dieser Arbeit verwendete Nitrocelluloseschlauch hatte eine Ausschlussgröße von 12 kDa-14 kDa, oder von 3,5 kDa d.h. alle größeren Proteine werden im inneren des Schlauchs zurückgehalten.

- Dialyseschlauch (auf Ausschlussgröße achten!!) zuschneiden (ca. 7+ (n ml Probenvolumen) cm)
- Dialyseschlauch in MQ aufkochen (1 min in der Mikrowelle)
- Dialyseschlauch an einem Ende zuknoten, mit H₂O überprüfen, dass der Knoten auch dicht ist
- Dialyseschlauch für 5min in Dialysepuffer bei 4°C komplett äquilibrieren
- Probe vorsichtig und ohne Aufschäumen in den Dialyseschlauch geben
- Dialyseschlauch am anderen Ende zuknoten
- An jedes Ende des Dialyseschlauch einen Schwimmer befestigen
- Dialyse bei 4°C gegen Tris-Puffer 50 mM pH 8,0 mit 2mM MgCl₂, wahlweise gegen 3l über Nacht, oder je 0,5l für je 30min

7.3.6 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen

7.3.6.1 Konzentrierung der gereinigten Proteine mittels Ultrafiltration

- Konzentrationsbestimmung mittels Spotttest zur Bestimmung der Ausgangskonzentration.
- Filter des Amicon Ultra-4 bzw. Amicon Ultra-15 10.000 NMWL mit 500 µl 50 mM Tris/HCl, pH 7.5 benetzen; Zentrifugation bei 3500 rpm und 4°C für ca. 10 min.
- Überschüssigen Puffer entfernen.
- Eluate zugeben und Zentrifugation bei 3500 rpm bei 4 °C, alle 5 min überprüfen, ob bis zum gewünschten Volumen eingengt ist.
- Eluate vorsichtig entnehmen und aliquotieren.
- Spotttest zur Bestimmung der Proteinkonzentration durchführen.
- Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefrieren und bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung lagern

7.3.6.2 Konzentrierung der gereinigten Peptide mittels Speed Vac

Das konzentrieren der Peptide mittels Vakuum unter Wärme eignet sich für hitzebeständige Peptide.

- Konzentrationsbestimmung mittels Spotttest zur Bestimmung der Ausgangskonzentration.
- Eluate in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführen und die Gefäße in die Speed-Vac stellen.
- Heizung auf Medium stellen.
- Rotor anstellen und anschließend Vakuum anlegen bis das gewünschte Volumen erreicht wird.
- Proteinkonzentrationsbestimmung über Absorptionsspektroskopie.

7.3.7 Proteolytische Spaltungen

7.3.7.1 Abspaltung des GST-Tags durch Thrombin-Behandlung

Der Gerinnungsfaktor Thrombin ist eine Serinprotease, die sehr spezifisch die Sequenz -Arg-Gly- an der Carboxylseite des Arginins spaltet. Das natürliche Substrat Fibrinogen wird von Thrombin an vier Arginin-Glycin-Peptidbindungen in vier Fibrinopeptide gespalten, die sich zu Fibrin zusammen lagern. Thrombin hat ein Molekulargewicht von 34 kDa.

Um aus der dimeren GST-IRKD-D1120A-His monomere Kinase zu gewinnen, wird das Protein mit Thrombin behandelt. Nach Thrombinbehandlung bleiben am N-Terminus der Kinasesequenz die Aminosäure Glycin zurück. Über einen Probeverlauf wurden die besten Spaltungsbedingungen ermittelt:

- 1 u Thrombin auf 300 µg Kinase in 10mM Tris; 1mM EDTA pH 8,0 für 20 min 4 °C.

Der Spaltungsansatz wurde anschließend über eine Glutathion-Sepharose-Matrix (7.3.4.1) gegeben um GST und ungespaltenes Protein zu entfernen. Der Durchlauf der Matrix wurde anschließend über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie gereinigt (7.3.4.2).

7.3.7.2 Abspaltung des GST-Tags bzw. His-Y612 durch die TEV-Protease

Die Kinase GST-TS-IGFA-Y950F besitzt zwischen GST und der Kinasesequenz einen Erkennungssequenz für die TEV-Protease, so dass das GST über einen proteolytischen Verdau abgespalten werden kann. Die Fusionspeptide aus dem Pet21a(+)-Nt-His-Tyrtide-TS-Ct-Cys-Vektor besitzen ebenfalls eine Erkennungssequenz für die TEV-Protease, zwischen der Tyrtide-Sequenz und dem Peptid selbst. Die TEV-Protease ist die 27 kDa große katalytische Domäne des Nuclear Inclusion a (Nia) Protein, das vom Tobacco Etch Virus kodiert wird. Die Struktur der TEV-Protease entspricht zwar der Struktur gewöhnlicher Serinproteasen, die Spaltung wird hier allerdings durch ein reaktives Cystein in der „katalytischen Triade“ durchgeführt. Die TEV-Protease besitzt eine sehr viel strengere Sequenz-Spezifität als Faktor Xa oder Thrombin. Sie erkennt ein lineares Epitop der Form E-X-X-Y-X-Q-(G/S), wobei X einer beliebigen Aminosäure entspricht, und spaltet zwischen Q und S/G. In unserer Arbeitsgruppe wird die Sequenz ENLYFQG verwendet. Da die TEV-Protease keine post-translationale Modifikation zur vollständigen Aktivität benötigt, kann sie in großen Mengen in *E.Coli*

expremiert und über Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt werden. Die TEV-Protease besitzt C-terminal einen His-Tag, so dass sie aus einem Spaltungsansatz über Nickel-Chelat-Matrix entfernt werden kann. Der Spaltungsansatz enthielt 10 mM Tris/HCl pH 8, 2 mM DTT. Gespalten wurde bei 4 °C (Kinase) bzw. bei 34°C (Fusionspeptide) für 1,5 (Kinase) bzw. 4 h (Fusionspeptide) auf dem Rollschüttler. Die TEV-Protease wurde in einem molaren Verhältnis von Protease zu Substrat von 1:20 (w/w) (Kinase) bzw. 1: 80 (Fusionspeptide) eingesetzt.

Bei der Kinase GST-TS-IGFA-Y950F wurde der GST-Tag durch den TEV-Protease-Verdau abgetrennt. Anschließend wurde der Ansatz über eine Nickel-Chelat-Säule gegeben, um die TEV-Protease rauszuwaschen (7.3.4.2). Der Durchlauf wurde dann über eine Glutathion-Sepharose-Matrix gegeben, um die gespaltenen Kinase von ungespaltenen Kinase und freiem GST abzutrennen (7.3.4.1).

7.3.7.3 Limitierte Proteolyse mittels Trypsin

In der Aktivierungsschleife der IGFRKD gibt es ein Lysin in einer Thrombinerkennungssequenz. Wenn die Aktivierungsschleife für Thrombin zugänglich ist, so wird das Enzym an dieser Stelle gespalten. Versuche haben gezeigt^{134,41}, dass die aktivierte Kinase eine offene Konformation besitzt und gespalten werden kann, wohingegen die inaktive Kinase eine geschlossene Konformation aufweist und somit an dieser Stelle nicht gespalten wird. Die Zugabe von ADP reicht allerdings aus, das Gleichgewicht in Richtung der aktiven Konformation zu verschieben, sofern es sich um eine intakte Kinase handelt⁹. Durchgeführt wird die Spaltung bei 50 mM Tris pH 7,5, 30 mM MgCl₂ und 2 mM DTT⁹. Die Spaltung wird mit bzw. ohne Zugabe von 10 mM ADP durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,1 µM Trypsin gestartet. Die Spaltung lief für 10 min bei Raumtemperatur und wurde durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt. Anschließend wurde die Spaltung auf der SDS-PAGE analysiert.

7.3.8 Analytische Modifikation von reaktiven Cysteinen mit Tetramethylrhodamin-5-maleimid

Die Proteine, die im Vektor Pet21a(+)-Nt-His-Tyrtide-TS-Ct-Cys expremiert wurden besitzen C-terminal die Sequenz HCQRE. Der P_K -Wert der Thiolgruppe des Cysteins dieser Sequenz wird durch die Sequenzumgebung ins saure verschoben, so dass der Schwefel nucleophil an den Maleimidring des Tetramethylrhodamin-5-maleimid via Michael Addition angelagert werden kann. Markierungen im kleineren Maßstab wurden durchgeführt, um die Reaktion der Farbstoffe auf variierte Markierungsbedingungen (wie z.B. Puffer, Reaktionszeit, Temperatur, pH-Wert usw.) bezüglich Markierungsausbeute zu testen. Um sicher zu stellen, dass nur das eine Cystein markiert wurde, wurde der Farbstoff im molaren Unterschuss zum Protein

eingesetzt. Ein Standardansatz enthielt 10 µg Protein und 1 µg Farbstoff. Markiert wurde in 10 mM Tris pH 7 für 30 min bei 4 °C. Abgestoppt wurde die Reaktion mit einem 10-fachen molaren Überschuss DTT zum Farbstoff. Sämtliche Schritte mit Farbstoff fanden unter gedämpftem Licht bzw. Lichtabschluss statt. Zur Auswertung wurden die Ansätze auf einem SDS-Gel untersucht. Der Farbstoff wird bei 543 nm angeregt und emittiert bei 575 nm, so dass markierte Proteine im SDS-Gel unter der UV-Lampe betrachtet und ausgewertet werden können. Eine Einfärbung der Proteinbanden in Peptidfärbelösung ist ebenfalls möglich.

7.3.9 Präparative Modifikation von reaktiven Cysteinen mit Tetramethylrhodamin-5-maleimid

Die Markierung im präparativen Maßstab wurde direkt während der Reinigung des Proteins auf der Nickel-Chelatmatrix durchgeführt. Die hier aufgeführte Anleitung ist das Ergebnis zahlreicher Ansätze und wurde während der Arbeit z.T. in leicht variiertes Ausmaß angewendet:

Die Matrix mit dem immobilisierten Protein aus 1 Liter Kulturvolumen wurde mit 10 µl (100 nmol) Farbstoff versetzt und für 30 min bei 4 °C auf dem Rollschüttler unter Lichtabschluss inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µM (Endkonzentration) DTT gestoppt. Anschließend wurde das Protein über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie (7.3.4.2) beschrieben gereinigt und anschließend dialysiert (7.3.5). Der Erfolg der Markierung wird über SDS-PAGE mit anschließender Analyse unter UV-Lampe überprüft.

7.3.10 Charakterisierung von Proteinkonzentration und -Identität

7.3.10.1 Konzentrationsbestimmung nach MINAMIDE und BAMBURG (1990)¹⁷¹ „Spot-Test“

1 µl der Proteinlösung, deren Konzentration zu bestimmen ist, sowie jeweils 1 µl der einzelnen Konzentrationen einer BSA-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, anschließend in Entfärbelösung entfärbt bis keine unspezifische Hintergrundfärbung sichtbar bleibt. Höhere Konzentration der zu untersuchenden Proteinlösung resultiert in einer intensiveren Blaufärbung an dem entsprechenden Auftragsort. Die Konzentration wird durch Vergleich mit den Farbintensitäten der Eichreihe abgeschätzt.

7.3.10.2 Konzentrationsbestimmung nach BRADFORD (1976)¹⁷²

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 $5 \cdot 10^{-2}$ μ g/ μ l) mit jeweils 100 μ l Bradford-Färbereagenzin 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-Eichgraden kann die Konzentration der zu analysierenden Proteinprobe ermittelt werden.

7.3.10.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli¹⁷³ (SDS-PAGE)

Lösungen von Proteinen können mittels SDS-PAGE aufgetrennt werden. Dazu werden die Proteine zunächst nach Zugabe des anionischen, amphiphilen Detergenz SDS, und DTT zur Reduktion intra- oder intermolekularer Disulfidbrücken, bei 95°C für 5 min denaturiert. Anschließend werden die entfalteten Proteine durch Anlegen einer Spannung in einem Gel nach ihrem Molekulargewicht getrennt; aufgrund des basischen pH-Wertes, der zur Elektrophorese eingestellt wird, und der Wechselwirkung mit SDS bewegen sich die Proteine in Richtung der Anode. SDS lagert sich stöchiometrisch an Proteine an (1,4 g SDS/1 g Protein, d.h. 1 Molekül SDS/2-3 Aminosäuren). Somit sind Nettoladung und native Struktur eines Proteins während der SDS-PAGE vernachlässigbar, und die elektrophoretische Mobilität eines Proteins ist proportional zum Logarithmus seines Molekulargewichts. Allerdings werden die elektrophoretischen Eigenschaften eines Proteins durch kovalente Modifikationen (z.B. Phosphorylierung, Glykosylierung) beeinflusst, da diese die Bindung von SDS an Proteine beeinflussen, wodurch mittels SDS-PAGE nur ein apparentes Molekulargewicht bestimmt werden kann. Die Polymerisation der Gellösungen erfolgt durch Zugabe von APS und TEMED.

7.3.10.4 Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophorese nach Schagger und Jagow¹²⁷ (Schagger-Gel)

Das Schagger-Gel ist eine diskontinuierliche SDS-PAGE zur Auftrennung von Proteinen im Bereich von 1-100 kDa. Die SDS-PAGE nach Laemmli hat den großen Nachteil, dass kleine Peptide unter 10 kDa nicht aufgetrennt werden können. Bei der Verwendung von höheren Acrylamidkonzentrationen zur Auftrennung kleiner Peptide kann man diese nicht mehr von der großen Menge an SDS trennen. Das liegt hauptsächlich daran, dass kleine Peptide Komplexe aus Protein und

Detergenz bilden, die alle die „gleiche“ Größe und Ladung wie die SDS-Mizelle selbst aufweisen. Eine große Verbesserung liefert da die Verwendung von Tricin an Stelle von Glycin im Laufpuffer. Glycin, wie es bei Laemmli im Laufpuffer verwendet wird, hat einen pK von 9,6. Die Anwesenheit von Glycin im Laufpuffer führt Sammlung von sehr großen Proteinen, weil es sehr langsam im sauren Sammelgel wandert; Allerdings führt eben das dazu, dass kleine Peptide nur gering, oder gar nicht vom SDS getrennt werden können. Bei der Verwendung von Tricin im Laufpuffer kann das Sammeln und Trennen der kleinen Peptide im Sammelgel unter einfacheren Bedingungen, gleicher pH wie das Trenngel und geringe Acrylamidkonzentration, gewährleistet werden. DA bei normalen pH -Werten zwischen 6,8 und 8,8 mehr Tricin in anionischer Form vorliegt, wandert es sehr viel schneller als Glycin im Sammelgel trotz der größeren Molekularmasse. Zusätzlich wird beim Schägger-Gel eine weitere Lage, das Spacer-Gel, eingeführt. Das Spacer-Gel, das zwischen Sammel- und Trenngel liegt, ermöglicht die Auftrennung von kleinen und großen Proteinen. Ohne das Spacer-Gel müsste zur Auftrennung der kleinen Peptide ein 8-10 % Sammelgel genutzt werden, wodurch Proteine oberhalb 20 kDa nicht mehr ordentlich aufgetrennt werden können. Durch die Einführung des 10 % Spacer-Gel reichen im Sammelgel Acrylamidkonzentrationen von 4-6 % aus, so dass auch große Proteine aufgetrennt werden können. Die kleinen Peptide trennen sich dann bei Eintritt ins Spacer-Gel vom SDS. Die Polymerisation der Gellösungen erfolgt durch Zugabe von APS und TEMED.

7.3.10.5 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE)

Die nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE) ermöglicht die Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Größe und Ladung. Durch proteineigene negative Ladungen erhöht sich die Laufstrecke des Proteins im Gel. Weil Phosphorylgruppen bei physiologischen pH-Werten negative Ladungen tragen, erlaubt diese Methode eine Auftrennung verschieden stark phosphorylierter Proteine Die Phosphorylierungsansätze werden in 4x Probenpuffer (Quenching Buffer) aufgenommen, wodurch die Phosphorylierungsreaktion abgestoppt wird. Die Durchführung erfolgt ähnlich wie die SDS-PAGE. Unterschiede bestehen im Fehlen einer Detergenz wie SDS außerdem wird die Elektrophorese im gekühlten System bei 4°C durchgeführt. Die Auftrennung erfolgt mit bei 150 mV (konstant) für ein Gel und mit 200 mV bei zwei Gelen für 1,5 h. Nach erfolgter Trennung wird das Gel durch Peptidfärbelösung angefärbt.

7.3.11 Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Blot

Der Western Blot ist eine Methode zum Nachweis von Proteinen mit spezifischen Antikörpern. Die Proteine werden zunächst mit SDS-PAGE aufgetrennt, dann auf eine Membran transferiert, die schließlich mit einem Antikörper, der spezifisch an das gesuchte Protein bindet, inkubiert. Die Proteinbande wird sichtbar gemacht, indem die Membran mit einem sekundären Antikörper inkubiert

wird, dessen Epitop im primären Antikörper liegt. Der sekundäre Antikörper ist kovalent mit einem Enzym (alkalische Phosphatase) konjugiert, das ein geeignetes Substrat (BCIP, NBT) so umsetzt, dass durch eine Farbreaktion die Proteinbande, an die der primäre Antikörper bindet, sichtbar wird.

7.3.11.1 *Semi-dry Blot*

- Die PVDF-Membran wird auf die Größe des Gels zugeschnitten und für 30 s in Methanol aktiviert. Anschließend wird sie kurz gewässert und in Blotpuffer (s. unten) getränkt.
- Auf die Anodenplatte des Blotapparates werden 12 in Blotpuffer getränkte Munktell-Filterpapiere als Pufferreservoir gelegt. Als nächstes wird die Membran und das Gel aufgelegt, und auf die Kathodenseite des Gels wird ein aus 12 in Blotpuffer getränkten Munktell-Filterpapieren bestehendes Pufferreservoir platziert.
- Blot mit 2 mA/ cm² für 15 min blotten (für ein Gel ~90mA.)
- Nach dem Blot wird das Gel in kolloidale Peptidfärbelösung eingelegt, um die Vollständigkeit des Blots abschätzen zu können. Die Membran wird anschließend für mindestens 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in 1% BSA/TBS inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen für den primären Antikörper abzublocken.
- Kurzes Waschen der Membran mit 1x TBS.
- Inkubation mit dem primären Antikörper in einer 1:1000 Verdünnung in 1% BSA/TBS für 1 h bei RT.
- Waschen der Membran mit 0,1% Tween-20/TBS für 5 X 5 min.
- Inkubation mit sekundärem Antikörper/Alkalische Phosphatase in einer 1:3000 Verdünnung in 1% BSA/ TBS für 1 h bei RT.
- Waschen der Membran mit 0,1% Tween-20/TBS für 5X 5 min.
- Für die Entwicklung in ein Schale 10 ml des Entwicklungspuffer mit 66 µl NBT und 33 µl BCIP geben und den Blot hineinlegen, bis Banden sichtbar werden.
- Die Färbereaktion wird unter fließendem Wasser abgestoppt.
- Der Blot ist lichtempfindlich, und wird daher in Alufolie aufbewahrt.

