

Aktivierungsanalysen
der monomeren, dimeren und heteromeren
Kinasen des Insulinrezeptors

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Julia Wassermann
aus Köln

2009

Berichterstatter: Prof. Dr. H. W. Klein (1.Gutachter)
Prof. Dr. S. Waffenschmidt (2.Gutachter)
Prof. Dr. K. Schnetz (Prüfungsvorsitz)

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2009

Meiner Familie

Die im folgenden dokumentierte Arbeit wurde in der Zeit vom
01.12.2004 bis zum 7. Mai 2009
am Institut für Biochemie der Universität zu Köln
unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. W. Klein durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	1
1.1 Abstract.....	3
2 Einleitung.....	5
2.1 Rezeptortyrosinkinasen und deren Topologie.....	5
2.2 Der Insulinrezeptor.....	7
2.3 Bedeutung der Tyrosinphosphorylierungsstellen der Aktivierungsschleife der Insulinrezeptorkinase.....	9
2.4 Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen.....	10
2.5 Autoinhibition der Tyrosinrezeptorkinasen.....	14
2.6 Bedeutung der Dimerisierung.....	17
2.7 Pseudokinasen und Dimerisierung mit katalytisch inaktiven Kinasemutanten.....	19
3 Fragestellung.....	22
4 Ergebnisse.....	24
4.1 Generierung, Expression und Reinigung mutierter Insulinrezeptorkinasen.....	24
4.1.1 Überblick über die IRKD-Konstrukte	24
4.1.2 Generierung der GST-TEV-IRKD-Kinasekonstrukte.....	25
4.1.3 Expression und Reinigung der GST-TEV-IRKD-Konstrukte.....	26
4.1.4 Generierung der C-terminal deletierten Varianten der GST-TEV-IRKD-Kinasekonstrukte.....	27
4.1.5 Expression und Reinigung der der GST-TEV-IRKD Δ C-Kinasekonstrukte.....	28
4.1.6 Proteolytische Spaltung der GST-TEV-IRKD-Kinasekonstrukte.....	29
4.2 Charakterisierung der generierte Kinasekonstrukte.....	31
4.2.1 Autophosphorylierung der GST-TEV- IRKD-Konstrukte.....	31
4.2.2 Substratphosphorylierung durch GST-TEV-IRKD-Konstrukte.....	35
4.2.3 Autophosphorylierung der GST-TEV-IRKD Δ C-Konstrukte.....	37
4.2.4 Autophosphorylierung der monomeren IRKD Δ CT-Konstrukte.....	41
4.2.5 Substratphosphorylierung durch GST-TEV-IRKD Δ CT-Konstrukte.....	45
4.2.6 Immunologische Nachweis einer Vorphosphorylierung.....	49
4.2.7 Interaktionsstudien der GST-TEV-IRKD Δ CT-Konstrukte mit der SH2-Domäne.....	50
4.2.8 Identifizierung der Phosphorylierungsstellen der GST-TEV-IRKD Δ CT-Kinasekonstrukte durch Phosphopeptidkartierung (Peptid Map).....	52
4.3 Generierung, Expression und Reinigung von Heterodimeren der Insulinrezeptorkinase-Konstrukte.....	56
4.3.1 Verwendete Kinasekonstrukte.....	56
4.3.2 Strategie des „Doppeltags“.....	58
4.3.3 Expression und Reinigung der Hybride.....	60
4.3.4 Immunologischer Nachweis einer Vorphosphorylierung.....	64
4.3.5 Dephosphorylierung der Hybride.....	65
4.3.6 Proteolytische Spaltung der Hybride.....	67
4.4 Charakterisierung der Hybride.....	69
4.4.1 Untersuchungen des Einflusses der TEV-Schnittstelle auf die katalytische Aktivität der Hybride.....	69
4.4.2 Autophosphorylierung der Hybride.....	73
4.4.3 Substratphosphorylierung durch die Hybride.....	79

4.4.4 Identifizierung der Phosphorylierungsstellen der Hybride durch Phosphopeptidkartierung (Peptide Map).....	86
5 Diskussion.....	93
5.1 Generierung, Expression und Reinigung von Homo - und Heterodimeren - Kinasekonstrukte.....	94
5.1.1 Darstellung der Kinasekonstrukte.....	94
5.1.2 Untersuchungen zur Vorphosphorylierung der Kinasekonstrukte.....	95
5.2 Auswirkungen der Substitutionen.....	96
5.2.1 Charakterisierung der Kinasekonstrukte in der Autophosphorylierung.....	98
5.2.2 Charakterisierung der Kinasekonstrukte in der Substratphosphorylierung.....	102
5.2.3 Identifizierung der Phosphorylierungsstellen der GST-Kinasen und Hybride.....	107
5.3 Zusammenfassung und Ausblick.....	111
6 Material und Methoden.....	114
6.1 Material.....	114
6.1.1 Bakterienstämme, Viren, Kulturmedien und – Zusätze.....	114
6.1.2 Chemikalien.....	114
6.1.3 Chromatographiematerial.....	116
6.1.4 Kit-Systeme.....	116
6.1.5 Laborgeräte.....	117
6.1.6 Molekulargewichts- und Längenstandards.....	119
6.1.7 Nukleinsäuren.....	119
6.1.7.1 Plasmidvektoren.....	119
6.1.7.2 Oligonukleotide.....	119
6.1.7.3 Mutageneseprimer zur Generierung der GST-TEV-IRKD-Konstrukte.....	119
6.1.7.4 Mutageneseprimer zur Generierung der GST-TEV-IRKDAC-Konstrukte.....	119
6.1.7.5 Sequenzierungsprimer.....	119
6.1.8 Proteine.....	120
6.1.8.1 Antikörper.....	120
6.1.8.2 DNA-modifizierende Enzyme und zugehörige Puffer.....	120
6.1.9 Restriktionsenzyme und zugehörige Puffer.....	120
6.1.10 Proteasen.....	120
6.1.11 Puffer und Lösungen.....	120
6.1.12 Verbrauchsmaterial.....	124
6.1.13 EDV und Software.....	125
6.1.13.1 Datenerfassung.....	125
6.1.14 Molekularbiologische Standardanwendungen.....	125
6.2 Methoden.....	125
6.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	125
6.2.1.1 Bakterienkulturen.....	125
6.2.1.2 DNA-Reinigung, Konzentrationsbestimmung und Anreicherung.....	127
6.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	129
6.2.1.4 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	131
6.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese.....	131
6.2.1.6 Ligation.....	132
6.2.2 Biochemische Methoden.....	132
6.2.2.1 Das Baculovirusexpressionssystem.....	132
6.2.3 Escherichia coli als Expressionssystem.....	136

6.2.3.1 Allgemeines.....	136
6.2.4 Chromatographische Reinigung.....	137
6.2.4.1 Glutathion-Sepharose Affinitätschromatographie.....	137
6.2.4.2 Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie.....	138
6.2.4.3 Konzentrierung der gereinigten Proteine mittels Ultrafiltration.....	139
6.2.5 Charakterisierung von Proteinkonzentration und –Identität.....	139
6.2.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Minamide und Bamberg (1990).....	139
6.2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976).....	139
6.2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; Laemmli, 1970).....	140
6.2.5.4 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE).....	141
6.2.5.5 Färbung von Proteinen in SDS-PAGE-Gelen und nativen Gelen nach Blakesley und Boezi (1977).....	141
6.2.5.6 Reversible Färbung durch Western Blot immobilisierter Proteine (Ponceau-Färbung).....	141
6.2.6 Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Blot.....	142
6.2.6.1 Elektroblob.....	142
6.2.6.2 Wet-Blot	142
6.2.6.3 Entwicklung von Western Blots bei Verwendung der alkalischen Phosphatase.	142
6.2.7 Trocknung von Polyacrylamidgelen.....	143
6.2.8 Densitometrische Analyse von Proteinmengen in Polyacrylamidgelen.....	144
6.2.9 Substratphosphorylierung.....	144
6.2.9.1 Bestimmung des Phosphateinbaus.....	144
6.2.10 Phosphoaminosäure- und Nukleotidanalyse.....	145
6.2.10.1 Tryptische Spaltung von Proteinen im SDS-Gel.....	145
6.2.10.2 HPLC-Analyse tryptischer Peptide (Phosphopeptidkartierung).....	146
6.2.11 Phosphoaminosäureanalyse über Eindimensionale Elektrophorese auf Zellulose (Boyle et al. 1991).....	147
6.2.11.1 Phospho-Imager-Auswertung.....	147
7 Literaturverzeichnis.....	148
8 Anhang.....	155
8.1 Überblick über die Aminosäuresequenzen der verwendeten Kinasekonstrukte.....	155
8.2 Charakterisierung der GST-TEV-IRKD-Kinasekonstrukte.....	160
8.3 Charakterisierung der GST-TEV-IRKDDACT-Kinasekonstrukte.....	162
8.4 Charakterisierung der Hybride.....	163

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau einer Kinasedomäne einer Proteinkinase nach Kornev (2006).....	6
Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau des Insulinrezeptors.	8
Abbildung 2.3: Vergleich der Position der Aktivierungsschleifen in der unphosphorylierten und trisphosphorylierten Insulinrezeptorkinase (nach Hubbard, 1997).	15
Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Aktivierung des IR durch Insulin-Bindung (modifiziert nach Ottensmeyer et al. (2000)).....	18
Abbildung 4.1: Reinigungsverlauf der GST-TEV-IRKDY1150F (12% SDS-PAGE).....	26
Abbildung 4.2: Reinigung der GST-TEV-IRKD Δ CY1146F (12 % SDS-PAGE).....	28
Abbildung 4.3: Proteolytische Spaltung von GST-TEV-IRKDY Δ C1151F, dokumentiert auf 12% SDS-PAGE.....	29
Abbildung 4.4: Proteolytische Spaltung von GST-TEV-IRKDY1151F, dokumentiert auf 12% SDS-PAGE.....	30
Abbildung 4.5: Graphische Darstellung der zeitabhängigen Autophosphorylierung der GST-TEV-IRKD-Konstrukte.....	32
Abbildung 4.6: Graphische Darstellung zur Ermittlung von Initialgeschwindigkeiten der einzelnen Vollängenkinasekonstrukte.....	33
Abbildung 4.7: Phosphoaminosäureanalyse der GST-TEV-IRKD-Konstrukte.....	34
Abbildung 4.8: Substratphosphorylierung von Tyrtide durch Vollängenkinasekonstrukte... ..	36
Abbildung 4.9: Graphische Auswertung der zeitabhängigen Autophosphorylierung von GST-TEV-IRKD Δ C-Konstrukten.....	38
Abbildung 4.10: Graphische Darstellung zur Ermittlung von Initialgeschwindigkeiten der einzelner GST-TEV-IRKD Δ C-Konstrukte.....	39
Abbildung 4.11: Phosphoaminosäureanalyse der GST-TEV-IRKD Δ CT-Konstrukte.....	40
Abbildung 4.12: Autophosphorylierung der IRKD Δ CT-Konstrukte.....	42
Abbildung 4.13: Autophosphorylierung der IRKD CT-Konstruktenach 45 Minuten.....	42
Abbildung 4.14: Graphische Auswertung der zeitabhängigen Autophosphorylierung von IRKD Δ C-Konstrukten.....	43
Abbildung 4.15: Graphische Darstellung zur Ermittlung von Initialgeschwindigkeiten der einzelner IRKD Δ C-Konstrukte.....	44
Abbildung 4.16: Substratphosphorylierung von Tyrtide durch GST-TEV-IRKD Δ CT-Konstrukte (native Gele).....	46
Abbildung 4.17: Ermittlung der spezifischen Aktivität der GST-TEV-IRKD Δ CT-Konstrukte für Tyrtide und PolyGlyTyr.....	48
Abbildung 4.18: immunologischer Nachweis einer Vorphosphorylierung der GST-TEV-IRKD Δ CT-Kinasen.....	49
Abbildung 4.19: Interaktionsstudien der GST-TEV-IRKD Δ CT-Konstrukte mit der SH2-Domäne.....	51
Abbildung 4.20: Phosphopeptidkartierung der GST-TEV-IRKD Δ CTWT.....	53
Abbildung 4.21: Phosphopeptidkartierung der GST-TEV-IRKD Δ CT- Kinasemutanten.....	54
Abbildung 4.22: schematische Darstellung der verwendeten Hybridkonstrukte.....	57
Abbildung 4.23: Schematische Darstellung der Ni-NTA-Affinitätschromatographie.....	59
Abbildung 4.24: Reinigungsverlauf der Hybride über Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Exemplarisch dargestellt für Hybrid WT. (12% SDS-Gele).....	61

Abbildung 4.25: Reinigungsverlauf der Hybride über GSH-Affinitätschromatographie. Exemplarisch dargestellt für Hybrid WT. (12% SDS-Gel).....	63
Abbildung 4.26: immunologischer Nachweis der Vorphosphorylierung der Hybrid-Mutanten.	65
Abbildung 4.27: Immunologischer Nachweis von Phosphotyrosin nach Dephosphorylierung mit ADP.....	66
Abbildung 4.28: Immunologischer Nachweis von Phosphotyrosin nach Dephosphorylierung mit der alkalischen Phosphatase.....	67
Abbildung 4.29: Proteolytische Spaltung der Hybride mit der TEV-Protease.....	68
Abbildung 4.30: Graphische Darstellung der Autophosphorylierung von Hybrid WT und "Hybrid Herweg".....	70
Abbildung 4.31: Substratphosphorylierung von Tyrtide durch Hybrid WT und "Hybrid Herweg".....	72
Abbildung 4.32: Autophosphorylierung der Hybride.....	73
Abbildung 4.33: Graphische Darstellung der Autophosphorylierung der Hybride.....	75
Abbildung 4.34: Graphische Darstellung der Autophosphorylierung der Hybride. Vergleich der Hybride untereinander.....	77
Abbildung 4.35: Graphische Darstellung der Autophosphorylierung der Hybride im Vergleich zu den Referenzkinasen.....	79
Abbildung 4.36: Substratphosphorylierung von Tyrtide durch Hybride, GST- und monomere Kinasen.....	80
Abbildung 4.37: Substratphosphorylierung von Tyrtide durch 2µM Hybrid und 1µM Kinase.	81
Abbildung 4.38: Substratphosphorylierung von Tyrtide durch vorphosphorylierte Hybride..	82
Abbildung 4.39: Tyrtidephosphorylierung durch die Hybride. KM- Abhängigkeit für Tyrtide.	83
Abbildung 4.40: Graphische Auswertung der quantitativen Substratphosphorylierung von Tyrtide und PolyGlyTyr durch die Hybride.....	85
Abbildung 4.41: Phosphopeptidkartierung. Vergleich Hybrid WT mit "Hybrid Herweg".....	87
Abbildung 4.42: Phosphopeptidkartierung des Hybrids WT im Vergleich mit GST-TEV-IRKΔACT WT.....	88
Abbildung 4.43: Phosphopeptidkartierung des Hybrids Y1146F im Vergleich mit der GST-TEV-IRKΔACT Y1146F.....	89
Abbildung 4.44: Phosphopeptidkartierung des Hybrids Y1150F im Vergleich mit der GST-TEV-IRKΔACTY1150F.....	90
Abbildung 4.45: Phosphopeptidkartierung des Hybrids Y1151F im Vergleich mit der GST-TEV-IRKΔACTY1151F.....	91
Abbildung 8.1: Sequenz der GST-TEV-IRKΔACTWT.....	155
Abbildung 8.2: Sequenz der GST-TEV-IRKΔACTY1146F.....	155
Abbildung 8.3: Sequenz der GST-TEV-IRKΔACTY1151F.....	156
Abbildung 8.4: Sequenz der GST-TEV-IRKΔACTY1150F.....	156
Abbildung 8.5: Sequenz der GST-TEV-IRK D→A-His.....	157
Abbildung 8.6: Sequenz der GST-TEV-IRKDW.....	157
Abbildung 8.7: Sequenz der GST-TEV-IRKDY1146F.....	158
Abbildung 8.8: Sequenz der GST-TEV-IRKDY1150F.....	158
Abbildung 8.9: Sequenz der GST-TEV-IRKDY1151F.....	159
Abbildung 8.10: Autophosphorylierung der monomeren IRKΔ-Konstrukte.....	160

Abbildung 8.11: Graphische Auswertung des Paperassays für PolyGlyTyr, phosphoryliert durch die GST-TEV-IRKD-Kinasekonstrukte.....	161
Abbildung 8.12: Substratphosphorylierung von Tyrtide durch vorphosphorylierte GST-TEV-IRK Δ CTWT und GST-TEV-IRK Δ CT Y1151F.....	162
Abbildung 8.13: Phosphopeptidkartierung der GST-TEV-IRK Δ CT-Kinasevarianten.....	162
Abbildung 8.14: Dokumentation der GSH-Affinitätschromatographie des Ni-NTA-Durchlaufs.....	163
Abbildung 8.15: Immunologischer Nachweis der Reinigungstags.....	163
Abbildung 8.16: Phosphopeptidkartierung des Hybrids WT. (5min).....	164
Abbildung 8.17: Phosphopeptidkartierung des Hybrids Y1146F. (5min).....	164
Abbildung 8.18: Phosphopeptidkartierung des Hybrids Y1150F. (5min).....	165
Abbildung 8.19: Phosphopeptidkartierung des Hybrids Y1151F. (5min).....	165
Abbildung 8.20: Graphische Darstellung der Autophosphorylierung des Hybrids WT und 1:1Mix.....	166

Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1: Überblick über die untersuchten Insulinrezeptorkinasen.....	25
Tabelle 4.2: Dokumentation der Ausbeuten der GST-TEV-IRKD-Konstrukte	26
Tabelle 4.3: Dokumentation der Ausbeuten nach Reinigung von GST-TEV-IRKDAC-Konstrukte.....	28
Tabelle 4.4: Phosphateinbau und Initialgeschwindigkeiten der Vollängenkinase-Konstrukten	32
Tabelle 4.5: Phosphoaminosäurezusammensetzung der GST-TEV-IRKD-Konstrukte.....	35
Tabelle 4.6: Phosphateinbau und Initialgeschwindigkeiten der GST-TEV-IRKDAC - Konstrukte.....	39
Tabelle 4.7: Phosphoaminosäurezusammensetzung der GST-TEV-IRKDAC-Konstrukte.	40
Tabelle 4.8: Phosphateinbau und Initialgeschwindigkeiten der IRKDAC - Konstrukte.....	45
Tabelle 4.9: Spezifische Aktivität der GST-TEV-IRKDAC-Kinasen in der Substratphosphorylierung von Tyrtide und PolyGlyTyr.....	48
Tabelle 4.10: Dokumentation der Reinigung der Hybride.....	63
Tabelle 4.11: Phosphateinbau und Initialgeschwindigkeiten des HybridsWT und "Hybrids Herweg".....	71
Tabelle 4.12: Phosphateinbau und Initialgeschwindigkeiten der Hybride unter Berücksichtigung der Untereinheiten.	77
Tabelle 4.13: Phosphateinbau und Initialgeschwindigkeiten der Hybride.....	78
Tabelle 4.14: Phosphateinbau und Initialgeschwindigkeiten der Kinasen.....	78
Tabelle 4.15: Spezifische Aktivitäten der Hybride in der Substratphosphorylierung von Tyrtide und PolyGlyTyr.....	85
Tabelle 6.1: Trennbereich von Agarosegelen in Abhängigkeit von ihrer Konzentration.....	131
Tabelle 6.2: Zusammensetzung der verschiedenen Trenngele.....	140
Tabelle 6.3: Zusammensetzung der verschiedenen Sammelgele.....	140
Tabelle 6.4: Zusammensetzung der Gele für die native PAGE.....	141
Tabelle 6.5: Übersicht der verwendeten Antikörper	143
Tabelle 8.1: Spezifische Aktivität der GST-TEV-IRKD-Konstrukte in der Substratphosphorylierung von PolyGlyTyr.....	161

Abkürzungsverzeichnis

#	Nummer	bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius		
μCi	Mikrocurie	C	
μg	Mikrogramm	C	Cystein
μl	Mikroliter	ca.	Circa
μM	Mikromolar	cDNA	DNA-Kopie der mRNA
		Ci	Curie
A		cpm	counts per minute, Zählimpuls pro Minute
A	Adenin	CT	C-terminale Domäne
A	Alanin	Cys	Cystein
Abb.	Abbildung		
AcNPV	Autographa californica Nuclear Polyhydrosis Virus	D	
ADP	Adenosindiphosphat	D	Aspartat
Ala	Alanin	Da, kDa	Dalton, Kilodalton
AP	alkalische Phosphatase	d.h.	das heißt
APS	Ammoniumpersulfat	DMSO	Dimethylsulfoxid
Arg	Arginin	DNA	Desoxiribonucleinsäure
AS	Aminosäure	DTT	Dithiothreitol
Asn	Asparagin		
Asp	Aspartat	E	
ATP	Adenosintriphosphat	E	Glutamat
		<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
B		EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat	EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure
BSA	Rinderserumalbumin		

Abkürzungsverzeichnis

EGFR	Epidermal growth factor Rezeptor	I	
<i>et al.</i>	<i>et aliter</i>	I	Isoleucin
		Ig	Immunglobulin
E		IGF	Insulin-like growth factor
F	Phenylalanin	IGF-1R	Insulin-like growth factor-1 Rezeptor
FGFR	Fibroblast growth factor Rezeptor	IGF-1RKD	Insulin-like growth factor-1 Rezeptor-Kinasedomäne
FPLC	Fast performance Liquid Chromatography	Ile	Isoleucin
		IR(s)	Insulinrezeptor (Plural)
G		IRKD	Insulinrezeptor-Kinasedomäne
g	1. Erdbeschleunigung: $9,81\text{ms}^{-2}$ 2. Gramm	IRS-1	Insulinrezeptor-Substrat-1
G	Guanin	J	
G	Glycin	JM	Juxtamembran-Domäne
Gln	Glutamin		
Glu	Glutamat	K	
Gly	Glycin	K	Lysin
GSH	Glutathion-Sepharose	Kap.	Kapitel
GST	Glutathion-S-Transferase	KD	Tyrosinkinase-Domäne
H		L	
h	Stunde	L	Leucin
H	Histidin	Leu	Leucin
hIR	humaner Insulinrezeptor	Lys	Lysin
His	Histidin	LIRK	lösliche Insulinrezeptorkinase
His-Tag	Hexa-Histidin-Tag		
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography		