Die Nachweisgrenze der Methode liegt bei etwa 10 ng Protein pro Bande.

7.3.11.2 *Dot-Blot*

Beim Dot-Blot wird auf eine gelelektrophoretische Trennung des Untersuchungsguts verzichtet und die Proteinprobe direkt auf die Membran getüpfelt¹⁷⁴. Durch das Fehlen einer elektrophoretischen Trennung ist das Verfahren allerdings nur dann aussagekräftig, wenn die Probe nur ein Protein enthält. Diese Methode eignet sich besonders für Proteinen, mit sehr hoher Molmasse, die elektrophoretisch nicht aufgetrennt werden können, oder Proben mit besonders hoher Ionenstärke, die eine Gelelektrophorese ausschließen. Außerdem eignet sich die Methode für Proben, bei denen das Vorliegen ihrer nativen Konformation gewährleistet werden muss. Als Membran wird beim Dot-Blot vorwiegend Nitro-Cellulose verwendet, aber auch die hydrophoben Materialien wie PVDF eignen

sich¹⁷⁵. Nach dem Auftragen der Proben sollten die freien Stellen der Membran mit BSA abgeblockt werden. Die aufgetragenen Proben können zur Detektion reversibel mit Ponceau-S angefärbt werden.

Durchführung:

- Membran 30 sec in Methanol aktivieren.
- Membran für 1 min wässern.
- Membran mit Blotpuffer befeuchten und auf ein in Blotpuffer getränkten Stapel (6 Blatt) Munktell-Filterpapier legen.
- Proben auf die Membran tüpfeln und Proben einziehen lassen.
- Zur Detektion Membran mit Ponceau-S einfärben.
- Blot entfärben.
- Blot für 1 h in 1% BSA in 1 x TBS abblocken.

7.3.12 Far Western

Der Far Western wird zum Nachweis von Proteininteraktionen genutzt. Hierzu wird ein Protein, das „Beute“-Protein fixiert, auf einer Membran oder in einer PAGE. Dieses fixierte „Beute“-Protein wird mit einem zweiten Protein, dem „Köder“-Protein inkubiert. Die Interaktion wird über die Visualisierung des Köder-Proteins nachgewiesen. Dazu muss das „Köder“-Protein mit Antikörpern nachweisbar sein oder radioaktiv bzw. Fluoreszenz-gelabelt sein. In dieser Arbeit wurden als „Beute“-Protein die IGFAC und die IRAC verwendet. Die Kinasen wurde über den Dot-Blot(7.3.11.2) fixiert, zusätzlich wurde als Negativkontrolle GST aufgetragen. Als „Köder“-Protein wurden die Fluoreszenz gelabelten Peptide verwendet. Ein kritischer Schritt beim Far Western ist der der Bindung bzw. des Waschens nach der Bindung. Hierbei ist zu beachten, dass die Stärke der Interaktion vom pH-Wert, dem Salzgehalt und der Anwesenheit bestimmter Co-Faktoren abhängt. Um das Schwächen einer eventuellen ionischen Interaktion zu verhindern, wurde auf Salz-haltige Puffer verzichtet.

Durchführung:

- Auftragen der Proben auf eine PVDF Membran über Dot-Blot (7.3.11.2).
- Blocken der Membran für 1 h in 1 % BSA in 1x TBS.
- Inkubation der Membran in der Lösung mit dem „Köder“-Protein unter Lichtabschluss.
- Waschen des Blots für 5x 5 min in 50 mM Tris pH 7,5
- Detektion der Interaktion unter UV-Licht.

Um die Menge an fixierten Proteinen auf der Membran nach den ganzen Waschvorgängen dokumentieren zu können, empfiehlt es sich einen zweiten Blot durchzuführen. Der soll gleich behandelt werden, nur dass an Stelle der „Köder“-Lösung Tris-Puffer (50 mM Tris pH 7,5) verwendet

wird. Nach dem Waschen wird der Blot in Ponceau Rot gefärbt (7.3.13.5).

7.3.13 Färbung von Proteinen in Gelen und auf Membranen

7.3.13.1 *kolloidale Peptidfärbelösung (Coomassie-Färbung)*¹⁷⁶

Das kolloidale Coomassie-Blue G250 detektiert Proteine bis zu einer Konzentration von 10 ng pro Bande und kommt damit der Sensitivität der Silberfärbung sehr nahe. Gele werden über Nacht in kolloidale Peptid-Färbelösung (6.11) eingelegt, wobei die aufgetragenen Proteine durch Coomassie-Blue G250 angefärbt werden. Durch Waschen des gefärbten Gels in Wasser wird unspezifisch in das Gel eingelagerter Farbstoff entfernt, so dass die Proteinbanden sich deutlich vom Hintergrund abheben.

7.3.13.2 *Eosin Y*

Die Färbung mittels Eosin Y ist eine sehr schnelle, reversible Methode, allerdings wird das Gel dabei nicht fixiert¹⁷⁷. Die Sensitivität ist mit der von Coomassie vergleichbar. Nach der SDS-Gelelektrophorese wurde folgendermaßen verfahren:

- Gel für 30 sec in Färbelösung (0,25 % (w/v) Eosin Y in 0,1 N NaOH) inkubieren.
- Gel für 10 sec mit MQ spülen

Eine längere Entfärbung reduziert den Hintergrund. Allerdings sollte nicht länger als 30 min entfärbt werden, da die Färbung reversibel ist.

7.3.13.3 *Fluoreszenzmarkierung mit Fluorescamin*

Die Fluoreszenzmarkierung erfolgt vor der Elektrophorese. Sie sollte vor allem bei Polypeptiden oder kleinen Proteinen, die sich auf Grund ihrer Aminosäurezusammensetzung nicht mit den gängigen Methoden anfärben lassen, verwendet werden. Die Empfindlichkeit hängt von der Anzahl vorhandener Aminogruppen ab. Die Intensität der Färbung korreliert nicht mit der aufgetragenen Proteinmenge. Fluorescamin wird an freie Aminogruppen, α -Aminogruppe des NT und ϵ -Aminogruppe von Lysin, addiert. Dadurch erhöht sich die negative Ladung des Proteins, so dass sich das Laufverhalten in der nativen PAGE gegenüber dem unmarkierten Protein verändern kann¹⁷⁸. Die Markierung erfolgt vor der Elektrophorese mit denaturiertem Protein in 15 mM Na₂HPO₄-Puffer bei pH 8,5.

Das folgende Protokoll entspricht einer Proteinprobe von 45 μ l:

- Zufügen von 3 mg SDS, 5 μ l 60 % Saccharose-Lösung, 2 μ l 1 M DTT-Lösung.
- 5 min bei 95 °C denaturieren, anschließend auf RT abkühlen lassen.
- Zugabe von 5 μ l Fluorescamin (3 mg auf 100 μ l Aceton)
- 30 min bei RT

- 1 min bei geöffnetem Deckel denaturieren
- Zugabe von 1 µl Bromphenolblaulösung.

Anschließend werden die Proben auf der SDS-PAGE aufgetrennt. Analysiert wird die PAGE unter UV.

7.3.13.4 Silberfärbung

Die Silberfärbung ist bedeutend empfindlicher als die Färbung mit Comassie Blau. Die Silberfärbung beruht auf der Komplexbildung des Ag^+ mit mit Aminosäureseitenketten, insbesondere der Sulfhydryl- sowie Carboxylgruppen. Es sind verschiedene Protokolle zur Durchführung bekannt, in dieser Arbeit wurde nach dem Protokoll von Rabilloud¹⁷⁹ modifiziert für kleine Peptide, durchgeführt. Nach der SDS-Gelelektrophorese wurde folgendermaßen verfahren:

- Fixierung des Gels für 5 min in Destain (10 % Methanol (v/v) , 7 % Essigsäure (v/v))
- Spülen: 3 mal 5 sec in MQ
- Waschen: 5 min in MQ
- Spülen: 3 mal 5 sec in MQ
- Vorbehandlung: Inkubation in 50 % Aceton für 5 min
- Vorbehandlung: 1 min Inkubation in 60 ml MQ versetzt mit 100 µl Thiosulfatstock (10 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ (w/v))
- Spülen: 3 mal 5 sec in MQ
- Imprägnieren. Inkubation für 30 min in der Imprägnierungslösung (0,8 ml 20 % Silbernitrat + 0,6 ml 35 % Formaldehyd, mit MQ auf 60 ml aufgefüllt)
- Spülen: 2 mal 5 sec in MQ
- Entwickeln: Kurz (20-30 sec) in Entwicklungslösung (20 ml 6 % Natriumcarbonat-Lösung + 26 µl 35 % Formaldehyd + 25 µl Thiosulfatstock, mit MQ auf 60 ml auffüllen) inkubieren bis die Banden sichtbar werden
- Abstoppen: 2 % Essigsäure in MQ für 10 sec
- Spülen: 1 mal 10 sec in MQ

7.3.13.5 Reversible Färbung von Membranen in Ponceau-S

Die Effizienz eines Blot-Vorgangs kann durch die reversible Anfärbung mit Ponceau-S, das Proteine unspezifisch anfärbt, überprüft werden¹⁸⁰. Diese Färbung hat eine Nachweisgrenze von 5-15 ng Protein pro mm^2 .

Durchführung:

- Membran für 5-10 min in Ponceau-S-Färbelösung (1,5 % (v/v) Essigsäure, 0,25 % (w/v) Ponceau-S) bei RT inkubieren.
- Membran für 1-2 Minuten unter mehrmaligem Wechseln in MQ waschen.

- Membran dokumentieren.

7.3.14 Phosphorylierungsreaktionen

Die Aktivität einer Kinase kann in Phosphorylierungsreaktionen untersucht werden. Hierzu eignet sich sowohl die Autophosphorylierung der Kinase selbst, als auch die Substratphosphorylierung.

Die in dieser Arbeit genutzten Methoden zum Nachweis und zur Analyse der Phosphorylinkorporation in die Kinase selbst bzw. den Transfer auf das Substrat umfassen die Bestimmung des Einbaus des radioaktiven Isotops ^{32}P . Die offizielle SI-Einheit für die radioaktive Zerfallsrate ist das Becquerel (Bq). In der Literatur ist jedoch das Curie (Ci) die gebräuchliche Einheit (es gilt: $1 \text{ Ci} = 3,7 \times 10^{10} \text{ Bq}$).

Eine weitere Methode zum Nachweis der Auto- bzw. Substratphosphorylierung ist die Analyse der phosphorylierten Probe auf der nativen PAGE. Durch die Phosphorylinkorporation entsteht Mobilitätsshift im elektrischen Feld.

7.3.14.1 *Phosphorylierung mit anschließender nativer PAGE*

Die Autophosphorylierung erfolgte standardmäßig durch 1-10 μM monomerer Kinase mit 1-10 mM ATP, 5 mM DTT, 30 mM Mg^{2+} in TRIS/ HCl, pH 7.5 für die angegebenen Zeiten bei Raumtemperatur. Die Substratphosphorylierung erfolgte durch 1-5 μM monomerer bzw. 0,5-2 μM dimerer Kinase und 50-200 μM Tyrtide 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 μl des Reaktionsansatzes entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 4x Probenpuffer mit EDTA gestoppt. Nach dem Abstoppen der Reaktion werden die Proben auf Eis gelagert. Die Proben werden mittels nativer PAGE (7.3.10.5) aufgetrennt. Anschließend wird das Gel in Proteinfärbelösung angefärbt.

7.3.14.2 *Radioaktive Auto- und Substratphosphorylierungen*

Bei der Auto- und Substratphosphorylierung der in dieser Arbeit beschriebenen Kinasen wurde $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ mit einer spezifischen Aktivität von 100-200 cpm/pmol als Kosubstrat der Reaktion eingesetzt, so dass sich in einem Zeitwert 1-2 μCi Radioaktivität befinden. Autophosphorylierungen erfolgten standardmäßig durch 1-5 μM monomerer Kinase bzw. 0,5-1 μM dimerer Kinase mit 1 mM ATP, 5 mM DTT, 30 mM Mg^{2+} in TRIS/ HCl, pH 7.5 für die angegebenen Zeiten bei Raumtemperatur. Die Substratphosphorylierung erfolgte durch 1-5 μM monomerer bzw. 0,5-2 μM dimerer Kinase und 50-200 μM Tyrtide mit 0,5 mM ATP, 5 mM DTT, 30 mM Mg^{2+} in TRIS/HCl, pH 7.5 für die angegebenen Zeiten bei Raumtemperatur. Der Start der Reaktion wird entweder durch Zugabe von Kinase oder ATP 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. Zur Bestimmung der inkorporierten Radioaktivität nach Substratphosphorylierungsreaktionen wurde die Radioaktivität des inkorporierten radioaktiven Phosphats durch Messung der Cherenkov-Strahlung im Tritium-(3H) Fenster des Szintillationszählers ermittelt und ins Verhältnis zur eingesetzten Stoffmenge an Protein gesetzt.

7.3.14.3 Paperassay (Dot-Blot auf Phosphozellulose-Papier)¹⁸¹

Zu den gegebenen Zeiten werden 10 µl Probe entnommen und mit 5 µl EDTA (Endkonzentration 150 mM) abgestoppt. Davon wurden anschließend 6 µl auf Whatman P81-Papier aufgetragen. Das Papier wurde anschließend fünfmal für 15 min mit eiskalter 0,85 % (w/v) Phosphorsäure gewaschen und abschließend für 5 min mit Aceton gewaschen. Hierbei werden große Proteine wie die Kinase, als überschüssiges ATP vom Papier gewaschen. Kleine Proteine, wie Tyrtide, bleiben haften. So lässt sich allein der Einbau an radioaktiven Phosphat in das Substrat bestimmen. Nach dem Trocknen wurden die Probenfelder ausgeschnitten und die Radioaktivität durch Messung der Cerenkov-Strahlung bestimmt. Zur Kontrolle wurden Proben eines Phosphorylierungsansatz ohne Substrat bzw. eines Ansatzes ohne Kinase mit aufgetragen. Die für diese Kontroll-Probefelder ermittelte Strahlung wird bei der Auswertung als Hintergrundstrahlung von den Proben abgezogen.

7.3.14.4 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 in Peptidfärbelösung gefärbt und der Hintergrund durch wässern entfärbt. Anschließend wurde das Gel 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. Die Methode der Autoradiographie beruht auf durch β -Strahlung hervorgerufene Bildung von Silberkeimen in einer fotografischen Emulsion. Durch Entwicklungsprozesse werden die Silberkeime in schwarze Silberkörner umgewandelt, die sich als Schwärzung auf einem entwickelten Fotofilm äußert. Radioaktiv-markierte Proteine, z.B. in einem SDS-Gel können so auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden. Dies erfolgt durch Exposition auf Kodak BIOMAXTM MS-Filmen in einer Röntgenkassette mit Verstärkerfolie. In Abhängigkeit der Strahlungsintensität der Proben und dem Empfindlichkeitsgrad des Filmes, werden die Proben für 20 min bis zu 24 h bei -80 °C exponiert. Die bestrahlten Filme werden in GBX-Developer bis zu 5 min entwickelt, kurz gewässert und für 1 min in GBX-Fixer fixiert (bis Filmfolie klar wird). Nach kurzer Wässerung kann

die Autoradiographie bei Raumtemperatur getrocknet werden.

7.3.14.5 Bestimmung des Korrekturfaktor für den Phosphateinbau

Bei der Verwendung des radioaktiv markierten $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP der Firma Hartmann konnte wurde ein hoher Unterschied beim Phosphateinbau im Vergleich zur nativen Page festgestellt. In der nativen PAGE wurde ein deutlich höherer Phosphateinbau beobachtet als bei radioaktiven Versuchen, was damit zu erklären sein könnte, dass ein Großteil des $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP hydrolysiert wurde, und daher ein Großteil der Strahlung vom radioaktiv markiertem, anorganischem Phosphat stammt. Aus diesem Grund wurde ein Verfahren entwickelt, mit dessen Hilfe es möglich ist den tatsächlichen Einbau von $\gamma^{32}\text{P}$ zu ermitteln. Dazu wird die Differenz des Einbaus mittels radioaktiver Phosphorylierung und des Einbaus ermittelt über die native PAGE bestimmt. Unter gleichen Bedingungen (5 μM Kinase, 1 mM ATP, 30 mM MgCl_2) wurde dazu die monomere IGF ΔC zeitabhängig phosphoryliert, einmal über nativer PAGE ausgewertet und einmal mittels $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP über SDS-PAGE und Autoradiographie. Der Vergleich lieferte einen drei fach höheren Phosphateinbau mittels nativer PAGE. Dieser Faktor drei stimmt mit alten Versuchen, die noch mit ATP der Firma Perkin Elmer durchgeführt wurden, überein. Daher der Einbau aller Versuche, die mit dem ATP von Hartmann durchgeführt wurden mit dem Faktor drei korrigiert. Neuere Versuche, die wieder mit Perkin Elmer durchgeführt wurden bestätigen ebenfalls den Faktor 3.

7.3.14.6 Phospho-Imager-Auswertung

Radioaktive Signale auf Membranen und in Gelen können mit einem Molecular-Imager®-System (BioRad) quantifiziert und ausgewertet werden. Dazu wird eine Molecular-Imager®-Detektorplatte (BioRad) je nach Stärke des Signals einige Minuten bis Stunden der Strahlungsquelle exponiert. Die radioaktive Strahlung bewirkt, dass die Molecular-Imager®-Detektorplatte Photoluminiszenzstrahlung abgibt, deren Stärke direkt proportional zu der Radioaktivität der Probe ist.

7.3.15 Bestimmung der Kinetischen Konstanten

In dieser Arbeit wurden die kinetischen Daten k_{cat} und K_{M} für das Co-Substrat ATP über zwei Verfahren bestimmt. Zum einen wurde der gekoppelte Assay durchgeführt (7.3.16.5). Dabei wird die Initialgeschwindigkeit des Phosphattransfers auf Substrate, in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration photometrisch gemessen.