M

Abkürzungsverzeichnis

M	Methionin	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
M	mol/l	PBS	phosphate buffered saline
mA	Milliampere	PDGFR	Platelet-derived growth factor Rezeptor
max.	maximal	PEG	Polyethylenglycol
Met	Methionin	pH	potentium hydrogenii
min	Minute	Phe	Phenylalanin
mind.	mindestens	Pi	anorganisches Phosphat
ml	Milliliter	p.i.	post infection
mm	Millimeter	PL	Poly-L-Lysin
mM	Millimolar	pmol	picomol
MQ	Millipore Wasser	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
M_r	Molekulargewicht	Pro	Prolin
ms	Millisekunde	pS	Phosphoserin
μCi	Mikrocurie	pT	Phosphothreonin
μg	Mikrogramm	PTB	Phosphotyrosinbindende Domäne des IRS-1
μl	Mikroliter	PVDF	Polyvinylidendifluorid
μM	Mikromolar	pY	Phosphotyrosin
<u>N</u>			
N	Asparagin	Q	
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid	Q	Glutamin
Ni-NTA	Nickel-Chelat		
<u>Q</u>		<u>R</u>	
OD	optische Dichte	R	Arginin
		rpm	revolutions per minute
<u>P</u>		RT	Raumtemperatur
P	Prolin	RTK(s)	Rezeptor-Tyrosinkinase(Plural)

Abkürzungsverzeichnis

		UV	Ultraviolett
<u>S</u>			
S	Serin	<u>V</u>	
s.	siehe	V	Valin
s.a.	siehe auch	V	Volt
s.o.	siehe oben	v/v	volume/volume, ml Volumen in 100ml Gesamtvolumen
SDS	Natriumdodecylsulfat		
sec	Sekunde	Val	Valin
Ser	Serin	vgl.	vergleiche
<i>Sf9</i>	Spodoptera frugiperda	<u>W</u>	
sog.	sogenannt	W	Tryptophan
spez.	spezifisch	W	Watt
		w/v	weight/volume, g Substanz in 100 ml Gesamtvolumen
<u>T</u>		WT	Wildtyp
T	Threonin		
Tab.	Tabelle	<u>X</u>	
TBS	Tris Buffered Saline	X	beliebige Aminosäure
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin		
Thr	Threonin	<u>Y</u>	
TM	Transmembran-Domäne	Y	Tyrosin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan		
Trp	Tryptophan		
Tyr	Tyrosin	<u>Z</u>	
Tyrtide	hIRS-1 Peptid	z.B.	zum Beispiel
<u>U</u>			
U	Uracil		
u.a.	unter anderem		
UE	Untereinheit		

1 Zusammenfassung

Dimerisierung führt bei Rezeptortyrosinkinasen (RTK) zur Aktivierung der Kinaseaktivität, die sich in der Autophosphorylierung der Dimere niederschlägt. Nach gängiger Meinung (Schlessinger *et al.* 1988/1989; Lammers *et al.* 1990; Ullrich *et al.* 1990) erfolgt die Phosphorylierung der Dimere in *trans*, d.h. die Untereinheiten phosphorylieren sich gegenseitig. Demnach sind Dimerisierung und *trans*-Autophosphorylierung unentbehrlich für den Aktivierungsprozess. Eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung des Insulinrezeptors (IR) wird den Tyrosinpositionen der Aktivierungsschleife (Y1146, Y1150 und Y1151) zugesprochen (White *et al.*, 1988). Des weiteren phosphoryliert die Insulinrezeptorkinase rezeptoreigene und im Substrat befindliche Serinreste und ist somit eine Kinase mit dualer Spezifität.

In zahlreichen Mutationsanalysen wurde die Rolle der einzelnen Tyrosine für den Aktivierungsprozess des IRs und für die Signaltransduktion kontrovers diskutiert (Tavare *et al.* 1991; Wilden *et al.* 1992; Zhang *et al.* 1991; Dickens und Tavare 1992). Jedoch ergab sich in *in vivo*- und *in vitro*- Untersuchungen kein eindeutiges Bild über die Bedeutung der einzelnen Tyrosinphosphorylierungsstellen. Dies kann an den unterschiedlichen Methoden liegen, die einen Vergleich der verschiedenen Ergebnisse erschweren. Allen Arbeiten ist gemeinsam, dass sich die Substitution aller drei Phosphorylierungsstellen in einer deutlichen Reduktion der Kinaseaktivität äußert (Wilden *et al.* 1992).

Nicht nur die Bedeutung der Phosphorylierungsstellen, sondern auch die Reihenfolge ihrer Besetzung ist umstritten. Die Meinungen reichen von einer zufälligen Besetzung (Tavare und Dickens 1991) bis hin zu einem geordneten Besetzungsmuster (Dickens und Tavare 1992; Wei *et al.* 1995), wobei zwischen zwei möglichen Reihenfolgen unterschieden wird.

Um ein homogenes Reaktionsfeld zur Analyse der zugrunde liegenden Mechanismen zu schaffen, wurden in dieser Arbeit unterschiedliche mutierte Homo- und Heterodimere Kinasekonstrukte des Insulinrezeptors generiert. Alle hergestellten Konstrukte wurden als GST-Fusionsproteine in den *Sf9*-Zellen exprimiert und affinitätschromatographisch gereinigt und in ihrer Aktivität in Auto- und Substratphosphorylierung charakterisiert. Die Untersuchung der verwendeten Kinase-Mutanten führte zu folgenden Ergebnissen:

- ◆ In Autophosphorylierungsreaktionen wiesen alle monomeren, homo- und heterodimeren Kinasekonstrukte katalytische Aktivität auf. Folgende Tendenz konnte verzeichnet werden: WT=Y1151F=Y1146F>Y1150F. Keine der Mutationen in den potentiellen Phosphorylierungsstellen führte demnach zu einer Knockout-Mutante.
- ◆ Ein Vergleich der Hybride mit den zugehörigen homodimeren Referenzkinasen zeigte eine vergleichbare Aktivität der aktiven Untereinheiten im Hybrid und im Homodimer.
- ◆ Die Phosphopeptidkartierung der C-terminal verkürzten Kinasemutanten zeigt die Besetzung aller Tyrosine der Aktivierungsschleife, vergleichbar mit den Hybriden.
- ◆ Es wurden deutliche Unterschiede im Verhalten der einzelnen Mutanten in der Auto- und Substratphosphorylierung verzeichnet. Die Aktivität in der Substratphosphorylierung nahm in der Reihenfolge WT≥Y1146F>Y1150F>Y1151F ab. Die Besetzung der Position Y1151 spielt offenbar eine untergeordnete Rolle für die Autophosphorylierung, scheint jedoch für die Substratphosphorylierung bedeutend zu sein.
- ◆ Alle Kinasekonstrukte mit den Mutationen Y1150F und Y1151F haben die Fähigkeit zur dualen Phosphorylierung weitgehend verloren.

1.1 Abstract

Dimerisation of receptor tyrosine kinases induces their activation, resulting in the autophosphorylation of the dimers. Current theory (Schlessinger *et al.* 1988/ 1989; Lammers *et al.* 1990; Ullrich *et al.* 1990) has it that this autophosphorylation acts in *trans*, that is, the subunits phosphorylate each other. Therefore, both dimerisation and *trans*-autophosphorylation are essential for the activation process. For the activation of the insulin receptor (IR), tyrosine residues located in the activation loop (Y1146, Y1150, and Y1151) are considered to play a key role (White *et al.*, 1988). Furthermore, insulin receptor kinase phosphorylates serine residues in both the receptor itself and its substrates, revealing it to be a kinase with dual specificity.

The roles of the individual tyrosine residues for both IR activation and signal transduction has been discussed controversially, using numerous mutation analyses (Tavare *et al.* 1991; Wilden *et al.* 1992; Zhang *et al.* 1991; Dickens and Tavare 1992). However, neither *in vivo* nor *in vitro* studies yielded conclusive results as to the importance of the individual tyrosine phosphorylation sites. This could be due to the range of different methods employed, which makes comparison of results a challenge. All studies agree on the substitution of all three tyrosine phosphorylation sites leading to a significant reduction in kinase activity.

Not only the importance of the three phosphorylation sites, but also the order of their phosphorylation is subject to debate. Opinions range from random phosphorylation (Tavare and Dickens 1991) to an ordered pattern (Dickens and Tavare 1992; Wei *et al.* 1995), whereby two distinct orders are distinguished.

To generate a homogenous reaction basis for the analysis of the underlying mechanisms, several mutants of homo- and heterodimeric kinase constructs of the insulin receptor were created during this study. All constructs were expressed as GST fusion proteins in *Sf9* cells, purified via affinity chromatography, and characterized for their activity in auto- and substrate phosphorylation. Analysis of these kinase mutants led to the following results:

- ◆ During autophosphorylation, all monomeric, homodimeric, and heterodimeric kinase constructs displayed catalytic activity. The following tendency could be observed:

WT=Y1151F=Y1146F>Y1150F. Therefore, none of the mutations in potential phosphorylation sites resulted in a knock-out mutant.

- ◆ A comparison of the hybrids with the respective homodimeric reference kinase showed a comparable activity of the active subunit in both hybrid and homodimer.
- ◆ Phospho-peptide mapping of the C-terminally shortened kinase mutants revealed phosphorylation of all tyrosine sites in the activation loop comparable to the hybrids.
- ◆ A significant differences were observed between the results of the auto- and substrate phosphorylation. Substrate phosphorylation activity decreased in the order of WT≥Y1146F>Y1150F>Y1151F. Apparently, position Y1151 plays only a subordinate role for autophosphorylation, but has a substantive role during substrate phosphorylation.
- ◆ All kinase constructs with the mutations Y1150F and Y1151F have the ability to dual phosphorylation largely lost.

The mutation analysis of the activation loop shows that the activity of the insulin receptor is determined by an interaction involving all three phosphorylation sites of the activation loop.

2 Einleitung

Rezeptor-Tyrosinkinase (RTKs) sind transmembrane Glykoproteine, die intrazelluläre Signalproteine an spezifischen Tyrosinresten phosphorylieren. Sie gehören zu der Gruppe der Proteinkinase (PKs). PKs nehmen eine Schlüsselfunktion in vielen Prozessen wie Zellwachstum, Differenzierung, Stoffwechsel, Proliferation, Motilität und Überleben von Zellen ein (Hubbard, Miller 2007). Bei der Phosphorylierung durch Kinasen (2% der Gene des humanen Genoms codieren für Kinasen) handelt es sich um die häufigste posttranslationale Modifikation von Proteinen (Rubin *et al.* 2000). Sie katalysieren als Phosphoryltransferasen den reversiblen Transfer des γ -Phosphates eines Nucleosidtriphosphates, in den meisten Fällen Adenosintriphosphat (ATP), auf eine Hydroxylgruppe eines Donorproteins. Etwa ein Drittel aller eukaryotischen Proteine unterliegen der reversiblen Autophosphorylierung, die durch ca. 600 verschiedene Proteinkinase katalysiert wird (Salton 2005). Diese Tatsache unterstreicht die Bedeutung der Phosphorylierung in der Regulation der Signalweiterleitung. Unkontrollierte Phosphorylierung gilt als mögliche Ursache für Immunerkrankungen, Diabetes mellitus oder Krebs (Cohen 2002).

2.1 Rezeptortyrosinkinase und deren Topologie

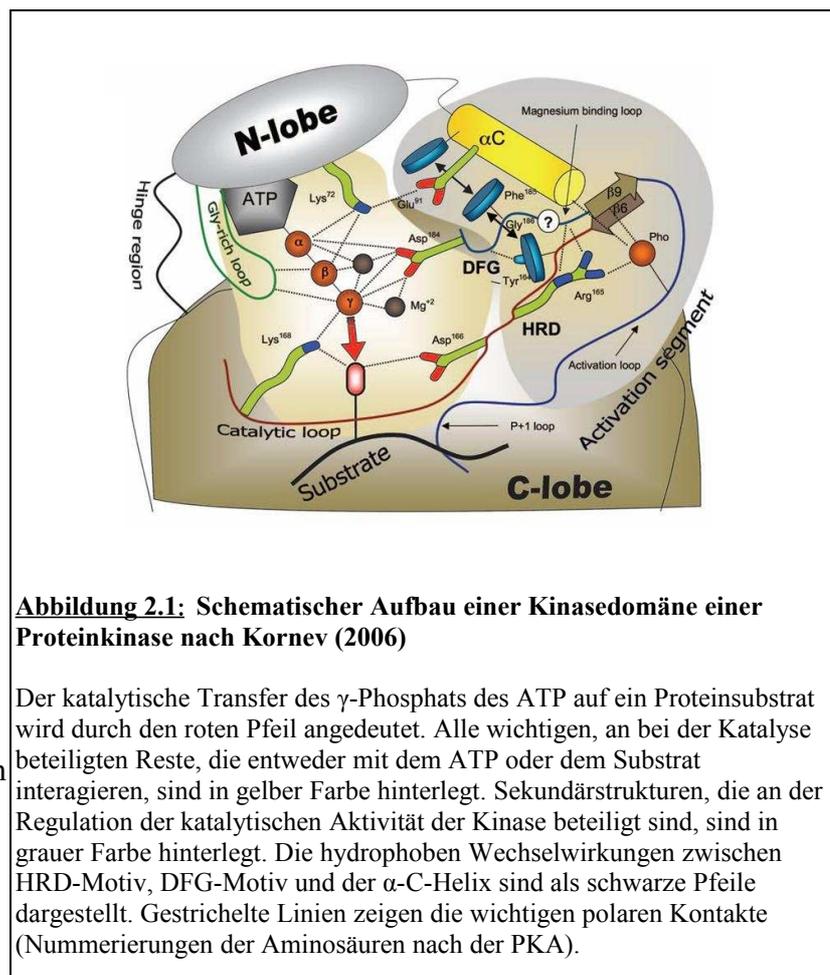
RTKs stellen neben den Serin-/Threoninkinase die größte Enzymfamilie der Proteinkinase dar. Im menschlichen Genom sind 58 verschiedene RTKs bekannt, bei denen die wichtigsten Mitglieder zu den folgenden RTK-Familien gehören (Hubbard *et al.* 2007): die EGFR-Familie (*epidermal growth factor receptor*), die PDGFR-Familie (*platelet-derived growth factor receptor*), die FGFR-Familie (*fibroblast growth factor receptor*), die NGFR-Familie (*nerve growth factor receptor*) und die IR-Familie (*insulin receptor*).

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 und IGFR) existieren dagegen bereits vor Ligandenbindung als kovalente Dimere. Der strukturelle Aufbau dieser Rezeptoren ist sehr ähnlich (Manning *et al.*

2002). Die Hormonbindende extrazelluläre Domäne zeugt von einer großen Variabilität im Aufbau, was die Spezifität der Ligandenbindung gewährleistet. Extrazellulärer und intrazellulärer Bereich werden durch das α -helicale Transmembransegment miteinander verbunden. Der intrazelluläre, zytoplasmatische Bereich wird in eine Juxtamembrandomäne, eine hoch konservierte Kinasedomäne und eine C-terminale Domäne unterteilt. Juxtamembran- und C-terminale Domäne, welche die größte Variabilität im Vergleich mit der Kinasedomäne aufweisen, tragen zur Spezifität für signalweiterleitende Adapterproteine bei.

Die hoch konservierte katalytische Domäne zeigt in ihren Aufbau eine Homologie, die sich allgemein über alle Proteinkinasen erstreckt und einem konservierten Faltungsschema entspricht (Taylor *et al.* 1995; Hanks & Hunter, 1995). Mit der Auflösung der Kristallstruktur der Proteinkinase A, einer Serin-/Threoninkinase, konnte die erste dreidimensionale Struktur einer Proteinkinase vorgestellt werden (Knighton *et al.* 1991, Bossemeyer *et al.* 1993, Zheng *et al.* 1993). Ein typischer

Aufbau einer katalytisch aktiven Kinasedomäne ist in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt (Kornev *et al.* 2006). Ein faltblattreicher N-terminaler Bereich (*N-lobe*) mit der charakteristischen α -C-Helix ist über eine Scharnierregion (*hinge region*) mit dem größeren α -helicalen C-terminalen Bereich verbunden. In der katalytischen Spalte (*catalytic cleft*) zwischen dem N-terminalen und dem C-terminalen Bereich ist das aktive Zentrum lokalisiert. Der N-terminale Bereich



formt eine hydrophobe Tasche, die den Adenin-Ring des ATP bei der Nukleotidbindung aufnimmt. Die glycinreiche Schleife (*Gly-rich loop*, grün) im N-terminalen Bereich, die in den katalytischen Spalt hineinragt, positioniert das γ -Phosphat des ATP für den Phosphattransfer. Ein invariantes Lysin (PKA: Lys⁷² bzw. IR: K^{1018*}) koordiniert die α - und β -Phosphorylgruppen des ATP und geht eine Salzbrücke mit einem hoch konservierten Glutamat (PKA: Glu⁹¹ bzw. IR: E¹⁰³⁵) in der charakteristischen α -C-Helix ein, so dass das γ -Phosphat des ATP optimal für die Katalyse ausgerichtet wird (Huse und Kuriyan, 2002). Im C-terminalen Bereich (*C-lobe*) befindet sich die katalytische Schleife (*catalytic loop*) mit der katalytischen Base Aspartat, gefolgt von einer Substraterkennungssequenz (PKA: LysAlaAlaArgAsn bzw. IR: LAARN). Das Aspartat koordiniert den für die Katalyse essentiellen Kofaktor Mg²⁺.

Das DFG-Motiv der Aktivierungsschleife (*activation loop*, blau) beinhaltet das für die Katalyse sehr wichtige Aspartat (PKA: Asp¹⁸⁴ bzw. IR D¹¹³⁸), das einen Kontakt mit allen drei ATP-Phosphaten eingeht.

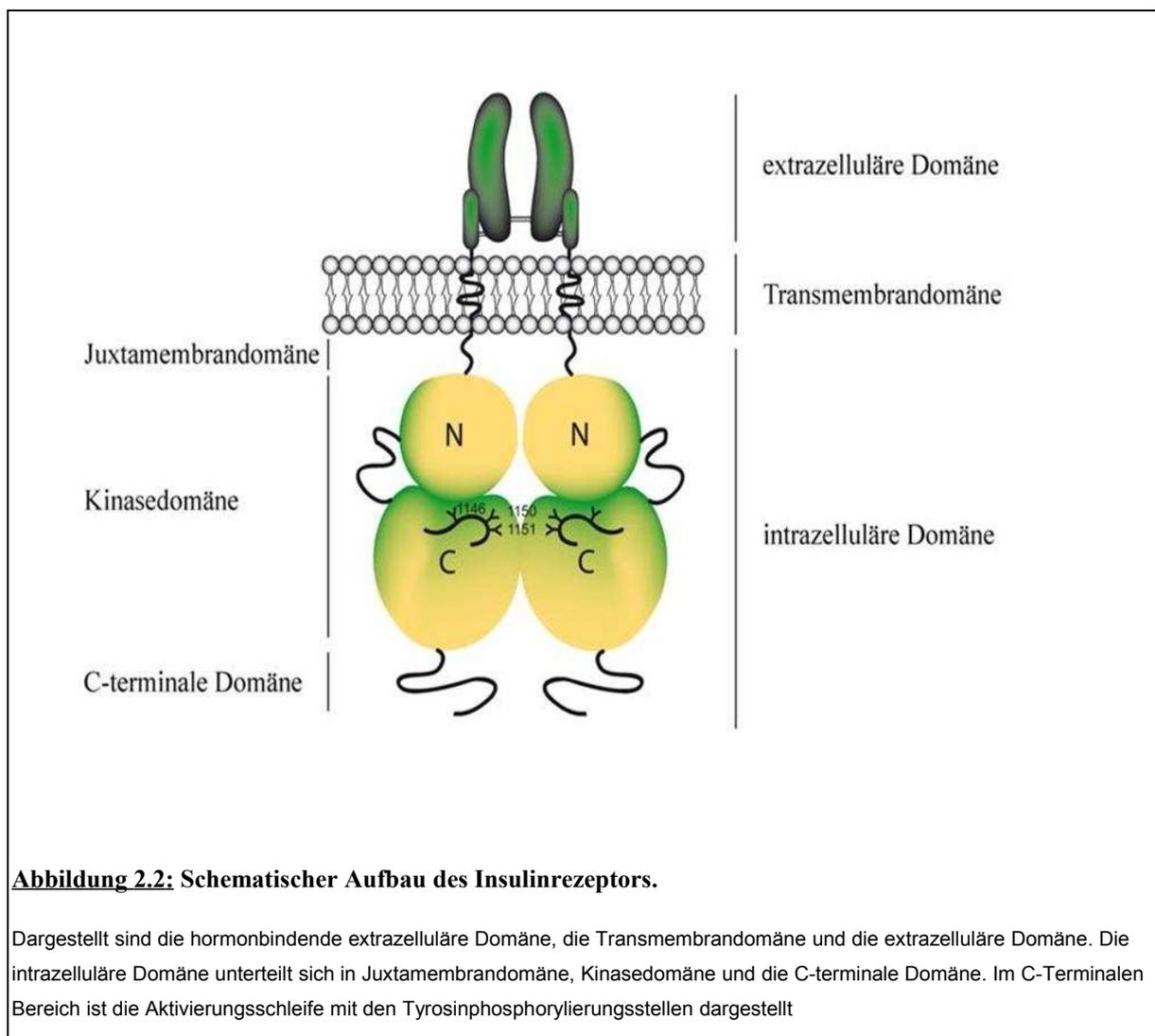
Das Phenylalanin im DFG-Motiv interagiert mit der α -C-Helix zur Stabilisierung der Salzbrücke, sowie mit dem Histidin (PKA: His¹⁶⁴ bzw. IR: H¹¹¹⁸) des benachbarten HRD-Motivs in der katalytischen Schleife (*catalytic loop*, rot). Das Aspartat (PKA: Asp¹⁶⁶ bzw. IR: D¹¹²⁰) ist die am stärksten konservierte Aminosäure des HRD-Motivs. Es koordiniert die Orientierung der Hydroxygruppe des Substrats für den Phosphattransfer. Ein Austausch dieser Aminosäure (D¹¹²⁰→A) gegen Alanin führt zur katalytischen Inaktivität der mutierten Kinase, da das Substrat nicht mehr richtig für den Phosphattransfer koordiniert werden kann (Ge *et al.* 2002).

2.2 Der Insulinrezeptor

Der Insulinrezeptor ist ein typischer Vertreter für Rezeptortyrosinkinasen. Es handelt sich um ein Heterotetramer ($\alpha_2\beta_2$), dessen Monomere sich ihrerseits aus zwei α - und zwei β -Untereinheiten zusammensetzen. Das apparente Molekulargewicht des Holorezeptors in der SDS-PAGE wird mit ca. 400 kDa angegeben, die Molekularmasse der α -Untereinheit beträgt ca. 130 kDa, die der β -Untereinheit ca. 90 kDa (Ullrich *et al.*, 1985). Dieser Komplex wird

durch Disulfidbrücken stabilisiert. Der Rezeptor lässt sich funktionell und morphologisch in drei Bereiche untergliedern (Abbildung 2.2).