Zum anderen wurde die Substratphosphorylierung unter Verwendung von radioaktiv markiertem $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP zur Ermittlung der kinetischen Daten genutzt (7.3.14.2). Dabei wird für unterschiedliche ATP-Konzentrationen die Initialgeschwindigkeit der Substratphosphorylierung bestimmt. Ausgewertet

wurde die Phosphorylierung über den Paperassay (7.3.14.3). Hier kann der Phosphattransfer auf das Substrat über die Cerenkov-Strahlung des inkorporierten radioaktiven Phosphats gemessen werden.

Bei beiden Methoden wurde Tyrtide als Substrat verwendet, und dieses im hohen Überschuss zur Kinase eingesetzt. In der initialen Bereich wird die Autophosphorylierung unterdrückt in der Anwesenheit hoher Substratkonzentraion, die Substratphosphorylierung steigt konstant¹²⁸. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter der unphosphorylierten Kinase wurde daher die Initialgeschwindigkeit im lineare Anfangsbereich der Umsatzkonzentration bestimmt. Wird die Steigung des linearen Bereichs gegen die entsprechende ATP-Konzentrationen aufgetragen, so erhält man ein Michaelis-Menten-Diagramm. Anhand dieser Auftragung lassen sich die kinetischen Parameter bestimmen: K_M für ATP und k_{cat} werden durch Computerfit (Programm: SigmaPlot) an eine hyperbolische Funktion erhalten.

Die Messungen wurden für jede Kinase zwei bis dreimal durchgeführt. Aus den kinetischen Parametern der einzelnen Messungen wurde dann der arithmetische Mittelwert (\bar{v}) mit der Standardabweichung (s) gebildet:

$$\bar{v} = \frac{1}{N} \cdot \sum_{j=1}^N v_j$$
$$s = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{j=1}^N (v_j - \bar{v})^2}$$

7.3.16 Spektroskopische Methoden

7.3.16.1 *Biologische Chromophore*

Proteine enthalten intrinsische Chromophore (s. Tab. 7.4) Peptidbindungen absorbieren für ($n \rightarrow \pi^*$) und ($\pi \rightarrow \pi^*$)-Übergänge Licht mit einer Wellenlänge um die 200 nm. Manche Aminosäuren-Seitenketten absorbieren oberhalb von 230 nm. Dazu gehören Phe, Tyr und Trp, da sie aromatische Gruppen enthalten. Phe hat ein Absorptionsmaximum von etwa 257 nm, Tyr von 274 nm, und Trp absorbiert bei der größten Wellenlänge, bei etwa 280 nm. Absorptionsbanden von Nukleinsäuren kommen durch die gleichen Elektronenübergänge wie bei Peptiden zustande. Sie liegen im Bereich von 200-300 nm, und auch hier ist die Absorption von der Umgebung des Chromophors abhängig, insbesondere von der elektronischen Wechselwirkung zwischen den Basen, die letztendlich zu der Sekundärstruktur führt.

Tabelle 7.4: Absorptionswellenlängen biologischer Chromophore

Chromophor	λ_{\max} [nm]	ϵ bei λ_{\max} [$M^{-1}cm^{-1}$]
Peptid ($n \rightarrow \pi^*$)	~ 220	~ 100
Peptid ($\pi \rightarrow \pi^*$)	~ 190	~ 7000
Phe	257	200
	206	9300
	188	60000
Tyr	274	1400
	222	8000
	193	48000
Trp	280	5600
	219	47000

7.3.16.2 Lambert-Beer'sches Gesetz

Das Lambert-Beer'sche Gesetz beschreibt die exponentielle Intensitätsabnahme eines durch die Probe einfallenden Lichtstrahls.

$$I = I_0 \cdot e^{-ad}$$

a : materialspezifischer Absorptionskoeffizient

d : Probendicke.

Für Lösungen gilt:

$$a = 2,303 \cdot \epsilon \cdot d$$

ϵ : molarer dekadischer Extinktionskoeffizient (wellenlängenabhängig) [$L/mol \cdot cm$]

c : Konzentration des Chromophors [mol/L].

Durch Einsetzen kommt man zu folgender Variante des Lambert-Beer'schen Gesetzes:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon cd}$$

Meist wird das Absorptionsspektrum als Optische Dichte in Abhängigkeit von λ beschrieben:

$$OD = \log I_0 / I = \epsilon \cdot c \cdot d$$

7.3.16.3 Absorptionsphotometer

Der Wellenlängenbereich von üblichen Absorptionsphotometern erstreckt sich von 200 nm bis 1100 nm. Sie sind wie folgt aufgebaut: Weißes Licht mit der Intensität I_0 trifft nach Durchgang durch einen Monochromator auf die Probe mit der Dicke d , welche einen Teil des Lichtes streut und den anderen bei bestimmten Frequenzen absorbiert. Das durchgelassene Licht mit der Intensität I wird von einem Photodetektor als Funktion der Wellenlänge λ aufgezeichnet. Bei moderneren Geräten findet man einen Zweistrahlengang mit zusätzlichem Referenzstrahl. Diese haben gegenüber den älteren

Modellen den Vorteil, dass sich Instabilitäten der Lampe und damit Variationen in I_0 vermeiden lassen.

7.3.16.4 Michaelis-Menten-Kinetik

Es gibt verschiedene Modelle, die die kinetischen Eigenschaften von Enzymen beschreiben. Das vereinfachte, aber für die meisten Enzyme ausreichende und damit auch gängigste Modell wurde am Anfang des 20. Jahrhundert von Leonor Michaelis und Maud Menten aufgestellt. Bei diesem Modell verbindet sich das E mit einem S, so dass ein ES-Komplex gebildet wird, der dann zu P und E zerfallen oder in E und S dissoziieren kann:



Die Geschwindigkeit V der Produktbildung ergibt sich aus der Michaelis-Menten Gleichung:

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{[S] + K_M}$$

K_M ist dabei die Michaelis-Menten-Konstante und setzt sich wie folgt zusammen:

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

Des Weiteren gilt:

$$V_{max} = k_3 \cdot [E]_0$$

K_M gibt die Substratkonzentration an bei der die Katalysegeschwindigkeit die Hälfte des Maximalwertes erreicht, da nur die Hälfte aller aktiven Zentren des Enzyms besetzt sind. K_M und V_{max} lassen sich aus dem Diagramm Initialgeschwindigkeit gegen Substratkonzentration extrahieren (Abb. 7.3.1). K_M steht im Zusammenhang mit den Bindungskonstanten. Im Grenzfall $k_2 \gg k_3$, d.h. wenn die Dissoziation des ES-Komplexes viel schneller ist als die Produktbildung, gilt:

$$K_M = \frac{k_2}{k_1} = K_D$$

Unter diesen Bedingungen ist K_M ein Maß für die Affinität des Enzyms für das Substrat. Wenn die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} bekannt ist, kann k_3 , die auch katalytische Konstante k_{cat} genannt wird, berechnet werden. k_{cat} wird auch als Wechselzahl oder turnover-number bezeichnet. Sie gibt an, wie viele Substratmoleküle bei vollständiger Sättigung des Enzyms mit Substrat pro

Zeiteinheit in das Produkt umgewandelt werden; es gibt somit die Effizienz der Katalyse an. Die Reaktionsgeschwindigkeit hängt somit vom Verhältnis k_{cat}/K_M oder auch den Geschwindigkeitskonstanten ab.

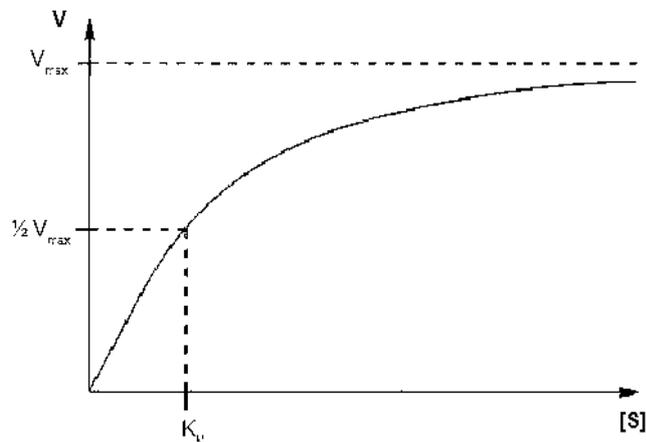
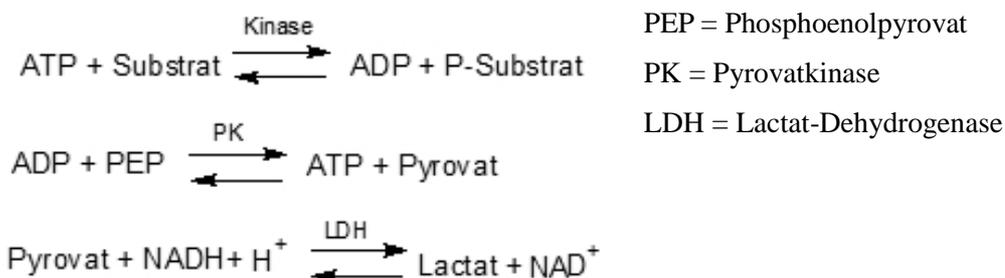


Abbildung 7.3.1: Michaelis-Menten Kurve.

Aufgetragen ist die Initialgeschwindigkeit V die Substratkonzentration $[S]$. Eingezeichnet sind K_M , $\frac{1}{2} V_{max}$ und V_{max} .

7.3.16.5 Gekoppelter Enzymassay

Eine gängige Methode, um einfache Enzymkinetiken zu messen bzw. kinetische Parameter zu bestimmen, ist die zeitliche Verfolgung der Absorption eines Reaktanden. In diesem Fall wird die katalytische Aktivität der monomeren und dimeren Kinasen des IGF-1 R, d.h. die Geschwindigkeit des Phosphattransfers auf Substrate, in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration untersucht und K_M - und k_{cat} -Werte berechnet. Die Phosphotransferasereaktion jedoch bietet selbst kein optisches Signal. Bei dem gekoppelten Enzymassay wird die Phosphotransferasereaktion an eine Reaktion gekoppelt, die ein solches Signal liefert, die Oxidation von $NADH^{182}$. So kann die Substratphosphorylierung zeitlich verfolgt und quantifiziert werden. Der gekoppelte Enzymassay basiert auf folgendem Schema:



Die Phosphorylierung des Substrats ist somit direkt proportional zur Abnahme an NADH. Diese Abnahme wird mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 340 nm über einen entsprechenden Zeitraum verfolgt. Die Reaktionsbedingungen sind dabei so gewählt, dass die Phosphotransferasereaktion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist.

7.3.16.6 Kinetische Messungen

Alle Absorptionsmessungen wurden am Cary 100 – Bio – UV – Visible Spectrophotometer bei einer Anregung von $\lambda = 340$ nm und einer Temperatur von $T = 20$ °C im „Kinetics/Time“- Programm mit Hilfe des gekoppelten Enzymassays durchgeführt. Für die Michaelis-Menten- Kurven und die Bestimmung des k_{cat} wurden verschiedene Konzentrationen an ATP verwendet. Aus den Anfangssteigungen der Umsatzkurven bei verschiedenen ATP-Konzentrationen wurden die Initialgeschwindigkeiten V_i bestimmt. Diese wurden gegen die jeweiligen ATP-Konzentrationen aufgetragen. Die Michaelis-Menten-Parameter K_M für ATP und k_{cat} wurden durch Computerfit (Programm: SigmaPlot) an eine hyperbolische Funktion erhalten.

Tabelle 7.5: Reaktionsbedingungen für den gekoppelten Assay

Substanz	Konzentration im Ansatz
Tyrtide	200 μ M
MgCl ₂	30 mM
DTT	10 mM
LDH	80 U
PK	60 U
NADH	240 μ M
PEP	240 μ M

7.3.16.7 Proteinkonzentrationsbestimmung durch Absorptionsspektroskopie

Nah UV Bereich

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:

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

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 werden¹⁸³. Zusammen mit der relativen Molmasse (MW) kann daraus wiederum der spezifische Extinktionskoeffizient ($^{0,1}A_{280}$) berechnet werden:

$$\epsilon_{280} = \sum Trp \cdot 550 + \sum Tyr \cdot 1490 + \sum Cys \cdot 125$$

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

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.

Fern UV Bereich

Die Peptidbindung absorbiert sehr stark im Fern UV mit einem Maximum bei etwa 190 nm. Bei 190 nm treten häufig Fehler auf, da bei dieser Wellenlänge auch Sauerstoff absorbiert. Gute Ergebnisse konnten allerdings bei Messungen von 215 nm und 225 nm erzielt werden¹⁸⁴. Hierdurch lassen sich noch 5 $\mu g/ml$ Protein bestimmen. Gemessen wird in isotonischer NaCl Lösung (0,9 % w/v). Das Protein muss so weit runter verdünnt werden, dass die Extinktion bei 215 nm unter 1,5 liegt. Als Blindwert wird die isotonische NaCl Lösung verwendet. Die Proteinkonzentration ergibt sich aus folgender Rechnung:

$$c (\mu g/ml) = 144 (A_{215} - A_{225})$$

8 Literaturverzeichnis

1. Rubin, G.M. u. a. Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* **287**, 2204-15(2000).
2. Johnson, L.N. & Lewis, R.J. Structural basis for control by phosphorylation. *Chem Rev* **101**, 2209-42(2001).
3. Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**, 211-25(2000).
4. Manning, G. u. a. The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**, 1912-34(2002).
5. Mohammadi, M., Schlessinger, J. & Hubbard, S. Structure of the FGF receptor tyrosine kinase domain reveals a novel autoinhibitory mechanism. *Cell* **86**, 577-87(1996).
6. Kornev, A.P. u. a. Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17783-8(2006).
7. Huse, M. & Kuriyan, J. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* **109**, 275-82(2002).
8. Cheng, K. & Koland, J.G. Nucleotide-binding properties of kinase-deficient epidermal-growth-factor-receptor mutants. *Biochem J* **330** (Pt 1), 353-9(1998).
9. Li, W. & Miller, W. Role of the activation loop tyrosines in regulation of the insulin-like growth factor I receptor-tyrosine kinase. *J Biol Chem* **281**, 23785-91(2006).
10. Gotoh, N. u. a. A highly conserved tyrosine residue at codon 845 within the kinase domain is not required for the transforming activity of human epidermal growth factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **186**, 768-74(1992).
11. Stamos, J., Sliwkowski, M.X. & Eigenbrot, C. Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *J Biol Chem* **277**, 46265-72(2002).
12. Canagarajah, B.J. u. a. Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* **90**, 859-69(1997).
13. Hubbard, S. Src autoinhibition: let us count the ways. *Nat Struct Biol* **6**, 711-4(1999).
14. Wei, L. u. a. Expression, characterization, and crystallization of the catalytic core of the human insulin receptor protein-tyrosine kinase domain. *J Biol Chem* **270**, 8122-30(1995).
15. Al-Hasani, H. u. a. Identification of Ser-1275 and Ser-1309 as autophosphorylation sites of the insulin receptor. *FEBS Lett* **400**, 65-70(1997).
16. Kohanski, R.A. Insulin receptor autophosphorylation. II. Determination of autophosphorylation sites by chemical sequence analysis and identification of the juxtamembrane sites. *Biochemistry* **32**, 5773-80(1993).
17. Hubbard, S.R., Mohammadi, M. & Schlessinger, J. Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem* **273**, 11987-90(1998).
18. Munshi, S. u. a. Crystal structure of the Apo, unactivated insulin-like growth factor-1 receptor kinase. Implication for inhibitor specificity. *J Biol Chem* **277**, 38797-802(2002).
19. Hubbard, S. u. a. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature* **372**, 746-54(1994).

20. Pautsch, A. u. a. Crystal structure of bisphosphorylated IGF-1 receptor kinase: insight into domain movements upon kinase activation. *Structure* **9**, 955-65(2001).
21. Hubbard, S. Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. *Embo J* **16**, 5572-81(1997).
22. Favellyukis, S. u. a. Structure and autoregulation of the insulin-like growth factor 1 receptor kinase. *Nat Struct Biol* **8**, 1058-63(2001).
23. Ellis, L. u. a. Replacement of insulin receptor tyrosine residues 1162 and 1163 compromises insulin-stimulated kinase activity and uptake of 2-deoxyglucose. *Cell* **45**, 721-32(1986).
24. Ablooglu, A.J. u. a. Multiple activation loop conformations and their regulatory properties in the insulin receptor's kinase domain. *J Biol Chem* **276**, 46933-40(2001).
25. Morgan, D.O. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 261-91(1997).
26. Pavletich, N. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* **287**, 821-8(1999).
27. Russo, A.A., Jeffrey, P.D. & Pavletich, N.P. Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat Struct Biol* **3**, 696-700(1996).
28. Polyak, K. u. a. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimutagenic signals. *Cell* **78**, 59-66(1994).
29. Polyak, K. u. a. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* **8**, 9-22(1994).
30. Russo, A. u. a. Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16INK4a. *Nature* **395**, 237-43(1998).
31. Superti-Furga, G. & Courtneidge, S.A. Structure-function relationships in Src family and related protein tyrosine kinases. *Bioessays* **17**, 321-30(1995).
32. Brown, M.T. & Cooper, J.A. Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta* **1287**, 121-49(1996).
33. Xu, W., Harrison, S.C. & Eck, M.J. Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* **385**, 595-602(1997).
34. Rajagopalan, M., Neidigh, J.L. & McClain, D.A. Amino acid sequences Gly-Pro-Leu-Tyr and Asn-Pro-Glu-Tyr in the submembranous domain of the insulin receptor are required for normal endocytosis. *J Biol Chem* **266**, 23068-73(1991).
35. Gustafson, T. u. a. Phosphotyrosine-dependent interaction of SHC and insulin receptor substrate 1 with the NPEY motif of the insulin receptor via a novel non-SH2 domain. *Mol Cell Biol* **15**, 2500-8(1995).
36. Hubbard, S. Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 464-71(2004).
37. Li, S. u. a. Structural and biochemical evidence for an autoinhibitory role for tyrosine 984 in the juxtamembrane region of the insulin receptor. *J Biol Chem* **278**, 26007-14(2003).
38. Craddock, B.P., Cotter, C. & Miller, W.T. Autoinhibition of the insulin-like growth factor I receptor by the juxtamembrane region. *FEBS Lett* **581**, 3235-40(2007).
39. Yip, C. & Ottensmeyer, P. Three-dimensional structural interactions of insulin and its receptor. *J Biol Chem* **278**, 27329-32(2003).

40. Ottensmeyer, F. u. a. Mechanism of transmembrane signaling: insulin binding and the insulin receptor. *Biochemistry* **39**, 12103-12(2000).
41. Baer, K. u. a. Dimerization-induced activation of soluble insulin/IGF-1 receptor kinases: an alternative mechanism of activation. *Biochemistry* **40**, 14268-78(2001).
42. Munshi, S. u. a. Structure of apo, unactivated insulin-like growth factor-1 receptor kinase at 1.5 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**, 1725-30(2003).
43. Schreiber, A.B. u. a. Biological role of epidermal growth factor-receptor clustering. Investigation with monoclonal anti-receptor antibodies. *J Biol Chem* **258**, 846-53(1983).
44. Ushiro, H. & Cohen, S. Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. *J Biol Chem* **255**, 8363-5(1980).
45. Yarden, Y. & Sliwkowski, M.X. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 127-37(2001).
46. Burke, C.L. & Stern, D.F. Activation of Neu (ErbB-2) mediated by disulfide bond-induced dimerization reveals a receptor tyrosine kinase dimer interface. *Mol Cell Biol* **18**, 5371-9(1998).
47. Moriki, T., Maruyama, H. & Maruyama, I. Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain. *J Mol Biol* **311**, 1011-26(2001).
48. Zhang, X. u. a. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* **125**, 1137-49(2006).
49. Burgess, A.W. u. a. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* **12**, 541-52(2003).
50. Rajeswaran, P. GST-Dimerisierung als Modul der Tyrosinkinaseaktivierung: Vergleich von monomerer und dimerer EGFRzeptorkinase. *Diplomarbeit Universität zu Köln* (2006).
51. Moller, D.E. u. a. Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNAs in man. *Mol Endocrinol* **3**, 1263-9(1989).
52. Soos, M. u. a. Receptors for insulin and insulin-like growth factor-I can form hybrid dimers. Characterisation of hybrid receptors in transfected cells. *Biochem J* **270**, 383-90(1990).
53. Ullrich, A. u. a. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *Embo J* **5**, 2503-12(1986).
54. Andersen, A.S., Wiberg, F.C. & Kjeldsen, T. Localization of specific amino acids contributing to insulin specificity of the insulin receptor. *Ann N Y Acad Sci* **766**, 466-8(1995).
55. Yip, C.C. u. a. Localization of the insulin-binding site to the cysteine-rich region of the insulin receptor alpha-subunit. *Biochem Biophys Res Commun* **157**, 321-9(1988).
56. Whittaker, J. u. a. Alanine scanning mutagenesis of a type 1 insulin-like growth factor receptor ligand binding site. *J Biol Chem* **276**, 43980-6(2001).
57. Siddle, K. The insulin receptor and type I IGF receptor: comparison of structure and function. *Prog Growth Factor Res* **4**, 301-20(1992).
58. Huang, S. & Terstappen, L.W. Formation of haematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. *Nature* **360**, 745-9
59. Baserga, R. The contradictions of the insulin-like growth factor 1 receptor. *Oncogene* **19**, 5574-81(2000).
60. Valentinis, B. & Baserga, R. IGF-I receptor signalling in transformation and differentiation. *Mol*

- Pathol* **54**, 133-7(2001).
61. Porcu, P. u. a. The growth-stimulatory effect of simian virus 40 T antigen requires the interaction of insulinlike growth factor 1 with its receptor. *Mol Cell Biol* **12**, 5069-77(1992).
 62. Reiss, K. u. a. The insulin-like growth factor 1 receptor is required for the proliferation of hemopoietic cells. *Oncogene* **7**, 2243-8(1992).
 63. Pietrzkowski, Z. u. a. Inhibition of cellular proliferation by peptide analogues of insulin-like growth factor 1. *Cancer Res* **52**, 6447-51(1992).
 64. Pietrzkowski, Z. u. a. Inhibition of growth of prostatic cancer cell lines by peptide analogues of insulin-like growth factor 1. *Cancer Res* **53**, 1102-6(1993).
 65. Baserga, R. & Morrione, A. Differentiation and malignant transformation: two roads diverged in a wood. *J Cell Biochem Suppl* **32-33**, 68-75(1999).
 66. Baserga, R. u. a. The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1332**, F105-26(1997).
 67. Valentinis, B. u. a. Growth and differentiation signals by the insulin-like growth factor 1 receptor in hemopoietic cells are mediated through different pathways. *J Biol Chem* **274**, 12423-30(1999).
 68. Morrione, A. u. a. Insulin-like growth factor I receptor signaling in differentiation of neuronal H19-7 cells. *Cancer Res* **60**, 2263-72(2000).
 69. Burfeind, P. u. a. Antisense RNA to the type I insulin-like growth factor receptor suppresses tumor growth and prevents invasion by rat prostate cancer cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7263-8(1996).
 70. Lee, C.T. u. a. Antitumor effects of an adenovirus expressing antisense insulin-like growth factor I receptor on human lung cancer cell lines. *Cancer Res* **56**, 3038-41(1996).
 71. Liu, X. u. a. Inhibition of insulin-like growth factor I receptor expression in neuroblastoma cells induces the regression of established tumors in mice. *Cancer Res* **58**, 5432-8(1998).
 72. Resnicoff, M. u. a. The insulin-like growth factor I receptor protects tumor cells from apoptosis in vivo. *Cancer Res* **55**, 2463-9(1995).
 73. Resnicoff, M. u. a. Correlation between apoptosis, tumorigenesis, and levels of insulin-like growth factor I receptors. *Cancer Res* **55**, 3739-41(1995).
 74. Shapiro, D.N. u. a. Antisense-mediated reduction in insulin-like growth factor-I receptor expression suppresses the malignant phenotype of a human alveolar rhabdomyosarcoma. *J Clin Invest* **94**, 1235-42(1994).
 75. D'Ambrosio, C. u. a. A soluble insulin-like growth factor I receptor that induces apoptosis of tumor cells in vivo and inhibits tumorigenesis. *Cancer Res* **56**, 4013-20(1996).
 76. Prager, D. u. a. Dominant negative inhibition of tumorigenesis in vivo by human insulin-like growth factor I receptor mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2181-5(1994).
 77. Reiss, K. u. a. Inhibition of tumor growth by a dominant negative mutant of the insulin-like growth factor I receptor with a bystander effect. *Clin Cancer Res* **4**, 2647-55(1998).
 78. Peruzzi, F. u. a. Multiple signaling pathways of the insulin-like growth factor 1 receptor in protection from apoptosis. *Mol Cell Biol* **19**, 7203-15(1999).
 79. Rocha, R.L. u. a. Insulin-like growth factor binding protein-3 and insulin receptor substrate-1 in breast cancer: correlation with clinical parameters and disease-free survival. *Clin Cancer Res* **3**,

- 103-9(1997).
80. Turner, B.C. u. a. Insulin-like growth factor-I receptor overexpression mediates cellular radioresistance and local breast cancer recurrence after lumpectomy and radiation. *Cancer Res* **57**, 3079-83(1997).
81. Hellawell, G.O. u. a. Expression of the type 1 insulin-like growth factor receptor is up-regulated in primary prostate cancer and commonly persists in metastatic disease. *Cancer Res* **62**, 2942-50(2002).
82. Samani, A. u. a. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocr Rev* **28**, 20-47(2007).
83. Blakesley, V. u. a. Role of the IGF-I receptor in mutagenesis and tumor promotion. *J Endocrinol* **152**, 339-44(1997).
84. Sell, C. u. a. Simian virus 40 large tumor antigen is unable to transform mouse embryonic fibroblasts lacking type 1 insulin-like growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11217-21(1993).
85. Long, L. u. a. Loss of the metastatic phenotype in murine carcinoma cells expressing an antisense RNA to the insulin-like growth factor receptor. *Cancer Res* **55**, 1006-9(1995).
86. Baserga, R. The IGF-I receptor in cancer research. *Exp Cell Res* **253**, 1-6(1999).
87. Blume-Jensen, P. & Hunter, T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411**, 355-65(2001).
88. Bain, J. u. a. The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem J* **371**, 199-204(2003).
89. Godl, K. u. a. An efficient proteomics method to identify the cellular targets of protein kinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15434-9(2003).
90. Gschwind, A., Fischer, O.M. & Ullrich, A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **4**, 361-70(2004).
91. Cohen, P. Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov* **1**, 309-15(2002).
92. Dancey, J. & Sausville, E.A. Issues and progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov* **2**, 296-313(2003).
93. Arora, A. & Scholar, E.M. Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Pharmacol Exp Ther* **315**, 971-9(2005).
94. Chan, S.K., Gullick, W.J. & Hill, M.E. Mutations of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer -- search and destroy. *Eur J Cancer* **42**, 17-23(2006).
95. Daub, H., Specht, K. & Ullrich, A. Strategies to overcome resistance to targeted protein kinase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 1001-10(2004).
96. Morgillo, F. u. a. Heterodimerization of insulin-like growth factor receptor/epidermal growth factor receptor and induction of survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib. *Cancer Res* **66**, 10100-11(2006).
97. Balañá, M.E. u. a. Activation of ErbB-2 via a hierarchical interaction between ErbB-2 and type I insulin-like growth factor receptor in mammary tumor cells. *Oncogene* **20**, 34-47(2001).
98. Gilmore, A.P. u. a. Activation of BAD by therapeutic inhibition of epidermal growth factor receptor and transactivation by insulin-like growth factor receptor. *J Biol Chem* **277**, 27643-50(2002).

99. Ahmad, T. u. a. The mitogenic action of insulin-like growth factor I in normal human mammary epithelial cells requires the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* **279**, 1713-9(2004).
100. Traxler, P. Tyrosine kinases as targets in cancer therapy - successes and failures. *Expert Opin Ther Targets* **7**, 215-34(2003).
101. Fabbro, D. u. a. Protein kinases as targets for anticancer agents: from inhibitors to useful drugs. *Pharmacol Ther* **93**, 79-98
102. Engh, R.A. & Bossemeyer, D. Structural aspects of protein kinase control-role of conformational flexibility. *Pharmacol Ther* **93**, 99-111
103. Sebolt-Leopold, J. & English, J. Mechanisms of drug inhibition of signalling molecules. *Nature* **441**, 457-62(2006).
104. Blum, G., Gazit, A. & Levitzki, A. Substrate Competitive Inhibitors of IGF-1 Receptor Kinase. *Biochemistry* **39**, 15705-15712(2000).
105. Lou, Q. u. a. Potent pseudosubstrate-based peptide inhibitors for p60(c-src) protein tyrosine kinase. *Cancer Res* **57**, 1877-81(1997).
106. Yakymovych, I. u. a. Inhibition of transforming growth factor-beta signaling by low molecular weight compounds interfering with ATP- or substrate-binding sites of the TGF beta type I receptor kinase. *Biochemistry* **41**, 11000-7(2002).
107. Frame, S., Cohen, P. & Biondi, R.M. A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. *Mol Cell* **7**, 1321-7(2001).
108. Parang, K. & Cole, P.A. Designing bisubstrate analog inhibitors for protein kinases. *Pharmacol Ther* **93**, 145-57
109. Yeon, C.H. & Pegram, M.D. Anti-erbB-2 antibody trastuzumab in the treatment of HER2-amplified breast cancer. *Invest New Drugs* **23**, 391-409(2005).
110. Goldberg, R.M. Cetuximab. *Nat Rev Drug Discov Suppl*, S10-1(2005).
111. Ohren, J.F. u. a. Structures of human MAP kinase kinase 1 (MEK1) and MEK2 describe novel noncompetitive kinase inhibition. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 1192-7(2004).
112. Ludwig, T. u. a. Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued from perinatal lethality in Igf2 and Igf1r null backgrounds. *Dev Biol* **177**, 517-35(1996).
113. Blum, G., Gazit, A. & Levitzki, A. Development of new insulin-like growth factor-1 receptor kinase inhibitors using catechol mimics. *J Biol Chem* **278**, 40442-54(2003).
114. Hubbard, R.D. & Wilsbacher, J.L. Advances towards the development of ATP-competitive small-molecule inhibitors of the insulin-like growth factor receptor (IGF-IR). *ChemMedChem* **2**, 41-6(2007).
115. Hoess, R. Protein design and phage display. *Chem Rev* **101**, 3205-18(2001).
116. Barbas, C.F. u. a. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7978-82(1991).
117. Breitling, F. u. a. A surface expression vector for antibody screening. *Gene* **104**, 147-53(1991).
118. Clackson, T. u. a. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* **352**, 624-8(1991).
119. Nizak, C. u. a. Recombinant antibodies against subcellular fractions used to track endogenous Golgi protein dynamics in vivo. *Traffic* **4**, 739-53(2003).

120. Hust, M. & Dübel, S. Mating antibody phage display with proteomics. *Trends Biotechnol* **22**, 8-14(2004).
121. Bratkovic, T. u. a. Affinity selection to papain yields potent peptide inhibitors of cathepsins L, B, H, and K. *Biochem Biophys Res Commun* **332**, 897-903(2005).
122. Lunder, M. u. a. Comparison of bacterial and phage display peptide libraries in search of target-binding motif. *Appl Biochem Biotechnol* **127**, 125-31(2005).
123. Lunder, M. u. a. Peptide inhibitor of pancreatic lipase selected by phage display using different elution strategies. *J Lipid Res* **46**, 1512-6(2005).
124. Jiang, G. & Hunter, T. Receptor signaling: when dimerization is not enough. *Curr Biol* **9**, R568-71(1999).
125. Yesilkaya, T. Kinase-Inhibitoren außerhalb der ATP-Bindungsstelle. *Dissertation Universität zu Köln* (2005).
126. Karau, D. Wie Signalkomplexe die Spezifität von Kinasen beeinflussen. *Diplomarbeit Universität zu Köln* (2004).
127. Schägger, H. & von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368-79(1987).
128. Morrison, B.D. & Pessin, J.E. Insulin stimulation of the insulin receptor kinase can occur in the complete absence of beta subunit autophosphorylation. *J Biol Chem* **262**, 2861-8(1987).
129. Rogon, C. Modulation der Insulinrezeptor-Kinase durch Dimerisierung und deren Inhibitoren. *Diplomarbeit Universität zu Köln* (2004).
130. Devlin, J.J., Panganiban, L.C. & Devlin, P.E. Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. *Science* **249**, 404-6(1990).
131. Baer, K. u. a. An extended model of the activation mechanism of insulin- and IGF-1 receptor kinase: Dimerisation with an inactive kinase induces catalytic activity and cis-autophosphorylation.
132. Gamboni, S. u. a. Inhibition of the cAMP-dependent protein kinase by synthetic A-helix peptides. *Biochemistry* **37**, 12189-94(1998).
133. Bell, I. u. a. Biochemical and structural characterization of a novel class of inhibitors of the type 1 insulin-like growth factor and insulin receptor kinases. *Biochemistry* **44**, 9430-40(2005).
134. Frankel, M. u. a. Conformational changes in the activation loop of the insulin receptor's kinase domain. *Protein Sci* **8**, 2158-65(1999).
135. Gorre, M.E. u. a. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* **293**, 876-80(2001).
136. Blencke, S., Ullrich, A. & Daub, H. Mutation of threonine 766 in the epidermal growth factor receptor reveals a hotspot for resistance formation against selective tyrosine kinase inhibitors. *J Biol Chem* **278**, 15435-40(2003).
137. Goldberg, J., Nairn, A.C. & Kuriyan, J. Structural basis for the autoinhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase I. *Cell* **84**, 875-87(1996).
138. Yang, J. u. a. Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP. *Nat Struct Biol* **9**, 940-4(2002).
139. Wen, W. & Taylor, S.S. High affinity binding of the heat-stable protein kinase inhibitor to the

- catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase is selectively abolished by mutation of Arg133. *J Biol Chem* **269**, 8423-30(1994).
140. Lim, K. u. a. Three-dimensional structure of *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase fused with a six-amino acid conserved neutralizing epitope of gp41 from HIV. *Protein Sci* **3**, 2233-44(1994).
141. Nguyen, U.T. Modulation der funktionellen und strukturellen Eigenschaften des Insulin-like Growth Factor-1 Receptor durch Dimerisierung. *Diplomarbeit Universität zu Köln* (2005).
142. Niv, M. u. a. Sequence-based design of kinase inhibitors applicable for therapeutics and target identification. *J Biol Chem* **279**, 1242-55(2004).
143. Klein, M. u. a. Combined tyrosine and serine/threonine kinase inhibition by sorafenib prevents progression of experimental pulmonary hypertension and myocardial remodeling. *Circulation* **118**, 2081-90(2008).
144. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70(2000).
145. White, M. u. a. A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor. *J. Biol. Chem.* **263**, 2969-2980(1988).
146. Pawson, T. Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell* **116**, 191-203(2004).
147. Yun, C. u. a. Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity. *Cancer Cell* **11**, 217-27(2007).
148. Ikuta, M. u. a. Crystal structures of the N-terminal kinase domain of human RSK1 bound to three different ligands: Implications for the design of RSK1 specific inhibitors. *Protein Sci* **16**, 2626-35(2007).
149. Wang, Z. u. a. Crystal structures of IRAK-4 kinase in complex with inhibitors: a serine/threonine kinase with tyrosine as a gatekeeper. *Structure* **14**, 1835-44(2006).
150. Wood, E.R. u. a. A unique structure for epidermal growth factor receptor bound to GW572016 (Lapatinib): relationships among protein conformation, inhibitor off-rate, and receptor activity in tumor cells. *Cancer Res* **64**, 6652-9(2004).
151. Scott, J.W. u. a. Protein kinase substrate recognition studied using the recombinant catalytic domain of AMP-activated protein kinase and a model substrate. *J Mol Biol* **317**, 309-23(2002).
152. Till, J.H., Chan, P.M. & Miller, W.T. Engineering the substrate specificity of the Abl tyrosine kinase. *J Biol Chem* **274**, 4995-5003(1999).
153. Huang, C.Y. u. a. Identification of the substrate and pseudosubstrate binding sites of phosphorylase kinase gamma-subunit. *J Biol Chem* **270**, 7183-8(1995).
154. Batkin, M. & Shaltiel, S. The negative charge of Glu-127 in protein kinase A and its biorecognition. *FEBS Lett* **452**, 395-9(1999).
155. Takahashi, Y. u. a. A homozygous kinase-defective mutation in the insulin receptor gene in a patient with leprechaunism. *Diabetologia* **40**, 412-20(1997).
156. Desbois-Mouthon, C. u. a. Severe resistance to insulin and insulin-like growth factor-I in cells from a patient with leprechaunism as a result of two mutations in the tyrosine kinase domain of the insulin receptor. *Metabolism* **45**, 1493-500(1996).
157. Schulte, R.J. & Sefton, B.M. Inhibition of the activity of SRC and Abl tyrosine protein kinases by the binding of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Biochemistry* **42**, 9424-30(2003).