Der extrazelluläre Bereich übernimmt die Funktion der Insulinbindung. Den Transmembrananteil bilden 23 Aminosäuren in Form einer α -Helix, die den extrazellulären und den intrazellulären Anteil der α -Untereinheit miteinander verbindet. Der zyttoplasmatische Bereich der β -Untereinheit besteht aus 403 Aminosäuren und kann in eine Juxtamembran-, die Tyrosinkinase- (katalytische) und die C-terminale Domäne unterteilt werden.



Der Insulinrezeptor besitzt sechs potentielle Phosphorylierungsstellen: Tyrosin 960 (Y960) der sich in der Juxtamembrandomäne befindet, Y1146, 1150, 1151 in der

Aktivierungsschleife sowie Y1316 und Y1320 im C-Terminus. Die Phosphorylierung dieser Stellen führt zu Regulation der Kinaseaktivität des Rezeptors.

2.3 Bedeutung der Tyrosinphosphorylierungsstellen der Aktivierungsschleife der Insulinrezeptorkinase

Für die Aktivierung des IRs ist die Autophosphorylierung der Tyrosine Y¹¹⁴⁶, Y¹¹⁵⁰ und Y¹¹⁵¹ der Aktivierungsschleife von essentieller Bedeutung. Hierbei wird jeder Phosphorylierungsstelle eine fest definierte Rolle im Aktivierungsprozess des IR zugesprochen. Die Position 1151 weist die höchste Homologie unter allen Kinasen auf (Hanks und Hunter 1995). Bei Serin-/Threoninkinasen befindet sich an dieser Stelle ein phosphorylierbares Threonin, das für die Regulation der Aktivität eine entscheidende Rolle spielt.

Im inaktiven, unphosphorylierten Zustand bildet das Tyrosin 1150 eine Wasserstoffbrückenbindung zum katalytischen Aspartat (D¹¹²⁰) aus und konkurriert mit potentiellen Proteinsubstraten um die Bindestelle im aktiven Zentrum. Die Autoinhibition wird durch Autophosphorylierung aufgehoben. Jedoch ist es umstritten, ob die autoinhibitorische Rolle des Y¹¹⁵⁰ auch *in vivo* zum Tragen kommt, da das ATP im millimolaren Bereich in der Zelle verfügbar ist.

Im phosphorylierten Zustand wirken sich die Tyrosine der Aktivierungsschleife stabilisierend auf die aktive Struktur aus. Das phosphorylierte Tyrosin (pY¹¹⁵⁰) bildet Wasserstoffbrücken zum Arginin (R¹¹⁶⁴) aus und stabilisiert dadurch die offene Konformation. In dieser Konformation ist die Aktivierungsschleife aus geklappt und das aktive Zentrum für das Substrat und das ATP zugänglich. Darüber hinaus wird die Aktivierungsschleife durch weitere Wasserstoffbrücken zwischen dem phosphorylierten Tyrosin 1151 (pY1151), dem Arginin 1143 (R1143) und dem Glycin 1154 (G1154) fixiert. Einzig das phosphorylierte Tyrosin 1146 geht keinen Proteinkontakt ein und zeigt eine gute Zugänglichkeit.

In zahlreichen Mutationsanalysen wurde die Rolle der einzelnen Tyrosine für den Aktivierungsprozess des IRs und für die Signaltransduktion untersucht. Keines der Tyrosine ist *in vitro* essentiell für die Phosphorylierung der anderen (Tavare *et al.* 1991; Wilden *et al.* 1992; Zhang *et al.* 1991; Dickens und Tavare 1992). Jedoch ergab sich in *in vivo*- und *in*

in vitro- Untersuchungen kein eindeutiges Bild über die Bedeutung der einzelnen Tyrosinphosphorylierungsstellen. Dies kann an den unterschiedlichen Methoden liegen, die einen Vergleich der verschiedenen Resultate erschweren. Allen Arbeiten ist gemeinsam, dass sich die Substitution aller drei Phosphorylierungsstellen in einer deutlichen Reduktion der Kinaseaktivität äußert (Wilden *et al.* 1992). Zudem wirkt sich der Austausch je einer der drei Phosphorylierungsstellen negativ auf die Internalisierung des Rezeptors aus (Reynet *et al.* 1990; Wilden *et al.* 1992).

Nicht nur die Bedeutung der Phosphorylierungsstellen, sondern auch die Reihenfolge ihrer Besetzung wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Die Meinungen reichen von einer zufälligen Besetzung (Tavare und Dickens 1991) bis hin zu einem geordneten Besetzungsmuster (Dickens und Tavare 1992; Wei *et al.* 1995), wobei zwischen zwei möglichen Reihenfolgen unterschieden wird:

- Y 1146 → Y 1150 → Y 1151 (Dickens und Tavare 1992)
- Y 1150 → Y 1146 → Y 1151 (Wei *et al.* 1995).

Nachdem die Kristallstruktur der IRKD gelöst wurde, hat sich allgemein die Besetzung des Tyrosins 1150 als erste Phosphorylierungsstelle etabliert.

2.4 Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen

Für die Entwicklung und die Homöostase einer Zelle ist ein angemessenes Gleichgewicht an inhibitorischen und stimulierenden Signalen erforderlich. Dabei spielt die Regulation der RTKs eine wichtige Rolle. Es muss also Mechanismen geben, die das Wechselspiel von inhibierten zu aktivierten Zuständen ermöglichen. Ein generelles Modell zur Aktivierung von RTKs postuliert, dass durch die Bindung eines rezeptorspezifischen Liganden die Rezeptordimerisierung (Ausnahme: IR-Familie, bereits unproduktiv dimerisiert) erfolgt. Die Dimerisierung bewirkt, dass die beiden beteiligten zytoplasmatischen Kinasedomänen in eine bestimmte Anordnung zueinander gebracht werden, so dass die *trans*-Phosphorylierung spezifischer Tyrosine in der jeweiligen Aktivierungsschleife des Nachbarmoleküls ermöglicht wird (Schlessinger, 1988; Lemmon & Schlessinger, 1994; Greenfield *et al.* 1989; Lemmon *et*

al. 1997). Somit spielen in dem komplexen Aktivierungsprozess von RTKs sowohl die Dimerisierung, als auch die *trans*-Phosphorylierung eine entscheidende Rolle.

Für Wachstumsfaktorrezeptoren der EGFR-Familie wurde bereits 1983 von Schlessinger *et al.* ein klassischer Beweis für eine über Oligomerisierung erzeugte Aktivierung von Wachstumsfaktorrezeptoren erbracht. Durch die Verwendung monoklonaler Anti-Rezeptor Antikörper (2G2-IgM) und deren monovalenter Fab-Fragmente konnte gezeigt werden, dass die Oligomerisierung für die Aktivierung des EGF-Rezeptors notwendig ist. Die Bindung des 2G2-IgM Antikörpers an den EGFR führte zu einer nachweislichen katalytischen Aktivität, die Bindung eines monovalenten Fab-Fragments dagegen nicht. Durch anschließende Kreuzvernetzung (*cross linking*) der gebundenen Fab-Fragmente über entsprechende Antikörper konnte die katalytische Aktivität wiederhergestellt werden. Die Experimente zeigten, dass eine Oligomerisierung von EGFRs zu einer Aktivierung, sogar bei einer Vermittlung über andere extrazelluläre Domänen als die Ligandenbindungsdomänen führt. Dies spricht für eine intermolekulare Autophosphorylierung der Wachstumsfaktorrezeptoren der EGFR-Familie in *trans*. Dagegen liegt der IR bereits vor der Ligandenbindung als Dimer vor, zeigt aber nur basale Aktivität ohne Ligand.

Kahn *et al.* konnten 1991 anhand einer mit Trypsin geschnittenen Variante des IRs zeigen, dass intramolekulare *cis*-Phosphorylierungen innerhalb eines Dimers zu einer Kinaseaktivierung führen können. Dieser mit Trypsin geschnittenen Variante fehlte ein Großteil der extrazellulären α -Untereinheiten. Obwohl solche Fragmente kein Insulin binden können, wurden sie konstitutiv aktiviert. Diese proteolytischen Studien konnten den extrazellulären α -Untereinheiten des IRs eine inhibitorische Funktion zuweisen.

Der Aktivierungsprozess der Wachstumsfaktorrezeptoren ist somit eng an eine Dimerisierung gekoppelt. Die Dimerisierung als solche reicht jedoch nicht allein zur Aktivierung von RTKs aus. Dies konnte anhand von Analysen verschiedener Wachstumsfaktorrezeptoren nachgewiesen werden. Untersuchungen am Erythropoietin Rezeptor (EpoR) und am ErbB2/Neu-Rezeptor zeigten, dass die Dimerisierung zur Aktivierung benötigt wird, aber nicht immer zur Rezeptor-Aktivierung ausreicht (Krause *et al.* 1998; Stern *et al.*, 1998). EpoR-Moleküle können als unterschiedliche Dimere vorliegen, in denen die beiden Untereinheiten in verschiedenen Orientierungen zueinander liegen (Livnah *et al.* 1999). Je nach Ausrichtung der Untereinheiten zueinander erhält man ein inaktives Dimer (ohne Ligand), ein teilaktives Dimer (in Anwesenheit von einem Peptid-Agonisten EMP1 = Epo-

mimetic peptide 1) oder ein vollaktives Dimer (in Anwesenheit von Epo). Somit ist mit der Aktivierung des EpoRs eine Neuordnung der präformierten Dimerkomplexe verbunden. Für die Aktivierung muss ein präformiertes Dimer über Konformationsänderungen in ein produktives Dimer umgewandelt werden. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die Dimerisierung alleine unzureichend für die EpoR-Aktivierung ist. Analog dazu konnte die Gruppe um Burke *et al.* (1998) zeigen, dass der ErbB2/Neu Rezeptor nur über einen konformationsabhängigen Prozess eine produktive Dimerisierung erlangen kann. Das Vorkommen inaktiver bzw. autoinhibierter RTK-Dimere wird durch die IR-Familie unterstrichen, deren Mitglieder ohne Ligand als inaktive Heterotetramere existieren.

Die Bindung eines Liganden muss zu einer Konformationsänderung führen, die den Wechsel zwischen einem Zustand veränderter Aktivierung zu einem Zustand der zulässigen Kinasephosphorylierung ermöglicht (Yip *et al.* 2000).

Anhand dieser Ergebnisse stellte Hunter (1999) ein Modell vor, nachdem es in einem Dimer zwei verschiedene relative Orientierungsmöglichkeiten der Kinaseuntereinheiten zueinander gibt, welche die *trans*-Phosphorylierung im inaktiven, nicht Liganden gebundenen Zustand verhindern. Im inaktiven Zustand des RTK-Dimers liegen die zytosolischen Kinasedomänen entweder in einem für die *trans*-Phosphorylierung unmöglichen Abstand oder in einer falschen Orientierung zueinander vor. Erst eine Ligandenbindung löst die Bildung eines produktiven Rezeptor-Dimers aus, d.h. durch die Änderung der Orientierung der Kinaseuntereinheiten zueinander wird die *trans*-Phosphorylierung und somit die Aktivierung ermöglicht. Das Modell zeigt, dass die Orientierung der Kinaseuntereinheiten zueinander einen wichtigen Punkt in der Aktivierung von RTKs ausmacht.