158. Schwarze, S.R., Hruska, K.A. & Dowdy, S.F. Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? *Trends Cell Biol* **10**, 290-5(2000).
159. Jones, S.W. u. a. Characterisation of cell-penetrating peptide-mediated peptide delivery. *Br. J. Pharmacol* **145**, 1093-1102(2005).
160. Deshayes, S. u. a. Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics. *Cell. Mol. Life Sci* **62**, 1839-1849(2005).
161. Schumacher, T.N.M. u. a. Identification of D-Peptide Ligands Through Mirror-Image Phage Display. *Science* **271**, 1854-1857(1996).
162. Wiesehan, K. & Willbold, D. Mirror-image phage display: aiming at the mirror. *Chembiochem* **4**, 811-5(2003).
163. Wiesehan, K. u. a. Selection of D-amino-acid peptides that bind to Alzheimer's disease amyloid peptide abeta1-42 by mirror image phage display. *Chembiochem* **4**, 748-53(2003).
164. Wiesehan, K. u. a. Inhibition of cytotoxicity and amyloid fibril formation by a D-amino acid peptide that specifically binds to Alzheimer's disease amyloid peptide. *Protein Eng Des Sel* **21**, 241-6(2008).
165. Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989).
166. Zhou, C., Yang, Y. & Jong, A.Y. Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques* **8**, 172-3(1990).
167. Chung, C.T., Niemela, S.L. & Miller, R.H. One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2172-5(1989).
168. Dower, W.J., Miller, J.F. & Ragsdale, C.W. High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**, 6127-45(1988).
169. Smith, D.B. & Johnson, K.S. Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31-40(1988).
170. Rial, D.V. & Ceccarelli, E.A. Removal of DnaK contamination during fusion protein purifications. *Protein Expr Purif* **25**, 503-7(2002).
171. Minamide, L.S. & Bamberg, J.R. A filter paper dye-binding assay for quantitative determination of protein without interference from reducing agents or detergents. *Analytical Biochemistry* **190**, 66-70(1990).
172. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54(1976).
173. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5(1970).
174. Hawkes, R., Niday, E. & Gordon, J. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal Biochem* **119**, 142-7(1982).
175. Goso, Y. & Hotta, K. Dot blot analysis of rat gastric mucin using histochemical staining methods. *Anal Biochem* **223**, 274-9(1994).
176. Blakesley, R.W. & Boezi, J.A. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using coomassie brilliant blue G250. *Anal Biochem* **82**, 580-2(1977).
177. Lin, F., Fan, W. & Wise, G.E. Eosin Y staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **196**, 279-83(1991).

178. Eng, P.R. & Parkes, C.O. SDS electrophoresis of fluorescamine-labeled proteins. *Anal Biochem* **59**, 323-5(1974).
179. Rabilloud, T. Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis. *Electrophoresis* **11**, 785-94(1990).
180. Salinovich, O. & Montelaro, R.C. Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* **156**, 341-7(1986).
181. Sahal, D. & Fujita-Yamaguchi, Y. Protein kinase assay by paper-trichloroacetic acid method: high performance using phosphocellulose paper and washing an ensemble of samples on flat sheets. *Anal Biochem* **167**, 23-30(1987).
182. Barker, S. u. a. Characterization of pp60c-src tyrosine kinase activities using a continuous assay: autoactivation of the enzyme is an intermolecular autophosphorylation process. *Biochemistry* **34**, 14843-51(1995).
183. Pace, C.N. u. a. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* **4**, 2411-23(1995).
184. WADDELL, W.J. A simple ultraviolet spectrophotometric method for the determination of protein. *J Lab Clin Med* **48**, 311-4(1956).

9 Anhang

9.1 Reinigung der GST-Kinasen

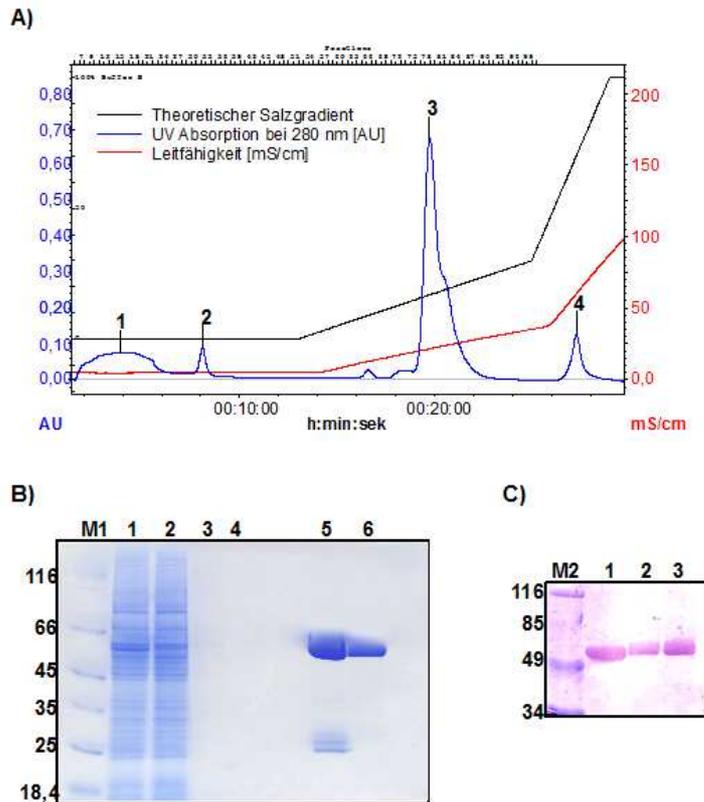


Abbildung 9.1.1: Reinigungsdokumentation der GST-getagten Kinase GST-IGFAC.

GST-IGFAC wurde zunächst über Glutathion-Sepharose-Affinitätschromatographie gereinigt. Um die Reinheit der Kinase zu erhöhen, wurde sie anschließend über Anionen-Austauscher-FPLC gegeben.

A: Chromatogramm der Anionen-Austauscher FPLC. Gezeigt ist das Elutionsprofil. Neben dem UV-Profil bei 280 nm (in blau) sind die Leitfähigkeitsmessung (blau) und der theoretische Salzgradient eingezeichnet (schwarz). Die Peaks wurden nummeriert. Die Kinase wurde bei 17 % B (170 mM NaCl) von der Säule eluiert (Peak 2). Peak 1 konnte GST zugeordnet werden. B: 12 % SDS-Gel zur Reinigungsdokumentation, gefärbt mit kolloidale Peptidfärbelösung. Die GST-getagte Kinase hat ein errechnetes Molekulargewicht von 63 kDa und läuft in der SDS-PAGE entsprechend zwischen der 45 kDa und 66,2 kDa Bande des Markers. Die Banden bei 25 kDa stammen vom zellmanenten GST, sowie exogenem, durch den Abbruch der Proteinsynthese entstandenem GST. Es ist zu erkennen, dass die Kinase nach der Glutathion-Affinitätschromatographie zu etwa 90 % rein erhalten werden konnte. Nach dem zweiten Aufreinigungsschritt über die Anionen-Austauscher-FPLC ist die Kinase zu nahezu 100 % rein. So konnten aus $5-6 \times 10^8$ Zellen 4-5 mg Kinase isoliert werden. Aufgetragen sind: **M1**: Protein Molecular Weight Marker; **1**: Lysat; **2**: Durchlauf der GSH-Matrix; **3**: Erster Waschschrift der GSH-Reinigung; **4**: Zweiter Waschschrift der GSH-Reinigung; **5**: Eluat der GSH-Reinigung; **6**: Vereinigte Kinasefraktionen der Anionen-Austauscher FPLC. C: Western Blot der drei Kinasevarianten GST-IGFAC, GST-IGFAC-E1069K, GST-IGFAC-E1067/1069K mit einem gegen die Kinasedomäne gerichteten Antikörper. Aufgetragen wurden: **M2**: Prestained Protein Molecular Weight Marker; **1**: GST-IGFAC; **2**: GST-IGFAC-E1069K; **3**: GST-IGFAC-E1067/1069K. Der Antikörper erkennt die drei aufgetragenen Kinasen.

9.2 Reinigung der ungetagten, monomeren Kinase

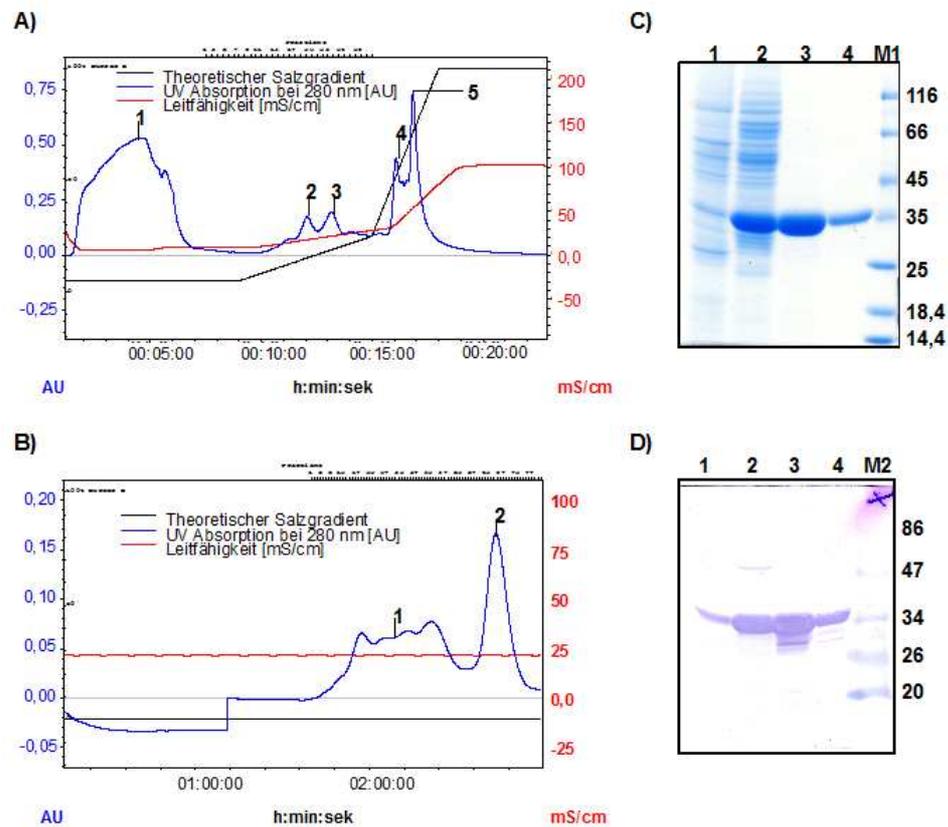


Abbildung 9.2.1: Reinigungsdokumentation der ungetagten, monomeren IGF1R.

Das Rohlysat (10-12 x 10⁸ Zellen) wurde zunächst über Anionen- Austauscher-FPLC gereinigt. In allen Fraktionen war die Kinase noch stark verunreinigt, so dass die Kinase-enthaltenden Fraktionen über Gelfiltrationschromatographie weiter aufgereinigt wurden.

A: Chromatogramme der Anionen-Austauscher-FPLC. Gezeigt ist das Elutionsprofil. Neben dem UV-Profil bei 280 nm (in blau) sind die Leitfähigkeitsmessung (blau) und der theoretische Salzgradient eingezeichnet (schwarz). Die Peaks wurden nummeriert. Die Elution erfolgte im Bereich von 150-200 mM NaCl (Peak 2 und 3). **B:** Chromatogramme der Gelfiltrations-FPLC. In der Gelfiltrations-FPLC wird die Kinase nach 160 min eluiert (Peak 2). Peak 1 enthält höhermolekulare Verunreinigungen.

C: 12 % SDS-Gel zur Reinigungsdokumentation, gefärbt mit kolloidaler Peptidfärbelösung. Aufgetragen sind: **M1:** Protein Molecular Weight Marker; **1:** Lysat; **2:** Probe der vereinigten Kinasefraktionen der ResQ-Säule; **3:** Probe der vereinigten Kinasefraktionen der Superdex-Säule; **4:** Probe der IRAC zur Kontrolle; Die monomere Kinase hat ein errechnetes Molekulargewicht von 37 kDa und läuft somit direkt oberhalb der 35 kDa Bande des Proteinmarkers und auf gleicher Höhe der IRAC. Während die monomere Kinase nach der Anionen-Austauscher-FPLC noch stark verunreinigt ist, führt der zweite Schritt über die Gelfiltrations-FPLC zu einer zu nahezu 100 % reinen Kinase. Aus 10-12 x 10⁸ wurden so c.a. 3,5 mg monomere Kinase erhalten. **D:** Western Blot des Reinigungsgels mit einem gegen die Kinasedomäne gerichteten Antikörper. Auftragung wie unter C, außer: **M2:** Prestained Protein Molecular Weight Marker. Von dem Antikörper wird sowohl die Kinasedomäne des IR als auch des IGF-1R erkannt.

9.3 Reinigung der His-Getagten Kinasen EGF-His

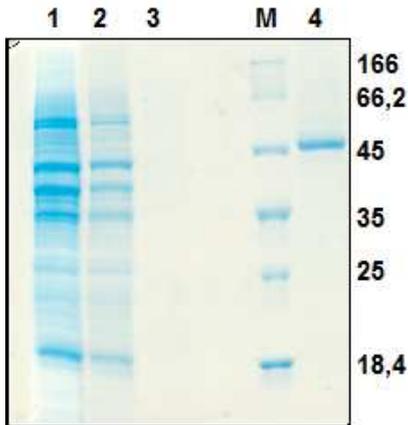


Abbildung 9.3.1: Reinigungsdokumentation der EGF-His Dargestellt ist die 12 % SDS-PAGE zur Reinigungs-dokumentation der EGF-His über Nickel-Chelat-Affinitäts-chromatographie gefärbt in kolloidale Peptidfärbelösung. Für eine Reinigung wurden etwa $8-10 \times 10^8$ Zellen verwendet.

Aufgetragen wurden **1**: Probe des Rohlysats; **2**: Probe des Durchlaufs der Nickel-Chelat-Matrix **3**: Probe des Durchlaufs des Waschschriffs der Nickel-Chelat-Matrix **4**: Probe der vereinigten Eluate; **M**: Protein Molecular Weight Marker. Die Kinase hat ein errechnetes Molekulargewicht von 61 kDa, läuft in der SDS-PAGE allerdings bei etwa 50 kDa. Die SDS-PAGE verdeutlicht die hohe Reinheit, die über die Nickel-Chelat-Affinitäts-Chromatographie erreicht werden konnte, so dass ein weiterer Aufreinigungsschritt nicht notwendig war. Aus $8-10 \times 10^8$ Zellen wurden 2-3 mg Protein isoliert.

9.4 Reinigung der GST-TS-IGF Δ C-Y950F

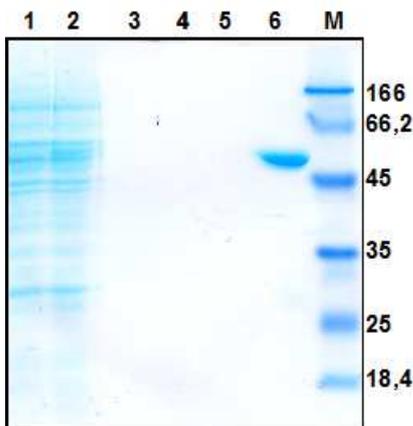


Abbildung 9.4.1: Reinigungsdokumentation der GST-IGF Δ C-Y950F

Dargestellt ist die 12 % SDS-PAGE zur Reinigungsdokumentation der GST-IGF Δ C-Y950F über Glutathion-Sephrose-Affinitätschromatographie gefärbt in kolloidaler Peptidfärbelösung. Zur Reinigung wurden 5×10^8 Zellen verwendet.

Aufgetragen wurden 1: Probe des Rohlysats; 2: Probe des Durchlaufs der GSH-Matrix 3: Probe des Durchlaufs des GSH-Waschpuffer 1 4: Probe des Durchlaufs GSH-Waschpuffer 2; 5: Probe des Durchlaufs des GSH-Waschpuffer 3; 6: Probe der vereinigten Eluate; M: Protein Molecular Weight Marker. Die Kinase hat ein errechnetes Molekulargewicht von 63 kDa, zeigt in der 12 % SDS-PAGE ein apparentes Molekulargewicht von etwa 50 kDa. Es ist zu erkennen, dass die Kinase nach der Glutathion-Affinitätschromatographie zu nahezu 100 % rein erhalten werden konnte. So konnten aus 5×10^8 Zellen etwa 5 mg Kinase isoliert werden.

9.5 Proteolytische Abtrennung von GST und Reinigung der monomeren Kinasen

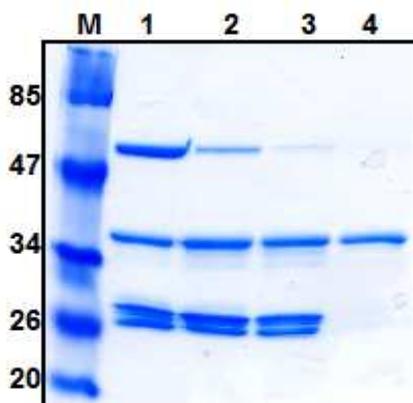


Abbildung 9.5.1: Monomerisierung und Reinigung der IGFAC-Y950F

Dargestellt ist die 12 % SDS-PAGE zur Dokumentation der Generierung der monomeren IGFAC-Y950F über proteolytischen Verdau mittels TEV-Protease und anschließender Reinigung über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie sowie Glutathion-Affinitätschromatographie. Die Kinase wurde in einem Verhältnis zur Protease von 20:1 für 1,5 h bei 4 °C gespalten. Der Verdau wurde durch Zugabe des Protease-Inhibitor-Cocktail *Complete* gestoppt. Die TEV-Protease besitzt einen His-Tag und kann aus dem Ansatz über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie abgetrennt werden. Das abgespaltene GST, sowie die ungeschnittene Kinase werden über Glutathion-Sepharose-Affinitätschromatographie aus dem Ansatz entfernt. Die SDS-PAGE verdeutlicht, dass die monomere Kinase durch die zwei Reinigungsschritte zu nahezu 100 % rein isoliert werden kann. Aus 3 mg dimerer Kinase wurden so c.a. 1 mg monomere Kinase erhalten. GST- IGFAC-Y950F läuft bei 49 kDa, IGFAC-Y950F, GST bei 25 kDa. Aufgetragen wurden: **M**: Protein Molecular Weight Marker; **1**: Verdau nach 30 min; **2**: Verdau nach 1,5 h; **3**: Durchlauf der Nickel-Chelat-Matrix; **4**: Durchlauf der Glutathion-Sepharose-Matrix.