Wachstumsfaktorrezeptoren sind in ihrer Ganzheit schwer zur Kristallisation zu bringen. Um aber dennoch die Struktur der RTKs und deren Autophosphorylierungsprozesse analysieren zu können, hat sich das Modell der löslichen Kinasedomänen etabliert. Ullrich *et al.* (1985) und Ebina *et al.* (1985) konnten die erste cDNA des IRs erfolgreich klonieren und somit die Expression großer Mengen in Vertebratenzelllinien ermöglichen. Die löslichen RTKs in ihren Einzeldomänen lassen sich besser kristallisieren. Zusätzlich konnte das aufwendige Reinigungsverfahren des IRs aus Humanplazenta somit umgangen werden (Heidenreich *et al.* 1994). In unserer Arbeitsgruppe wird die lösliche Insulinrezeptorkinase (LIRK bzw. IRKD) als Modellenzym für den Insulinrezeptor eingesetzt. Mit dem Baculovirus-Expressionssystem wird sie in Insektenzellen überexprimiert (Al-Hasani *et al.* 1994). Die IRKD umfasst den

zytoplasmatischen Bereich der β -Untereinheit des IRs von der Aminosäure R⁹⁴¹ bis S¹³⁴³. Da die Ligandenbindungsstelle fehlt, ist eine Aktivierung durch Insulin nicht möglich. Die Kinase liegt in monomerer Form vor und zeigt eine konstitutive Basal-Phosphotransferaseaktivität (Cobb *et al.* 1989; Herrera *et al.* 1988). Es kann gezeigt werden, dass *in vitro* Autophosphorylierung bei Erhöhung der Kinasekonzentration auftritt. Es wurde eine Dimerisierung durch die Verwendung hoher Konzentrationen löslicher Kinasedomänen erreicht. Die Dimerisierung führt zu einer lokalen Konzentrationserhöhung der Kinasedomänen, einhergehend mit der Begünstigung der anschließenden Autophosphorylierung.

Nach Wei *et al.* (1995) hängt die Rate der Autophosphorylierung der monomeren IRKD VK (VK=verkürzte Kinase, V⁹⁶⁶-K¹²⁷¹) von der eingesetzten Enzymkonzentration ab. In unserer Arbeitsgruppe konnte bestätigt werden, dass die Phosphorylierung der monomeren IRKD VK, bzw. die der monomeren IRKD Δ 72C (C-terminal deletiert, R⁹⁴¹-K¹²⁷¹), eine gewisse Konzentrationsabhängigkeit aufweist. Diese beobachtete Konzentrationsabhängigkeit in der Autophosphorylierung steht in Übereinstimmung mit dem Mechanismus der von Hubbard postulierten *trans*-Phosphorylierung. Eine eventuell auftretende *cis*-Phosphorylierung wird dabei nicht ausgeschlossen. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass eine Erhöhung der Konzentration der löslichen Kinasen zu einer Aktivierung in der Autophosphorylierung führt. Die monomere lösliche IRKD dient somit als Modell für den katalytisch inaktiven IR. Untersuchungen in der Autophosphorylierung und in der Substratphosphorylierung machen deutlich, dass bei der monomeren IRKD keine Unterscheidung zwischen Aktivierung über Dimerisierung und *trans*-Autophosphorylierung möglich ist.

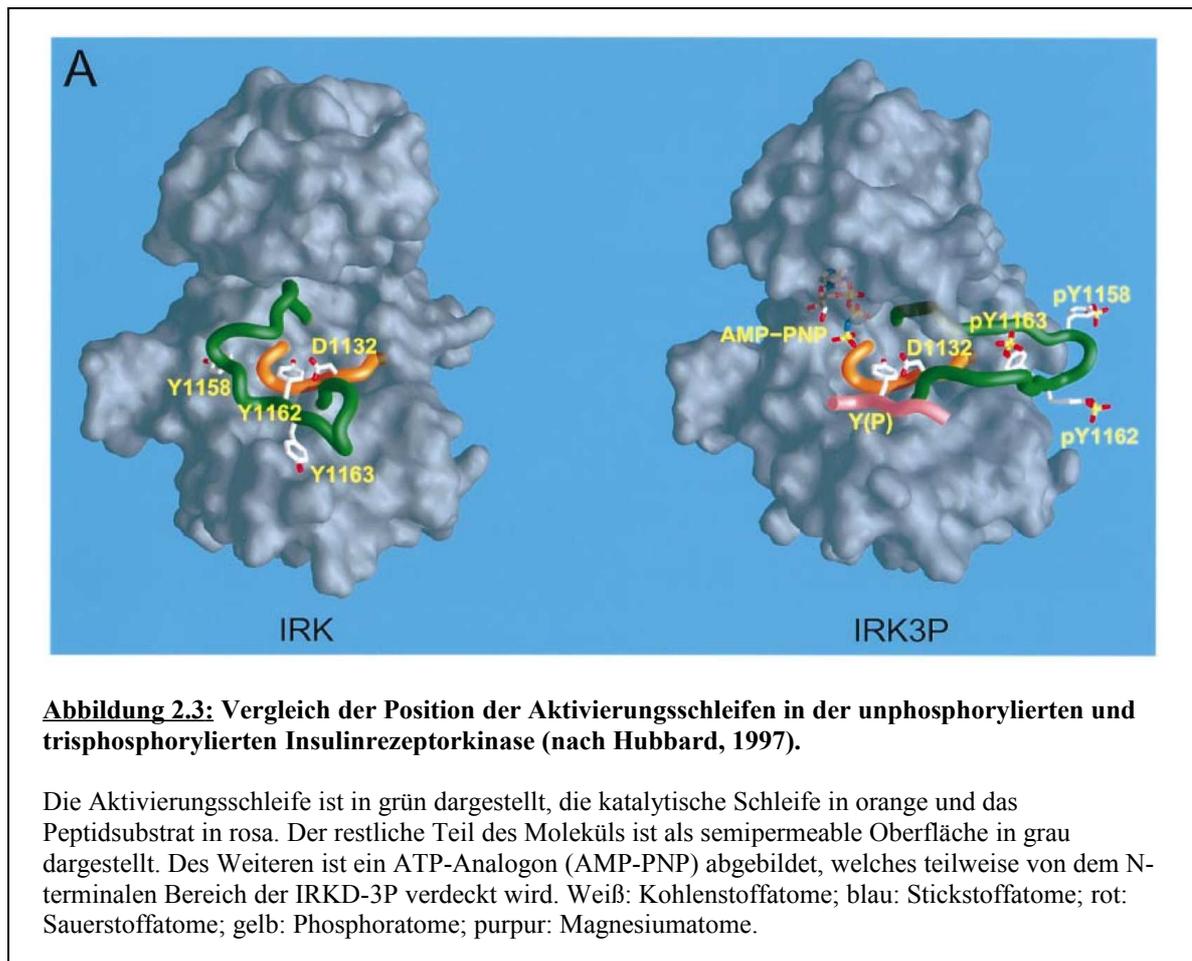
Die produktive Dimerisierung ist die Basis für die Aktivierung. *In vitro* kann eine produktive Dimerisierung durch die Verwendung rekombinanter Glutathion S-Transferase (GST)-Fusionsproteine (Baer *et al.* 2001) erreicht werden. Das in unserer Arbeitsgruppe etablierte GST-Modell ermöglicht eine künstliche Dimerisierung von Kinasedomänen. GST-Fusionsproteine werden während der Proteinbiosynthese als nicht kovalente, stabile Faltungsdimere gebildet. Kaplan *et al.* (1996) und Lim *et al.* (1994) konnten die Stabilität des GST nachweisen. GST zeigt nur unter denaturierenden Bedingungen (4-5 M Harnstoff) eine reversible Auffaltung. Dabei erfolgt der Übergang vom nativen zum entfalteten Protein ohne Zwischenzustände (keine Intermediate nachweisbar). Unter natürlichen Bedingungen konnte dagegen keine Monomerisierung des GST beobachtet werden. Die homodimere Struktur des

GST dient zusätzlich als Affinitätstag für die Reinigung rekombinanter Proteine. Dimere GST-Kinasen begünstigen eine schnelle Autophosphorylierung durch lokale Konzentrationserhöhung der Phosphatdonor- und Phosphatakzeptor-Stellen. GST-Kinasen zeigen eine 10 - 30 fach erhöhte katalytische Aktivität gegenüber ihren monomeren löslichen Kinasen. Untersuchungen anhand limitierter Proteolyse (Baer, 2001) geben einen Hinweis darauf, dass die Aktivierungsschleife im GST-Fusionsprotein eine offene Konformation bevorzugt. Die über GST-Fusion ermöglichte produktive Dimerisierung exponiert die Aktivierungsschleifen der Kinasedomänen optimal für eine Autophosphorylierung in *cis* oder in *trans*. Somit ist die Dimerisierung hinreichend für die Aktivierung der Kinasen. Die Expression der IRKD als GST-Fusionsprotein stellt ein verbessertes Modell für den aktivierten Holorezeptor dar.

2.5 Autoinhibition der Tyrosinrezeptorkinasen

Vor der Stimulation durch ihre Wachstumsfaktor-Liganden müssen RTKs in einem Inhibitionszustand gehalten werden, um eine ligandenunabhängige katalytische Aktivität zu unterbinden. Eine Daueraktivität würde dem Verlust der Regulation entsprechen und pathogene Folgen nach sich ziehen. Diese Regulation scheint über spezifische regulatorische Regionen ermöglicht zu werden, welche die Rezeptoren in einer autoinhibierten Konformation bewahren. Bei vielen Proteinkinasen ist solch eine intrasterische Inhibition als Regulationsmechanismus bekannt (Pearson *et al.* 1988; Soderling 1993; Kemp *et al.* 1991; Kobe *et al.* 1997). Einige RTKs bedienen sich dazu einer so genannten *cis*-Inhibition; z.B. konnte eine Autoinhibition durch die Aktivierungsschleife beim IR nachgewiesen werden (IRKD0P, Hubbard *et al.* 1994).

Das Modell der *cis*-Inhibition/*trans*-Aktivierung basiert auf den Röntgenstrukturdaten der nicht aktiven, unphosphorylierten, monomeren Insulinrezeptorkinasedomäne (IRKD) (Hubbard *et al.* 1994) und der vollaktiven, trisphosphorylierten Form der IRKD (Abbildung 2.3).



Im autoinhibierten Zustand bindet in der Aktivierungsschleife eine „Pseudosubstrat“-Aminosäuresequenz (D¹¹⁴⁹ bis K¹¹⁵³) an die Peptidbindungsstelle. Gleichzeitig wird die Nukleotidbindungsstelle durch das Rückgrat der Aktivierungsschleife (F¹¹³⁹ bis M¹¹⁴¹) blockiert. Dabei befindet sich der Phenylring des DFG-Motivs in der Tasche, in der bei Substratbindung der Adeninring des ATP liegt. Es konnte gezeigt werden, dass das Y¹¹⁵⁰ in der Aktivierungsschleife über Wasserstoffbrücken diese geschlossene, inaktive Konformation fixiert und mit dem Substrat um die Bindung im katalytischen Zentrum konkurriert. Die autoinhibierte Kinase gilt als Modell für die inaktive Rezeptorkinase bei Abwesenheit von Hormon. Dagegen liegt bei der aktivierten Kinase (IRKD3P, Hubbard *et al.* 1997) die Aktivierungsschleife ausgeklappt und phosphoryliert vor. Der Zugang zum katalytischen Zentrum für ATP und Substrat ist frei. Diese *tris*-phosphorylierte Form gilt als Modell für den durch Hormon stimulierten Rezeptor.