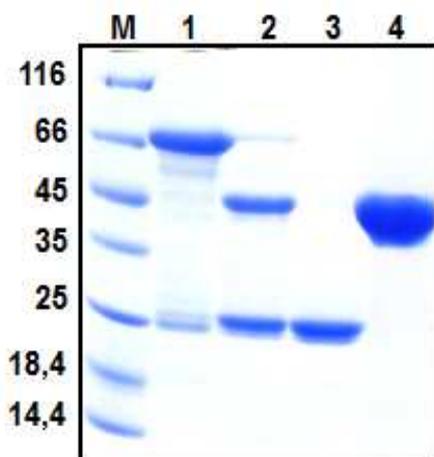


Abbildung 9.5.2: Monomerisierung und Reinigung der IRKD-D1120A-His

Dargestellt ist die 12 % SDS-PAGE zur Dokumentation der Generierung der monomeren IRKD-D1120A-His über proteolytischen Verdau mittels Thrombin. Der Verdau wurde anschließend über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Kinase wurde in einem Verhältnis zur Protease von 300:1 für 20 min bei 4 °C gespalten. Der Verdau wurde durch Zugabe des Protease-Inhibitor-Cocktail *Complete* gestoppt. Die PAGE zeigt, dass die monomere IRKD-D1120A-His zu nahezu 100 % rein erhalten wurde. Aus einem Verdau von 10 mg Kinase konnten etwa 7,5-8 mg gespaltene Kinase erhalten werden.

Aufgetragen wurden: **M**: Protein Molecular Weight Marker; **1**: Probe der unverdauten GST-IRKD-D1120A-His; **2**: Probe des Verdau nach 20 min; **3**: Probe des Durchlaufs der Nickel-Chelat-Matrix; **4**: Probe der vereinigten Eluate der Nickel-Chelat-Matrix.

Die ungespaltene Kinase läuft bei etwa 73 kDa, die gespaltene Kinase läuft bei 47 kDa. Bei den Banden bei 25 kDa handelt es sich um zellimantentes, sowie abgespaltenes, exogenes GST. Das Gel wurde in kolloidale Peptidfärbelösung gefärbt.

9.6 Reinigung der Zielproteine GST-IGF-NT und GST-IR-NT

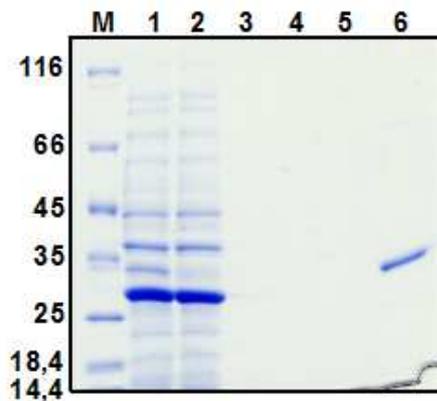


Abbildung 9.7.1: Reinigungsdokumentation des Zielproteins GST-IGF-NT

Dargestellt ist das 12 % SDS-Gel zur Dokumentation der Reinigung des GST-IGF-NT über Glutathion-Sepharose-Affinitätschromatographie. Die Proteine konnten in einer Reinheit von über 90 % isoliert werden. Aus einem Liter Kulturvolumen ließen sich etwa 4 mg Protein aufreinigen. Das Zielprotein GST-IR-NT zeigt einen ähnlichen Reinigungsverlauf.

Aufgetragen wurden: **M**: Protein Molecular Weight Marker; **1**: Probe des Rohlysats; **2**: Probe des Durchlaufs der Glutathion-Sepharose-Matrix; **3**: Probe des Durchlaufs des GSH-Waschpuffer 1; **4**: Probe des Durchlaufs des GSH-Waschpuffer 2; **5**: Probe des Durchlaufs des GSH-Waschpuffer 3; **6**: Probe der vereinigten Eluate. GST-IGF-NT läuft bei etwa 34 kDa.

9.7 Reinigung des Substrats Tyrtide-His

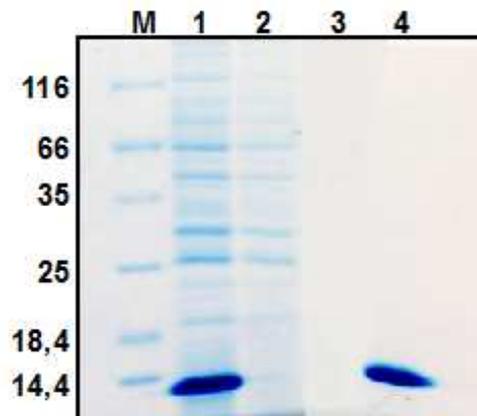


Abbildung 9.7.2: Reinigungsgel des Substrats Tyrtide-His

Dargestellt ist das 15 % SDS-Gel zur Dokumentation der Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie von Tyrtide-His. Das Gel wurde in kolloidaler Peptidfärbelösung gefärbt. Schon im Rohlysate ist Tyrtide zu über 50 % rein. Über die Ni-NTA-Reinigung konnte das Substrat zu nahezu 100 % rein erhalten werden. Aus einem Liter Kulturvolumen ließen sich etwa 10 mg Protein aufreinigen.

Aufgetragen wurden: **M**: Protein Molecular Weight Marker; **1**: Probe des Rohlysats; **2**: Probe des Durchlaufs der Nickel-Chelat-Matrix; **3**: Probe des Durchlaufs des Ni-NTA-Waschpuffer; **4**: Probe der vereinigten Eluate.

Das errechnete Molekulargewicht von Tyrtide entspricht 9,4 kDa, das Protein läuft in der 15 % SDS-PAGE apparent bei etwa 12 kDa.

9.8 Färbung der gespaltenen Peptide im Schägger-Gel mittels Fluorescamin

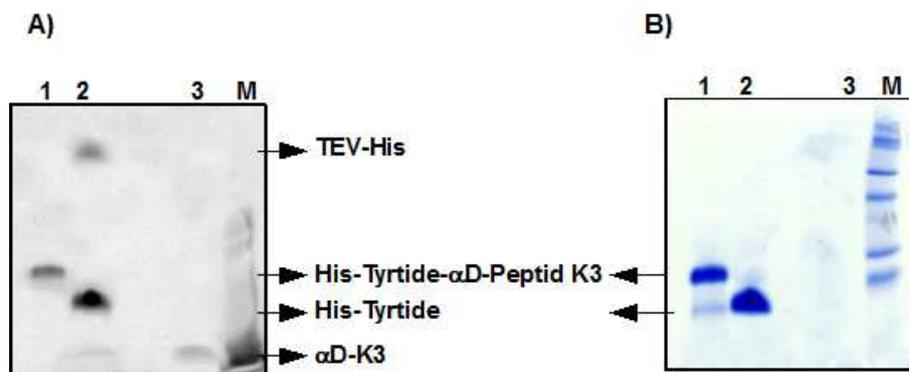


Abbildung 9.9.1: Generierung des Peptids α D-Peptid K2-Cys mittels Proteolyse

Schägger-Gel zur Dokumentation des proteolytischen Verdaus von unmarkierten His-Tyrtide- α D-Peptid K3-Cys durch die TEV-Protease und Aufreinigung des Peptids α D-Peptid K3-Cys über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie. Von dem ungespaltenem Fusionspeptid, dem Verdau nach 3 h und dem Durchlauf der Nickel-Chelat-Matrix wurden Proben entnommen und wie unter 7.3.13.3 beschrieben mit Fluorescamin behandelt. Anschließend wurden die Proben über ein Schägger-Gel aufgetrennt.

A: Gel gefärbt in Peptidfärbelösung. **B:** Gel unter UV. Es werden nur die markierten Proteine sichtbar. Aufgetragen wurden: **1:** ungespaltenes His-Tyrtide- α D-Peptid K3-Cys; **2:** Verdau nach 3 h **3:** Durchlauf der Nickel-Chelat-Matrix; **M:** Prestained Molecular Weight Marker. Das ungespaltene Fusionspeptid hat eine errechnete Molekularmasse von 12,6 kDa, Tyrtide eine von 9,4 kDa und das gespaltene α D-Peptid K3-Cys eine von 2,3 kDa.

9.9 Chromatogramm der HPLC-Reinigung der chemisch generierten Peptide

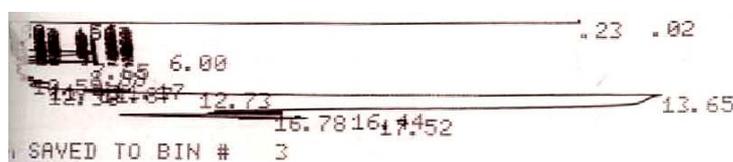
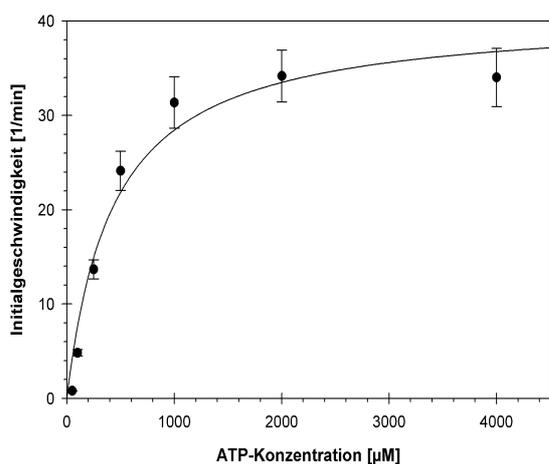


Abbildung 9.9.2: Chromatogramm der Reinigung des chemisch generierten Peptids IGF-NT K3 über Reversed-phase- High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC).

Das Peptid wurde bei 28 % Acetonitril/0,1 % TFA von der Säule eluiert.

9.10 Michaelis-Menten-Kurven der ATP-abhängigen Substratphosphorylierung der dimeren Kinasemutanten GST-IGF Δ C-E1069K und GST-IGF Δ C-E1067/1069K

A)



B)

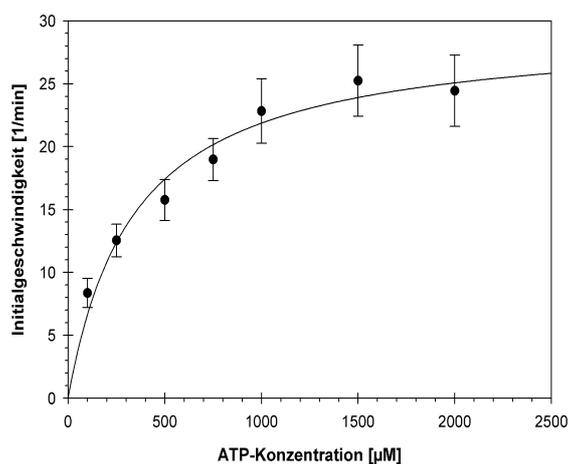


Abbildung 9.10.1: Bestimmung der kinetischen Daten für die ATP-abhängige Substratphosphorylierung der dimeren Kinasemutanten GST-IGF Δ C-E1069K und GST-IGF Δ C-E1067/1069K.

Michaelis-Menten Kurven der ATP-abhängigen Substratphosphorylierung der dimeren Kinasemutanten GST-IGF Δ C-E1069K und GST-IGF Δ C-E1067/1069K. Zur Ermittlung der kinetischen Daten wurde ein gekoppelter Assay durchgeführt. Es wurden 0,2 μ M dimere Kinase und 200 μ M Tyrtide verwendet. **A:** Michaelis-Menten-Kurve der GST-IGF Δ C-E1069K. Aus dem hyperbolischen Fit wurde ein K_M für ATP von 432,29 μ M und ein k_{cat} von 0,68 s^{-1} erhalten. **B:** Michaelis-Menten-Kurve der GST-IGF Δ C-E1069K. Aus dem hyperbolischen Fit wurde ein K_M für ATP von 343,30 μ M und ein k_{cat} von 0,49 s^{-1} erhalten.

9.11 Michaelis-Menten-Kurve der ATP-abhängigen Substratphosphorylierung der monomeren IGF Δ C

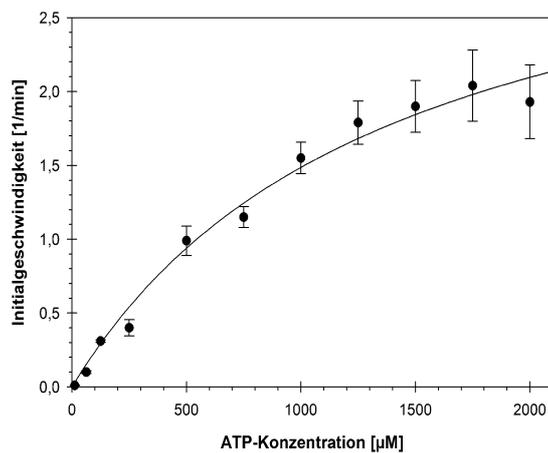


Abbildung 9.12.1: Bestimmung der kinetischen Daten für die ATP-abhängige Substratphosphorylierung der monomeren IGF Δ C.

Michaelis-Menten Kurven der ATP-abhängigen Substratphosphorylierung der IGF Δ C. Zur Ermittlung der kinetischen Daten wurde ein radioaktiver Assay in Abhängigkeit von der ATP Konzentration durchgeführt. Es wurden 1 μ M dimere Kinase und 200 μ M Tyrtide verwendet. Aus den Umsatzkurven, Phosphattransfer auf das Substrat mit der Zeit, wurde die Initialgeschwindigkeit für die verschiedenen ATP Konzentrationen bestimmt. Eine Auftragung der Initialgeschwindigkeit gegen die ATP-Konzentration liefert die Michaelis-Menten-Kurve. Aus dem hyperbolischen Fit wurde ein K_M für ATP von 810,92 μ M und ein k_{cat} von 0,045 s^{-1} erhalten.

9.12 Auswertung einer radioaktiven Phosphorylierung über die SDS-PAGE am Beispiel der Tyrtide-Phosphorylierung der monomeren Kinase

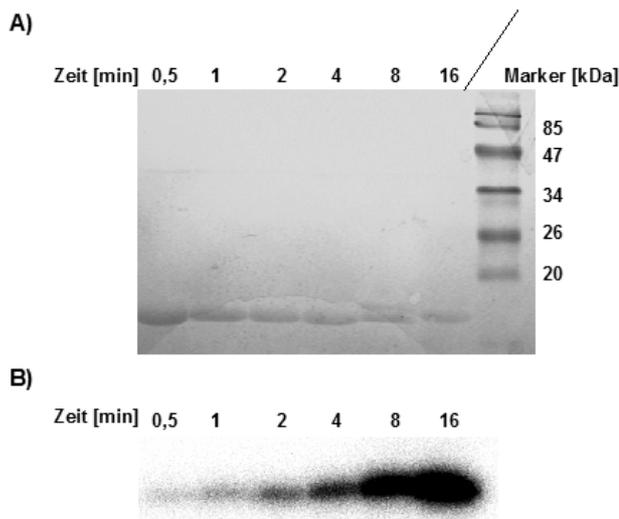


Abbildung 9.12.2: SDS-Gel zur Auswertung der radioaktiven Substratphosphorylierung der monomeren IGF Δ C.

Es wurden 100 μ M Tyrtide durch 5 μ M IGF Δ C unter Standardbedingungen zeitabhängig phosphoryliert. Zu den entsprechenden Zeiten wurden den Ansätzen Proben entnommen und im 18 %-SDS-Gel aufgetrennt. Die Dokumentation der PAGE erfolgte über Coomassie-Färbung (A) sowie Phosphoimager (B). Die radioaktiven Substratbanden wurden aus-geschnitten, im Counter analysiert und graphisch ausgewertet. Die Zeitwerte sowie Größen des Prestained Markers sind angegeben. Tyrtide läuft bei etwa 9 kDa.

9.13 Autophosphorylierung der dimeren GST-IGFΔC in Anwesenheit der Peptide IGF-NT K1 und K3

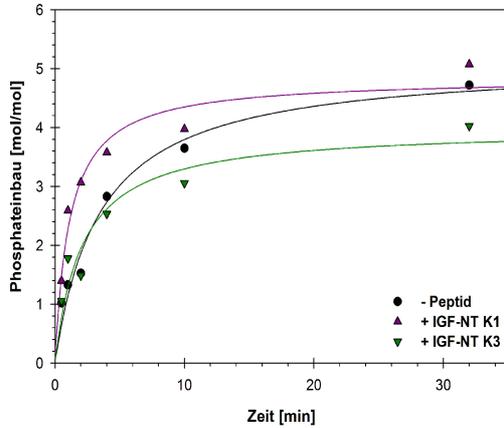


Abbildung 9.14.1: Die Aktivität der dimeren Kinase wird nicht durch die Peptide beeinflusst.

Dargestellt ist die graphisch Auswertung der Autophosphorylierung von 0,5 μM GST-IGFΔC +/- 25 μM IGF-NT K1 bzw. K3. Peptid und Kinase wurden für 45 min bei 4 °C vorinkubiert. Ausgewertet wurde die Phosphorylierung über SDS-PAGE. Aufgetragen wurde der Phosphateinbau in die Kinase gegen die Zeit. Die Peptide haben keinen inhibitorischen Einfluss auf die Autophosphorylierung der dimeren Kinase.

9.14 Auswertung einer radioaktiven Phosphorylierung über den Paperassay am Beispiel der K_M Bestimmung der monomeren Kinase

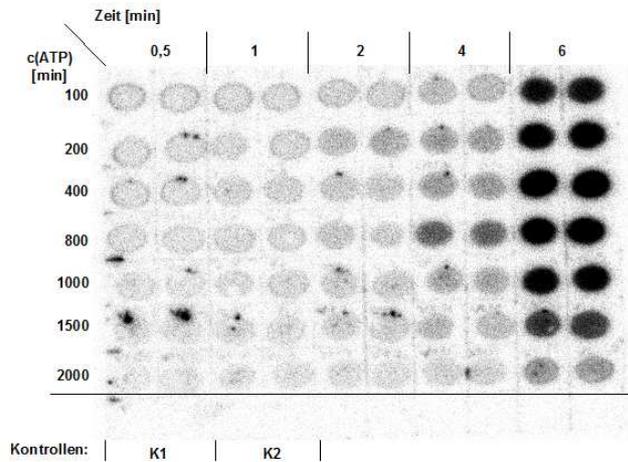


Abbildung 9.14.2: Paperassay zur Bestimmung des K_M für ATP der monomeren Kinase.

Gezeigt ist eine Autoradiographie eines Paperassays. 200 μM Tyrtide wurde durch 1 μM monomere IGFΔC zeitabhängig bei unterschiedlichen ATP-Konzentrationen phosphoryliert. Zu den gegebenen Zeiten wurden 10 μl Probe entnommen und mit 5 μl EDTA (Endkonzentration 150 mM) abgestoppt. Davon wurden anschließend 2 x 6 μl auf Whatman P81-Papier aufgetragen. Das Papier wurde mit eiskalter 0,85 % (w/v) Phosphorsäure und anschließend mit Aceton gewaschen. Dadurch wird die Kinase vom Papier gewaschen. Nach dem Trocknen wurden die Probenfelder ausgeschnitten und die Radioaktivität durch Messung der Cerenkov-Strahlung bestimmt. Zur Kontrolle wurden Proben eines Phosphorylierungsansatzes ohne Substrat (**K1**) bzw. eines Ansatzes ohne Kinase (**K2**) mit aufgetragen. Die für diese Kontroll-Probenfelder ermittelte Strahlung wird bei der Auswertung als Hintergrundstrahlung von den Proben abgezogen.

9.15 Substratphosphorylierung der monomeren TrkB-His, EGF-His und GST-Akt in Anwesenheit der Peptide IGF-NT K1 und K3

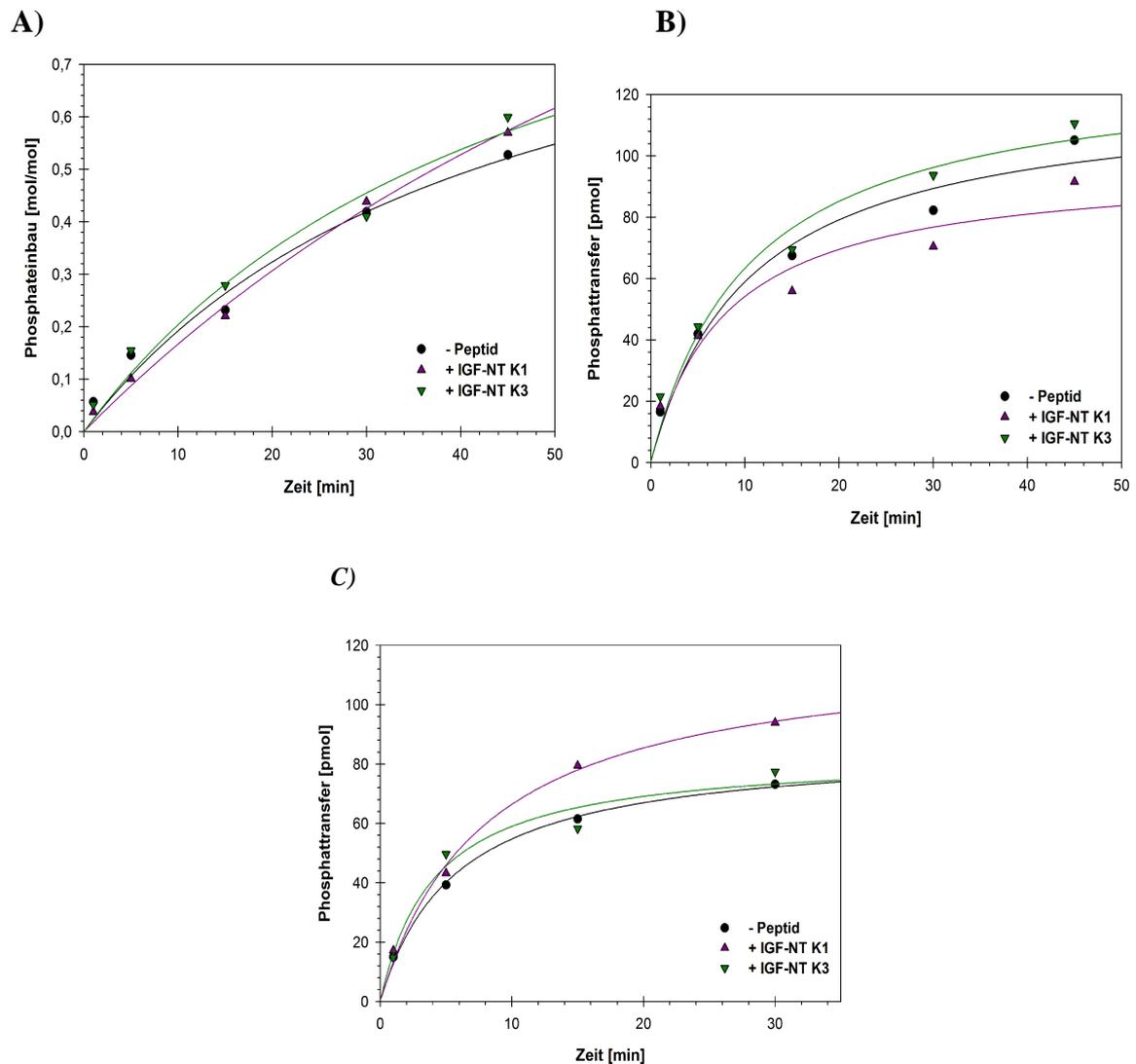


Abbildung 9.15.1: Die Peptide üben keinen inhibitorischen Einfluss auf die TrkB-His, EGF-His und GST-Akt aus.

A: Dargestellt ist die graphische Auswertung der zeitabhängigen Substratphosphorylierung von 60 μM Tyrtide durch 3 μM TrkB-His +/- 150 μM Peptid. Aufgetragen wurde der Phosphateinbau in Tyrtide gegen die Zeit. **B:** Dargestellt ist die graphische Auswertung der zeitabhängigen Substratphosphorylierung von 9 μM GST-Gab1 durch 3 μM EGF-His +/- 150 μM Peptid. **A:** Aufgetragen wurde der Phosphatransfer auf GST-Gab1 gegen die Zeit. **C:** Dargestellt ist die graphische Auswertung der zeitabhängigen Substratphosphorylierung von 5 μM GST-PTB₃₇₀ durch 0,5 μM GST-Akt +/- 25 μM Peptid. Aufgetragen wurde der Phosphatransfer auf das Substrat gegen die Zeit.

9.16 Einfluss der markierten, aus *E.coli* stammenden Peptide IGF-NT K1-Cys und IGF-NT K3-Cys auf die monomere IGF Δ C

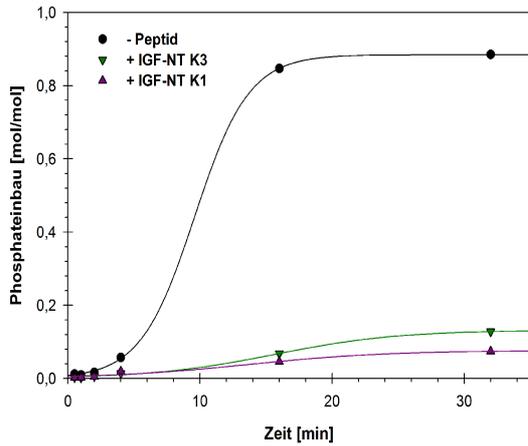


Abbildung 9.16.1: Das Label Tetramethylrhodamin-5-maleimid hat keinen Einfluss auf die inhibitorische Wirkung der Peptide.

Dargestellt ist die graphische Auswertung der zeitabhängigen Substratphosphorylierung von 100 μ M Tyrtide durch 5 μ M IGF Δ C. Es wurden 250 μ M markiertes, aus *E.coli* erhaltenes IGF-NT K1-Cys eingesetzt. Von IGF-NT K3-Cys konnten auf Grund der geringen Konzentration nur 125 μ M eingesetzt werden. Aufgetragen wurde der Phosphateinbau in das Substrat Tyrtide in Abhängigkeit der Zeit. Der inhibitorische Effekt der markierten Peptide ist vergleichbar mit dem der unmarkierten, chemisch synthetisierten Peptide.

9.17 Einfluss der unmarkierten Peptide α D-Peptid K2-Cys und α D-Peptid K3-Cys auf die monomere IGF Δ C

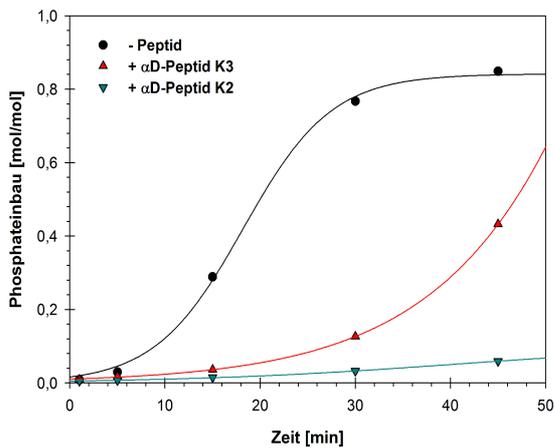


Abbildung 9.17.1: Untersuchung des Einflusses des Labels Tetramethylrhodamin-5-maleimid auf die inhibitorische Wirkung der Peptide.

Dargestellt ist die graphische Auswertung der zeitabhängigen Substratphosphorylierung von 60 μ M Tyrtide durch 3 μ M IGF Δ C. Es wurden 150 μ M unmarkiertes α D-Peptid K2-Cys bzw. 45 μ M unmarkiertes α D-Peptid K3-Cys eingesetzt. Aufgetragen wurde der Phosphateinbau in Tyrtide in Abhängigkeit von der Zeit. Der inhibitorische Effekt von unmarkiertem α D-Peptid K2-Cys ist vergleichbar mit dem des markierten Peptids. Unmarkiertes α D-Peptid K3-Cys zeigt hingegen einen stärkeren inhibitorischen Einfluss als das markierte Peptid.

9.18 Substratphosphorylierung der monomeren TrkB-His, EGF-His und GST-Akt in Anwesenheit der Peptide α D-Peptid K2 und K3

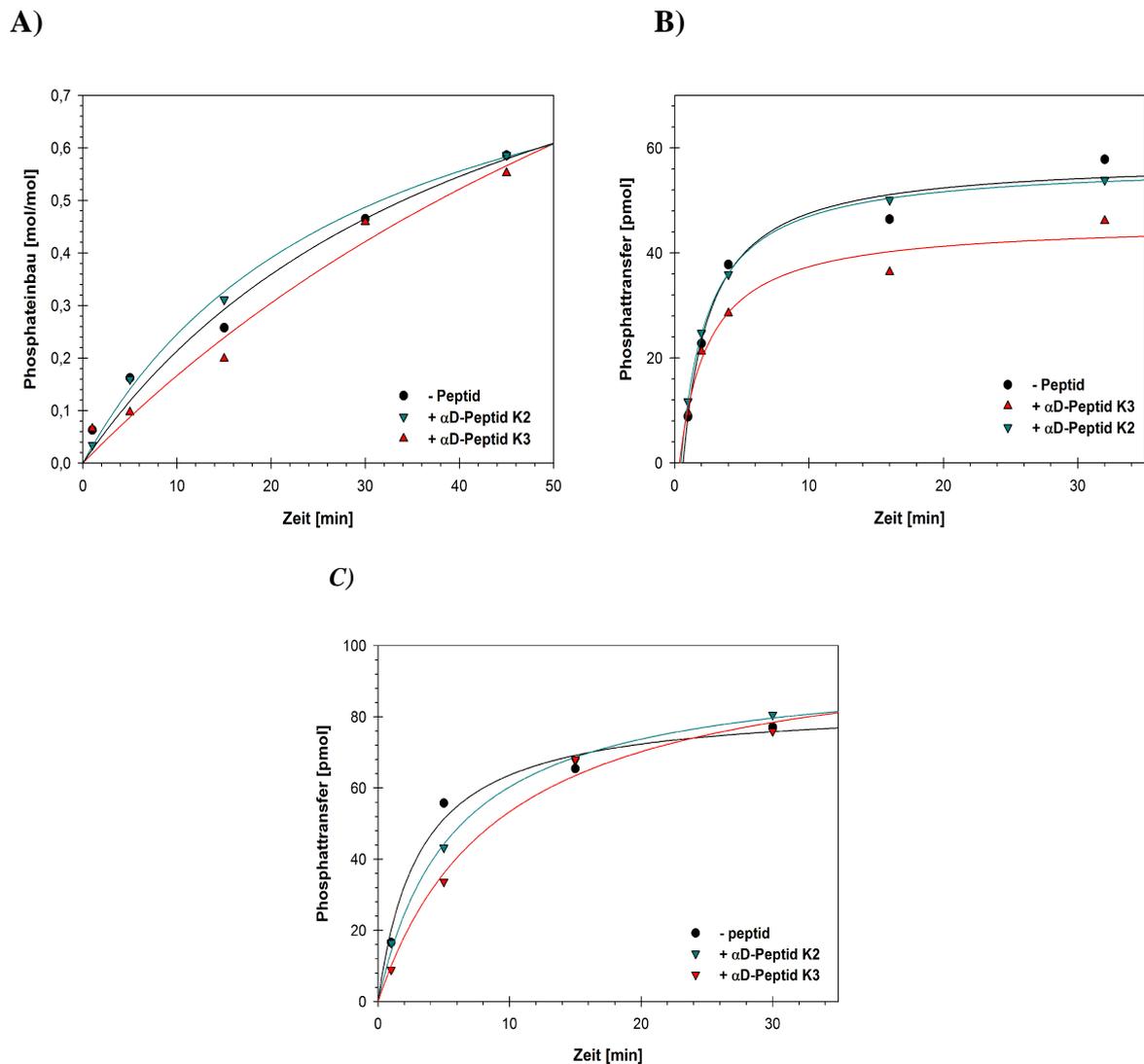


Abbildung 9.18.1: Die Peptide üben keinen inhibitorischen Einfluss auf die TrkB-His, EGF-His und GST-Akt aus.

A: Dargestellt ist die graphische Auswertung der zeitabhängigen Substratphosphorylierung von 60 μ M Tyrtide durch 3 μ M TrkB-His +/- 45 μ M α D-Peptid K2-Cys bzw. 150 μ M α D-Peptid K3-Cys Peptid. Aufgetragen wurde der Phosphatereinbau in Tyrtide gegen die Zeit. **B:** Dargestellt ist die graphische Auswertung der zeitabhängigen Substratphosphorylierung von 9 μ M GST-Gab1 durch 3 μ M EGF-His +/- 45 μ M α D-Peptid K2-Cys bzw. 150 μ M α D-Peptid K3-Cys Peptid. Aufgetragen wurde der Phosphattransfer auf GST-Gab1 gegen die Zeit. **C:** Dargestellt ist die graphische Auswertung der zeitabhängigen Substratphosphorylierung von 5 μ M GST-PTB₃₇₀ durch 0,5 μ M GST-Akt +/- 25 μ M Peptid. Aufgetragen wurde der Phosphattransfer auf das Substrat gegen die Zeit.

9.19 Michaelis-Menten-Kurve der ATP-abhängigen Substratphosphorylierung der monomeren IGFΔC in Anwesenheit von αD-Peptid K2

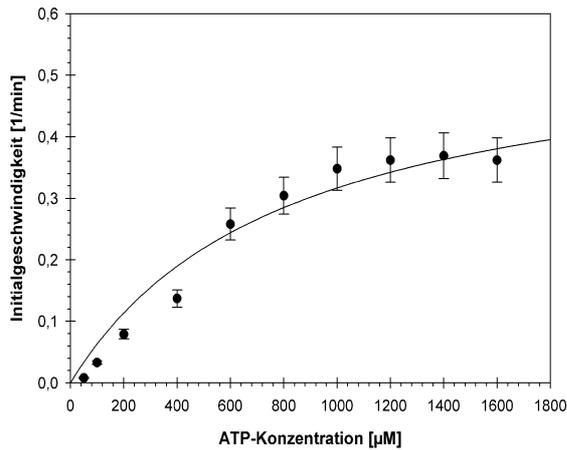


Abbildung 9.20.1: Bestimmung der kinetischen Daten für die ATP-abhängige Substratphosphorylierung der monomeren IGFΔC in Anwesenheit von αD-Peptid K2-Cys.

Michaelis-Menten Kurven der ATP-abhängigen Substratphosphorylierung der IGFΔC. Zur Ermittlung der kinetischen Daten wurde ein radioaktiver Assay in Abhängigkeit von der ATP Konzentration durchgeführt. Es wurden 1 µM dimere Kinase, 200 µM Tyrtide und 10 µM unmarkiertes αD-Peptid-K2-Cys verwendet. Ausgewertet wurde die Phosphorylierung über den Paperassay. Aus dem hyperbolischen Fit wurde ein K_M für ATP von 1175,48 µM und ein k_{cat} von 0,005 s⁻¹ erhalten.

9.20 Bestimmung des IC₅₀ für αD-Peptid K2-Cys

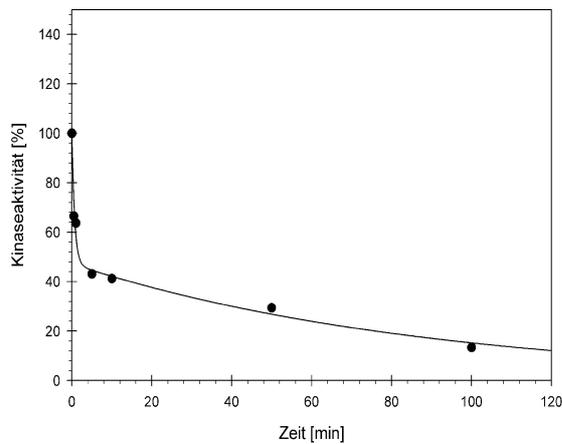


Abbildung 9.20.2: IC₅₀-Bestimmung für 3 µM Kinase.