Beim IR ist neben der Regulation über die Aktivierungsschleife eine Regulation über den N-Terminus bekannt. Eine wichtige autoinhibitorische Funktion wird dabei dem Y⁹⁷² in der Juxtamembrandomäne zugesprochen (Kohanski *et al.* 2003). Eine vierfache Steigerung der Kinaseaktivität erfolgt, wenn dieses Y⁹⁷² gegen ein Phenylalanin ausgetauscht wird. Die Kristallstruktur der unphosphorylierten IRKD VK (V⁹⁶⁶ bis K¹²⁷¹) verdeutlicht, dass das Y⁹⁷² die α C-Helix in einer unproduktiven Konformation hält. Die Salzbrücke zwischen K¹⁰¹⁸ und E¹⁰³⁵ kann nicht ausgebildet werden, so dass das γ -Phosphat des ATP nicht optimal für die Katalyse ausgerichtet werden kann. N-terminale Bereiche der Kinasedomäne müssen bei der Aktivierung eine Konformationsänderung erfahren, so dass die α -C-Helix nicht mehr durch das Y⁹⁷² blockiert wird und die für die Katalyse essentielle Salzbrücke eingehen kann.

Bei der Autoinhibition wird durch sterische Effekte gewährleistet, dass die regulatorischen Tyrosine innerhalb einer Kinaseuntereinheit (*cis*-Phosphorylierung) nicht phosphoryliert werden können. Für eine Aktivierung wird somit eine Konformationsänderung vorausgesetzt (Heldin 1995).

Das von Hubbard postulierte Modell der *cis*-Autoinhibition weist jedoch einige Schwachstellen auf. Nach Frankel tritt die Autoinhibition nur bei geringer ATP-Konzentration auf (Frankel *et al.* 2001). Unter physiologischen Bedingungen herrscht allerdings ein permanenter ATP-Überschuss, so dass die inaktive Konformation aufgelockert erscheint. Im Gegenteil zum Holorezeptor wird der Aspekt der Dimerisierung in diesem Modell nicht berücksichtigt. Des Weiteren konnte *in vivo* eine vollphosphorylierte Form der Insulinrezeptorkinase nicht nachgewiesen werden (Tennagels *et al.* 2001). Auch die GST-IRKD, die als Modell für den dimeren Rezeptor gilt (Baer *et al.* 2001), zeigt nicht den maximal möglichen Phosphatenbau.

2.6 Bedeutung der Dimerisierung

Der Dimerisierung wird in der dominierenden Literatur hinsichtlich der intrinsischen Kinaseaktivität von Rezeptortyrosinkinasen eine untergeordnete Rolle zugesprochen. So hat sie demnach als einzige Aufgabe die Autophosphorylierung in *trans* zu ermöglichen, wodurch die intrasterische Autoinhibition aufgehoben und die Kinase aktiviert wird.

Viele der Untersuchungen bezüglich der Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen beruhen auf dem Vergleich von unphosphorylierter monomerer mit vollphosphorylierter monomerer Kinase, da die Autoren sich auf das *cis*-Inhibitions/*trans*-Aktivierungsmodell berufen. Bei all diesen Arbeiten bleibt jedoch die Frage offen, welchen Beitrag die Dimerisierung beisteuert, da dies in den meisten Fällen nicht überprüft wurde.

Hays *et al.* (2003, 2004) konnten durch Untersuchungen zur Aktivierung der c-MET-Kinase zeigen, dass Oligomerisierung eine Konformationsänderung in der Kinasedomäne hervorruft, die zusätzlich zu der Aufhebung der Inhibition durch Tyrosinphosphorylierung in der Aktivierungsschleife wirkt. Aus diesem Grund postulieren sie, dass isolierte, monomere Kinasedomänen, nicht dazu geeignet sind Rezeptorfunktionen zu untersuchen, da sie diese Art der zusätzlichen Kinaseaktivierung als ein allgemein gültiges Konzept bei den Rezeptortyrosinkinasen vermuten. Sie berufen sich dabei auf Untersuchungen am EGFR (Sherill *et al.*, 1997; Posner *et al.*, 1992) und am β -PDGFR (Baxter *et al.*, 1998), die darauf hindeuten, dass Phosphorylierung alleine nicht die volle Kinaseaktivität gewährleisten kann. Neben diesen Hinweisen auf eine nicht zu vernachlässigende Rolle der Dimerisierung konnten alternative Mechanismen zur *cis*-Inhibition/*trans*-Aktivierung gezeigt werden. So beobachteten Frankel *et al.* (2001) für den Insulinrezeptor, dass die Aufhebung der Autoinhibition nicht zwingend zur vollständigen Kinaseaktivität führt. Bei dem EGF-Rezeptor ist Dimerisierung alleine schon ausreichend für die Aktivierung. Die Bildung eines zytoplasmatischen Dimers stabilisiert die Aktivierungsschleife auf diese Art, so dass sie zur Katalyse des Phosphoryltransfers befähigt ist. Eine Phosphorylierung der Aktivierungsschleife ist somit nicht notwendig (Stamos *et al.*, 2002). Für den IR entwickelte die Arbeitsgruppe von Yip ein in Abbildung 2.4 dargestelltes Modell der Aktivierung, das auf elektronenmikroskopischer Analyse der extrazellulären Hormonbindungsdomäne basiert (Ottensmeyer *et al.*, 2000).

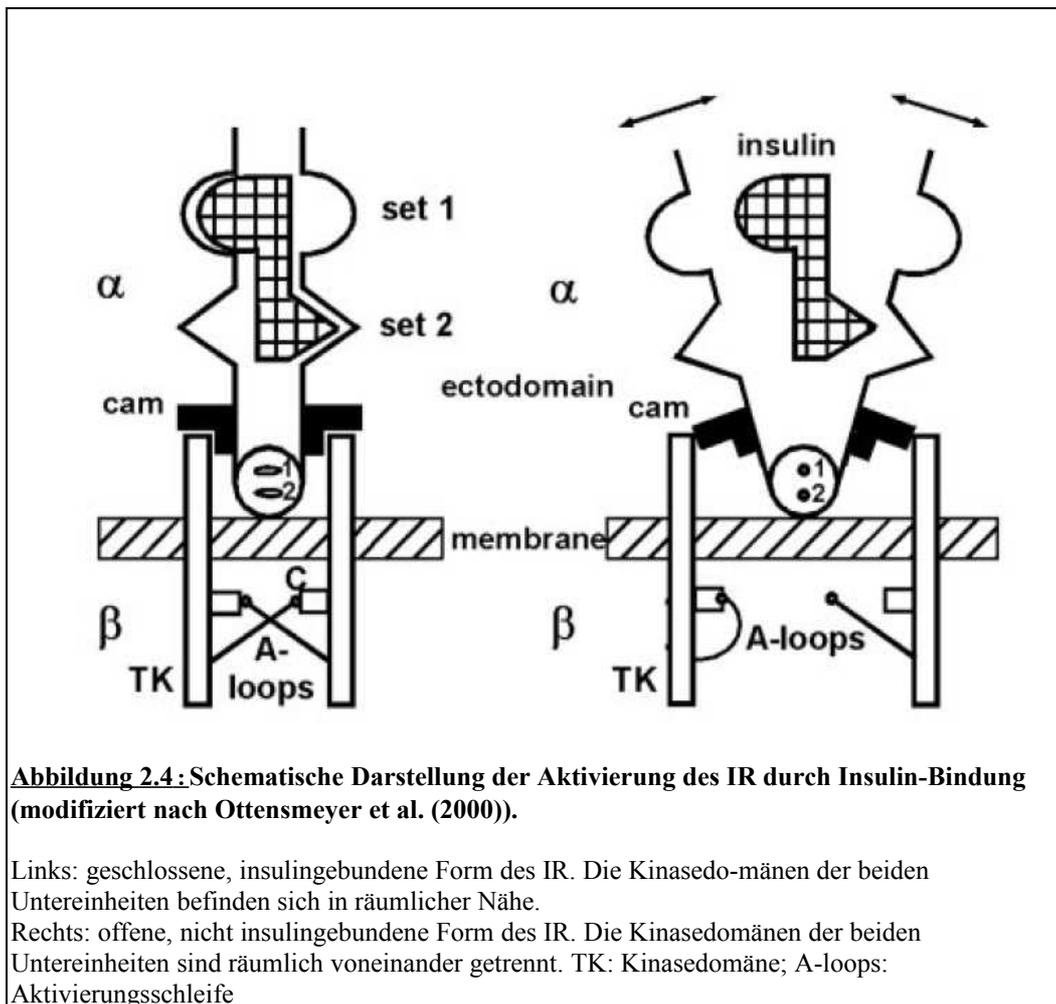


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Aktivierung des IR durch Insulin-Bindung (modifiziert nach Ottensmeyer et al. (2000)).

Links: geschlossene, insulingebundene Form des IR. Die Kinasedomänen der beiden Untereinheiten befinden sich in räumlicher Nähe.

Rechts: offene, nicht insulingebundene Form des IR. Die Kinasedomänen der beiden Untereinheiten sind räumlich voneinander getrennt. TK: Kinasedomäne; A-loops: Aktivierungsschleife

Dieses Modell trägt dem Umstand Rechnung, dass die hormon-bindende, extrazelluläre Domäne inhibitorisch auf die Kinase wirkt, indem es die Kinasedomänen in nichtproduktivem Abstand hält (Ottensmeyer *et al.*, 2000). Durch Ligandenbindung erfolgt eine Konformationsänderung der Ektodomänen, die in einer Annäherung der zytosolischen Bereiche des Rezeptors resultiert. Hierdurch werden die Kinasedomänen so zueinander ausgerichtet, dass eine Autophosphorylierung *in trans* erfolgen kann (Florke *et al.*, 1990).

Wie bereits erwähnt, wurde dieses Modell von unserer Arbeitsgruppe aufgegriffen. Hierzu wurde die lösliche, cytoplasmatische Domäne des Insulinrezeptors (IRKD) als Glutathion S-Transferase (GST)-Fusionsproteine exprimiert. GST ist ein 26 kDa großes Protein aus dem Helminthen *Schistosoma japonicum*, das unter physiologischen Bedingungen als konstitutives

Dimer vorliegt. Die Fusion der IRKD mit GST führt somit während der Proteinsynthese zu einem nicht-kovalenten, stabilen Dimer der Kinase.

In enzymkinetischen Versuchen konnten Baer *et al.* (2001) zeigen, dass die GST-Kinasen ein Modell für den aktivierten IR darstellen, ohne dass es der Phosphorylierung in der Aktivierungsschleife bedarf. Die Ursache dafür wurde anhand der limitierten, durch Trypsin katalysierten Proteolyse gezeigt, da im Gegensatz zur monomeren Tyrosinkinasedomäne, deren Aktivierungsschleife für die Protease unzugänglich war, die künstlichen Dimere eine für die Protease zugängliche Spaltstelle besaßen (Baer *et al.*, 2001). Dies kann als indirekter Hinweis darauf gewertet werden, dass die Aktivierungsschleife durch die produktive Dimerisierung optimal für eine Transphosphorylierung exponiert wird und somit Dimerisierung hinreichend für die Aktivierung der Kinase ist. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese zeigten weitere Untersuchungen, dass die intrasterische Autoinhibition des Insulinrezeptors gelöst wurde, wenn die monomere Kinase in der Autophosphorylierungsreaktion in hohen Konzentrationen eingesetzt wurde (Wei *et al.*, 1995).