Zur Bestimmung des IC₅₀ wurde die Kinaseaktivität bei steigender Peptidkonzentration bestimmt. Dazu wurden 50 µM Tyrtide durch 1 µM Kinase bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen phosphoryliert. Zur Bestimmung der Kinaseaktivität wurde der Phosphattransfer auf das Substrat nach 40 Minuten bestimmt, ein Zeitpunkt, bei dem die Kinase in Abwesenheit des Peptids seine maximale Transferleistung erreicht hat und in Bezug gesetzt zur Kinaseaktivität in Abwesenheit des Peptids. Bei der Auswertung wurde die Kinaseaktivität ohne Inhibitor gleich 100 % gesetzt. Aus der Auftragung der Kinaseaktivität gegen die Peptidkonzentration wurde ein IC₅₀ von 1,80 µM bestimmt.

9.21 Sequenzen der Generierten Kinasekonstrukte

```
>Aminosäuresequenz von GST-IGF-1RKDdeltaC
MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDG
DKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKTQSMIIRYIA
DKHNMLGGCPKERAISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSK
DFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTH
PDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIQ
IDKYLKSSKYIAWPLQGQWQATFGGGDHPPKSDLVPR
GSAMRKRNNRSLGNGVLYASVNPEYFSAADVVPDE
WEVAREKITMSRELGQGSFGMVYEGVAKGVVKDEP
ETRVAIKTVNEAASMRERIEFLNEASVMKEFNCHHV
RLLGVVSQGGQPTLVIMELMTRGDLKSYLRSLRPEME
NNPVLAPPSLSKMIQMAGEIADGMAYLNANKFVHRDL
AARNCMVAEDFTVKIGDFGMTRDIYETDYRKGKGGK
LLPVRWMSPELKDGVFTTYSVWVSFGVVLWEIATL
AEQPYQGLSNEQVLRVMEGGLLDKPDNCPDMLFEL
MRMCWQYNPKMRPSFLEIISIKKEEMEPGFREVSFY
SEENK
```

Abbildung 9.21.1: Aminosäuresequenz der GST-IGFΔC.

Die Sequenz des GST ist in grün, die der Kinase in blau dargestellt.

```
>Aminosäuresequenz von pAc-G2T-IGF-dC-E1069K
MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERD
EGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKTQSMII
RYIADKHMLGGCPKERAISMLEGAVLDIRYGVS
RIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYL
NGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLV
FKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGQWQATFGGGD
HPPKSDLVPRGSAMRKRNNRSLGNGVLYASVNPE
YFSAADVVPDEWEVAREKITMSRELGQGSFGMV
YEGVAKGVVKDEPETRVAIKTVNEAASMRERIEFLN
EASVMKEFNCHHVRLGVVSQGGQPTLVIMELMTR
GDLKSYLRSLRPEMKNNPVLAPPSLSKMIQMAGEI
ADGMAYLNANKFVHRDLAARNCMVAEDFTVKIGDF
GMTRDIYETDYRKGKGLLPVRWMSPELKDGV
FTTYSVWVSFGVVLWEIATLAEQPYQGLSNEQVLR
FVMEGGLLDKPDNCPDMLFELMRMCWQYNPKMR
PSFLEIISIKKEEMEPGFREVSFYSEENK
```

Abbildung 9.21.2: Aminosäuresequenz der GST-IGFΔC-E1069K.

Die Sequenz des GST ist in grün, die der Kinase in blau dargestellt. Die Mutation E1069K ist in rot hervorgehoben.

>Aminosäuresequenz von pAc-G2T-IGF-dC-E1067/1069K
MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGD
KWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKTQSMARIYADKH
NMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSRVIAYSKDFETLK
VDFLSKLPPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYD
ALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSK
YIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSAMRKRNN
RLGNGVLYASVNPEYFSAADVVPDEWEVAREKITMSR
ELGQGSFGMVYEGVAKGVVKDEPETRVAIKTVNEAASM
RERIEFLNEASVMKEFNCHHVRLGQVVSQGGPTLVIME
LMTRGDLKSYLRSLRPKMKNNPVLAPPSLSKMIQMAGEI
ADGMAYLNANKFVHRDLAARNCMVAEDFTVKIGDFGMT
RDIYETDYRKGKGLLPVRWMSPELKDGVFTTYSV
WSFGVVLWEIATLAEQPYQGLSNEQVLRVMEGGLLDK
PDNCPDMLFELMRMCWQYNPKMRPSFLEIISIKKEEME
PGFREVSFYSEENK

Abbildung 9.22.1: Aminosäuresequenz der GST-IGFAC-E1067/1069K.
Die Sequenz des GST ist in grün, die der Kinase in blau dargestellt. Die Mutationen E1067K und E1069K sind in rot hervorgehoben.

>Aminosäuresequenz von pVL1393 -IGF-dC
MRKRNNRLGNGVLYASVNPEYFSAADVVPDEWE
VAREKITMSRELGQGSFGMVYEGVAKGVVKDEPET
RVAIKTVNEAASMRERIEFLNEASVMKEFNCHHVRL
LGVVSQGGPTLVIMELMTRGDLKSYLRSLRPEMENN
PVLAPPSLSKMIQMAGEIADGMAYLNANKFVHRDLA
ARNCMVAEDFTVKIGDFGMTRDIYETDYRKGKGL
LPVRWMSPELKDGVFTTYSVWSFGVVLWEIATLA
EQPYQGLSNEQVLRVMEGGLLDKPDNCPDMLFEL
MRMCWQYNPKMRPSFLEIISIKKEEMEPGFREVS
FYSEENK

Abbildung 9.22.2: Aminosäuresequenz der IGFAC.
Die Kinasesequenz ist in blau dargestellt.

9.22 Sequenz des modifizierten Pet-21a(+)-Expressionsvektors

T7-Promotor lac-Operator Start

001 AATACGACTC ACTATAGGGG AATTGTGAGC GGATAACAAT TCCCCTCTAG AAATAATTTT GTTTAACTTT AAGAAGGAGA TATACATAAT

(His-Tag) Tyrtide 10 20

091 GCACCATCAT CACCATCATC ATATGCCTGC CTACCCACCA GGAGGTGGCA GTGGAGGCCG ACTGCCGGGA CACAGGCACT CCGCCTTCGT

(Tyrtide) 30 40 50

181 GCCACCCGCG TCCTACCCAG AGGAGGGTCT GGAAATGCAC CCCTTGGAGC GTCGGGGGGG GCACCACCGC CCAGACAGCT CCACCCCTCA

(Tyrtide) 60 70 TEV-Site

271 CACGGATGAT GGCTACATGC CCATGTCCCC AGGGGTGGCC CCAGTGCCCA GTGGCCGAAA GGGCAGTGA GACCTCGAGG GATCGGAGAA

(TEV-Site) Cloning Site 2 reaktives Cystein STOP

361 TCTTTATTTT CAGGGGGGAT CCGAGCTCCG GAATTCCTCAT TGTCAAAGAG AATGATAATT CTTCGAGCAC CACCACCACC ACCACT

BamHI SacI EcoRI

Abbildung 9.22.3: Teilsequenz des E.coli Expressionsvektors Pet21a(+)-NtHis-TS-Tyrtide-CtCys.
Die zu exprimierenden Peptide werden über einen Linker in die Cloning Site 1 zwischen BamHI und EcoRI kloniert.

9.23 Sequenzen der Fusionspeptide

```
>Aminosäuresequenz von pET-21a(+)-mod-Nt-His-Tyrtide
-TS-IGF-NTK1-rCys
MHHHHHHHMPAYPPGGGSGGRLPGHRHSAFVPTRSYPEEG
LEMHPLERRGGHHRPDSSTLHTDDGYMPMSPGVAPVPSGR
KGSGDLEGSENLYFQGGSTQWLPALLEHPMNSHCQRE
```

Abbildung 9.23.1: Aminosäuresequenz für das Fusionspeptid His-Tyrtide-TS-IGF-NT K1-Cys.
Die Tyrtide-Sequenz ist in blau, die Sequenz des Peptids in rot und der His-Tag in grün dargestellt. Das reaktive Cystein ist in rosa hervorgehoben.

```
>Aminosäuresequenz von pET-21a(+)-mod-Nt-His-Tyrtide
-TS-IGF-NT-K3-rCys
MHHHHHHHMPAYPPGGGSGGRLPGHRHSAFVPTRSYPEEG
LEMHPLERRGGHHRPDSSTLHTDDGYMPMSPGVAPVPSGR
KGSGDLEGSENLYFQGGSHLHVHVKFADRQNSHCQRE
```

Abbildung 9.23.2: Aminosäuresequenz für das Fusionspeptid His-Tyrtide-TS-IGF-NT K3-Cys.
Die Tyrtide-Sequenz ist in blau, die Sequenz des Peptids in rot und der His-Tag in grün dargestellt. Das reaktive Cystein ist in rosa hervorgehoben.

```
>Aminosäuresequenz von pET-21a(+)-mod-Nt-His-Tyrtide
-TS-Kontrollpeptid-Cys
MHHHHHHHMPAYPPGGGSGGRLPGHRHSAFVPTRSYPEEG
LEMHPLERRGGHHRPDSSTLHTDDGYMPMSPGVAPVPSGR
KGSGDLEGSENLYFQGGSRLLIGNLRFYASGFKNSHCQRE
```

Abbildung 9.23.3: Aminosäuresequenz für das Fusionspeptid His-Tyrtide-TS-Kontrollpeptid-Cys.
Die Tyrtide-Sequenz ist in blau, die Sequenz des Peptids in rot und der His-Tag in grün dargestellt. Das reaktive Cystein ist in rosa hervorgehoben.

```
>Aminosäuresequenz von pET-mod-Nt-His-Tyrtide-TS- $\alpha$ D-
Peptid-rCys
MHHHHHHHMPAYPPGGGSGGRLPGHRHSAFVPTRSYPEEG
LEMHPLERRGGHHRPDSSTLHTDDGYMPMSPGVAPVPSGR
KGSGDLEGSENLYFQGGSLKSYLRSLRPEAENNSHCQRE
```

Abbildung 9.23.4: Aminosäuresequenz für das Fusionspeptid His-Tyrtide-TS- α D-Peptid-Cys.
Die Tyrtide-Sequenz ist in blau, die Sequenz des Peptids in rot und der His-Tag in grün dargestellt. Das reaktive Cystein ist in rosa hervorgehoben.

>Aminosäuresequenz von pET-21a(+)-mod-Nt-His-Tyrtide
 -TS-aD-peptid K2-Cys
 MHHHHHHMPAYPPGGSGGRLPGHRHSAFVPTRSYP EEG
 LEMHPLERRGGHHRPDSSTLHTDDGYMPMSPGVAPVPSGR
 KGSGDLEGS ENLYFQGGSHSALRPPASAAPNSHCQRE

Abbildung 9.23.5: Aminosäuresequenz für das Fusionspeptid His-Tyrtide-TS- α D-Peptid K2-Cys.
 Die Tyrtide-Sequenz ist in blau, die Sequenz des Peptids in rot und der His-Tag in grün dargestellt. Das reaktive Cystein ist in rosa hervorgehoben.

>Aminosäuresequenz von pET-21a(+)-mod-Nt-His-Tyrtide
 -aD-Peptid-K3-Cys
 MHHHHHHMPAYPPGGSGGRLPGHRHSAFVPTRSYP EEG
 LEMHPLERRGGHHRPDSSTLHTDDGYMPMSPGVAPVPSGR
 KGSGDLEGS ENLYFQGGSTPTPDNSVFAASGNSHCQRE

Abbildung 9.24.1: Aminosäuresequenz für das Fusionspeptid His-Tyrtide-TS- α D-Peptid K3-Cys.
 Die Tyrtide-Sequenz ist in blau, die Sequenz des Peptids in rot und der His-Tag in grün dargestellt. Das reaktive Cystein ist in rosa hervorgehoben.

9.24 Sequenzierungsdaten der isolierten Phagen-DNA des Phage Displays gegen GST-IR-NT

>Aminosäuresequenz von IR-NT K1
 SSKPLPLLPSFRCCLSLLRVTIPQKRPLTPCKPQRPNISVMR
 GRWLLSLSAQLSVSSCLRNSPRKQADKPIQLKAPFGAFFLE
 IFNVKLLFAIPLVVPFYSHSTQWLP S LLEHPMGGGSAETV
 ESCLAKSHTENSLQRRSA?

Abbildung 9.24.2: Sequenzierungsdaten für den Phagen Klon IR-NT K1.
 Die erhaltene DNA-Sequenz wurde in die Aminosäuresequenz transformiert. Dargestellt ist der Einbuchstabencode. Die 12mer Peptidsequenz ist in rot hervorgehoben.

>Aminosäuresequenz von IR-NT K2
 KSLSSKPLPLLPSFRCCLSLLRVTIPQKRPLTPCKPQRPNIS
 VMRGRWLLSLSAQLSVSSCLRNSPRKQADKPIQLKAPF
 GAFFLEIFNVKLLFAIPLVVPFYSHSEHWYDGP MTRPSGG
 GSAETVESCLAKSHTENSLQLEA

Abbildung 9.24.3: Sequenzierungsdaten für die Phagen Klone IR-NT K2-10.
 Die erhaltene DNA-Sequenz wurde in die Aminosäuresequenz transformiert. Dargestellt ist der Einbuchstabencode. Die 12mer Peptidsequenz ist in rot hervorgehoben.

9.25 Sequenzierungsdaten der isolierten Phagen-DNA des Phage Displays gegen GST-IGF-NT

```
>Aminosäuresequenz IGF-NT K1
CCLSLLRV TIPQKRPLTPCKPQRPNISVMRGRWLLS
LSAQLSVSSCLRNSPRKQADKPIQLKAPFGAFFLEI
FNVKKLLFAIPLVVPFYSHSTQWLPSLLEHPMGGG
SAETVESCLAKSHTENSLQLEA
```

Abbildung 9.25.1: Sequenzierungsdaten für die Phagen Klone IGF-NT K 1; 2; 4-8; 10.
Die erhaltene DNA-Sequenz wurde in die Aminosäuresequenz transformiert. Dargestellt ist der Einbuchstabencode. Die 12mer Peptidsequenz ist in rot hervorgehoben.

```
>Aminosäuresequenz von IGF-NT K3
KSLSSKPLPLPSFRCCCLSLLRV TIPQKRPLTPCKPQR
PNISVMRGRWLLSLSAQLSVSSCLRNSPRKQADKPI
QLKAPFGAFFLEIFNVKKLLFAIPLVVPFYSHSHLHVH
VKFADRQGGGSAETVESCLAKSHTENSLQL
```

Abbildung 9.25.2: Sequenzierungsdaten für den Phagen Klon IGF-NT K 3
Die erhaltene DNA-Sequenz wurde in die Aminosäuresequenz transformiert. Dargestellt ist der Einbuchstabencode. Die 12mer Peptidsequenz ist in rot hervorgehoben.

```
>Aminosäuresequenz von IGF-NT K9
KPLPLPSFRCCCLSLLRV TIPQKRPLTPCKPQRPNISV
MRGRWLLSLSAQLSVSSCLRNSPRKQADKPIQLKAP
FGAFFLEIFNVKKLLFAIPLVVPFYSHSINTYTTQLGFS
LGGGSAETVESCLAKSHTENSLQRRRR
```

Abbildung 9.25.3: Sequenzierungsdaten für den Phagen Klon IGF-NT K 3
Die erhaltene DNA-Sequenz wurde in die Aminosäuresequenz transformiert. Dargestellt ist der Einbuchstabencode. Die 12mer Peptidsequenz ist in rot hervorgehoben.

9.26 Sequenzierungsdaten der isolierten Phagen-DNA des Phage Displays gegen das α D-Peptid

>Aminosäuresequenz von α D-Peptid K2
 LSSKPLPLLPSFRCCLSLLRVTIPQKRPLTPCKPQRPNIS
 VMRGRWLLSLSAQLSVSSCLRNSPRKQADKPIQLKAPF
 GAFFLEIFNVKLLFAIPLVVPFYSHS**HSALRPPASAAPG**
 GGSAETVESCLAKSHTENSFTNVTTN

Abbildung 9.26.1: Sequenzierungsdaten für die Phagen Klone α D-Peptid K 2; 4; 5; 7; 8; 10
 Die erhaltene DNA-Sequenz wurde in die Aminosäuresequenz transformiert. Dargestellt ist der Einbuchstabencode. Die 12mer Peptidsequenz ist in rot hervorgehoben.

>Aminosäuresequenz von α D-Peptid K3
 KPLPLLPSFRCCLSLLRVTIPQKRPLTPCKPQRPNISVMR
 GRWLLSLSAQLSVSSCLRNSPRKQADKPIQLKAPFGAFF
 LEIFNVKLLFAIPLVVPFYSHS**TTPDNSVFAASGGGSA**
 ETVESCLAKSHTENSLLTSEHRPI

Abbildung 9.26.2: Sequenzierungsdaten für die Phagen Klone α D-Peptid K 3 und 9.
 Die erhaltene DNA-Sequenz wurde in die Aminosäuresequenz transformiert. Dargestellt ist der Einbuchstabencode. Die 12mer Peptidsequenz ist in rot hervorgehoben.

>Aminosäuresequenz von α D-Peptid K6
 GGGSSSGRELPA TLSDRIFRLGRGRGLLSLSLQLSLSSC
 LRNPRKQADKPIQLKAPFGAFFLEIFNVKLLFAIPLVVPF
 YSHS**NIWINILPTKPW**GGGSAETVESCLAKSHTENSFTN
 VKTAP

Abbildung 9.26.3: Sequenzierungsdaten für den Phagen Klone α D-Peptid K6.
 Die erhaltene DNA-Sequenz wurde in die Aminosäuresequenz transformiert. Dargestellt ist der Einbuchstabencode. Die 12mer Peptidsequenz ist in rot hervorgehoben.

Erklärung gemäß der Promotionsordnung (§4 Abs.1 Nr. 9)

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem 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 – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – 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.

Dörthe Wirtz

Teilpublikationen:

Es liegen keine Teilpublikationen vor.

Kongresse und Seminarbeiträge:

- **European BioPerspectives Köln, Mai 2007**
Posterpräsentation: „Structure-based development of non-ATP or substrate competitive peptide kinase inhibitors.“
- **DIFE-Symposium *Genetics and Pathophysiology of Type 2 Diabetes*, Februar 2008;**
Posterpräsentation: „Structure-based development of non-ATP or substrate competitive peptide kinase inhibitors.“