2.7 Pseudokinasen und Dimerisierung mit katalytisch inaktiven Kinasemutanten

2-3% aller eukaryotischen Gene im humanen Genom kodieren für Proteine, die eine Kinasedomäne besitzen (ca. 500 Proteinkinasen = Kinom), von denen etwa 10% keine katalytische Aktivität aufweisen. Diese 48 der über 500 Proteinkinasen werden als Pseudokinasen klassifiziert (Manning *et al.* 2002). Pseudokinasen konnten verstreut in allen Kinasefamilien nachgewiesen werden. Dies suggeriert, dass sie sich in der Evolution aus verschiedenen aktiven Kinasen entwickelt haben. Sequenzanalysen haben gezeigt, dass allen Pseudokinasen in mindestens einem von den drei wichtigen Motiven der katalytischen Domäne, eine oder mehrere Aminosäuren fehlen, die für die katalytische Aktivität benötigt werden. Diese drei sind das Val-Ala-Ile-Lys (VAIK) Motiv, das His-Arg-Asp (HRD) Motiv und das Asp-Phe-Gly (DFG) Motiv. Anhand des Fehlens der Aminosäure/ n in diesen Motiven werden die Pseudokinasen in sieben Klassen eingeteilt. Die am besten untersuchte

Pseudokinase der RTKs ist die ErbB3/ HER3 der EGF-Rezeptorfamilie. Bei dem ErbB3-Rezeptor ist das katalytische Aspartat im HRD-Motiv der katalytischen Schleife durch eine nicht konservierte Aminosäure ersetzt. Obwohl Pseudokinasen keine katalytische Aktivität besitzen, scheinen sie trotzdem in der Signaltransduktion von wichtiger Bedeutung zu sein (Boudeau *et al.* 2006). Mäusen, denen z.B. das Gen für den ErbB3-Rezeptor fehlt, sterben schon früh im embryonalen Stadium (Erickson *et al.* 1997).

In dem komplexen Aktivierungsprozess von RTKs spielen die Dimerisierung und die *trans*-Autophosphorylierung eine wichtige Rolle. Es ist schwierig, beide Prozesse in ihrem Beitrag der Aktivierung voneinander zu unterscheiden. Um nur den Beitrag der Dimerisierung ermitteln zu können, muss bei durchzuführenden Analysen eine *trans*-Autophosphorylierung ausgeschlossen werden. Eine Möglichkeit dafür ist die Verwendung von katalytisch inaktiven Kinasevarianten. In unserer Arbeitsgruppe konnte in verschiedenen Experimenten an den löslichen monomeren Kinasedomänen des EGFRs, des IRs und des IGF-1Rs eine Aktivierung durch Dimerisierung nachgewiesen werden (Parvaresh, Baer, nicht veröffentlichte Experimente). In Phosphorylierungsreaktionen wurde ein großer Überschuss katalytisch inaktiver Kinasevarianten zu katalytisch aktiven Kinasen gemischt. Eine mögliche *trans*-Phosphorylierungsrate wurde somit stark gesenkt. Dieses Kinasegemisch zeigte in Substrat- und in Autophosphorylierung eine deutlich höhere katalytische Aktivität als die reinen monomeren Kinasen bei gleicher Konzentration. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass über die Dimerisierung mit katalytisch inaktiven Kinasen eine Aktivitätssteigerung der Kinasen bewirkt wird. Analog zur Analyse der Aktivierung bei der Mischung monomerer Kinasen, kann das Hybrid-Modell als verbessertes Modell für den aktivierten Insulin-Holorezeptor genutzt werden, da durch die geschickte Auswahl der Kinasen eine Autophosphorylierung innerhalb eines Hybrids ausgeschlossen werden kann.

Eine Möglichkeit zur Bildung von Kinase-Hybriden besteht darin, Kinasen selektiv mit reaktiven SH-Gruppen zu versehen, die es ermöglichen, gezielt mit Hilfe chemischer „crosslinker“ (Quervernetzer) Heterodimere zu erzeugen (Neubert, 2004).

Ein weiterer Ansatz zur Heterodimerisierung ist durch GST-Fusionsproteine gegeben. Hornby *et al.* (2000) haben gezeigt, dass GST-Dimere sich durch Anwendung von Guanidiniumhydrochlorid oder Harnstoff monomerisieren und denaturieren lassen. Dieser Prozess ist reversibel und führt nach Entfernung der Agenzien durch Dialyse zur Renaturierung und Dimerisierung zuvor monomerisierter Proteine. In unserer Arbeitsgruppe

wurde dieses Verfahren erfolgreich auf GST-Fusionspeptide angewendet, die vom C-Terminus der Insulinrezeptorkinase abgeleitet sind (Bergschneider, unveröffentlichte Versuche). Dieses für den C-Terminus erprobte Verfahren konnte jedoch nicht auf GST-fusionierte Kinasen übertragen werden, da die Kinasedomäne allen Versuchen der Renaturierung widerstand (Bergschneider, unveröffentlichte Versuche).

Heterodimere, bestehend aus einer katalytisch aktiven und einer katalytisch defizienten Kinaseuntereinheit können aber mittels Coexpression generiert werden. Bei der Coexpression von GST-Kinasen falten sich während der Proteinbiosynthese einzelne Domänen unabhängig von den restlichen Teilen der Proteine. Somit können die GST-Anteile der Fusionsproteine nicht-kovalente Dimere ausbilden, noch bevor die vollständigen Fusionsproteine synthetisiert werden. Dieser Umstand ermöglicht durch die Verwendung zweier verschiedener Baculoviren, die unterschiedliche Kinasekonstrukte beinhalten, die Generierung von Heterodimeren (Fischer, 2005).

3 Fragestellung

Nach der gängigen Meinung ist die Dimerisierung von Rezeptortyrosinkinasen der generelle Mechanismus für die Aktivierung (Schlessinger, 1988). Aufgrund der konstitutiven Dimere der IR-Familie und ligandenunabhängig prädimersierten Rezeptoren Epo- und ErbB2 musste dieser Prinzip der Aktivierung jedoch um den Terminus „unproduktive Dimere“, die ohne Ligand vorliegen, erweitert werden. Bei diesem erweitertem Modell führt die Ligandenbindung an das unproduktive Dimer zur räumlichen Annäherung der cytoplasmatischen Domänen und somit zum produktiven Dimer. Im bisher vorherrschenden Modell der Aktivierung von Rezeptoren, ist neben der Dimerisierung auch die *trans*-Phosphorylierung, bis auf wenige Ausnahmen, unabdingbar mit der katalytischen Aktivität verbunden.

Des Weiteren konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass eine GST-vermittelte Dimerisierung einer katalytisch aktiven Untereinheit einer Kinase mit einer Pseudokinase zur Aktivierung führt, die mit einem Homodimer, bestehend aus zwei aktiven Kinasuntereinheiten, vergleichbar ist (Herweg 2007). Im Gegensatz zu der in der Literatur postlierten Phosphorylierung in *trans* ist in diesen Heterodimeren nur noch *cis*-Phosphorylierung möglich, da nur noch eine Untereinheit katalytische Aktivität aufweist.

Bei der Aktivierung des IRs spielt die Phosphorylierung der Tyrosine der Aktivierungsschleife (Y¹¹⁴⁶, Y¹¹⁵⁰, Y¹¹⁵¹) neben der Dimerisierung eine entscheidende Rolle. Wobei in der Literatur die Bedeutung der einzelnen Phosphorylierungsstellen für den Aktivierungsprozess noch umstritten ist.

In einer vorangegangenen Arbeit wurden bereits monomere IRKD-Konstrukte untersucht, bei denen jeweils eines der drei Tyrosine der Aktivierungsschleife gegen Phenylalanin ausgetauscht wurde (V.Nölle *et al.*, 2000). Keine der Phosphorylierungsstellen zeigte sich allein für die Aktivierung des IRs verantwortlich. Es konnte allerdings eine starke Verringerung der dualen Aktivität für die Mutation Y1151F festgestellt werden.

Monomere IR-Kinasen stellen hervorragende Modelle für die Kristallographie dar, eignen sich allerdings weitaus weniger zur Analyse des Mechanismus der Aktivierung. Um die Frage der Aktivierung der Insulinrezeptorkinasen näher zu untersuchen sollten dimere,

monosubstituierte Vollängen und C-terminal verkürzten Kinasekonstrukte generiert und biochemisch charakterisiert werden. Dabei kann die Rolle der einzelnen Tyrosine der Aktivierungsschleife im Bezug auf Spezifität und Aktivierung der Kinase untersucht werden.

Um den Beitrag der einzelnen Tyrosine bei der Aktivierung des IRs ohne den Einfluss einer *trans*-Phosphorylierung zu untersuchen, sollen GST-vermittelte Heterodimere generiert werden, die aus einer katalytisch aktiven (GST-TEV-IRKD Δ C^{WT}) und einer inaktiven Untereinheit (GST-IRKD^{D→A} His) bestehen. Wobei die aktive Untereinheit jeweils eine Mutation in der Aktivierungsschleife trägt (GST-TEV-IRKD Δ C^{Y1146F}, GST-TEV-IRKD Δ C^{Y1150F}, GST-TEV-IRKD Δ C^{Y1151F}). Die Ergebnisse der Untersuchungen dieser Heterodimeren mit nur einer aktiven, aber mutierten, Kinaseuntereinheit können dann mit zugehörigen Homodimeren verglichen werden und dabei Aufschluss über die Bedeutung der phosphorylierbaren Tyrosinreste für die Aktivierung geben.

4 Ergebnisse

4.1 Generierung, Expression und Reinigung mutierter Insulinrezeptorkinasen

4.1.1 Überblick über die IRKD-Konstrukte

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Formen der löslichen Kinasedomäne des Insulinrezeptors (IR) verwendet. Die im Labor bereits vorliegende, pUC-19- Vektoren pUC-IRKD (V.Nolle 1998) enthielten die cDNA des cytosolischen Anteils des humanen Insulinrezeptors (R943-S1343, Nummerierung nach Ullrich *et al.*, 1985) und der drei Mutanten und dienten als Ausgangspunkt für die Generierung verschiedener mutierter Varianten der löslichen Insulinrezeptorkinasen (IRKD). Die codierende DNA-Sequenz der Kinasemutanten musste daher in den pAcG2T-GST-TEV-Vector umkloniert werden. Der GST-Tag am N-Terminus ermöglicht die produktive Dimerisierung der Kinase und kann für die Reinigung über Glutathion-Sepharose-Affinitätschromatographie genutzt werden. Eine Schnittstelle für die TEV-Protease, zwischen GST und der LIRK-Domäne wurde im Anschluss für die Generierung von monomeren Kinasen verwendet. Ausgehend von diesen Konstrukten konnten mittels einer PCR-Reaktion eine C-Terminus verkürzte Variante aller Kinasen hergestellt werden.

Damit standen Insulinrezeptorkinasen zur Verfügung, die Punktmutationen in der Hauptphosphorylierungsdomäne tragen, sowie die Kinasevarianten, denen annähernd der komplette C-Terminus fehlt. Tabelle 4.1 fasst alle untersuchten Kinasen zusammen.

Kinase	Abkürzung	Beschreibung
GST-TEV-IRKD^{WT}	WT	Volllägen IRKD, Wildtype
GST-TEV-IRKD^{Y1146F}	46F	Austausch Tyrosin 1146→Phenylalanin, Aktivierungsschleife der Kinasedomäne
GST-TEV-IRKD^{Y1150F}	50F	Austausch Tyrosin 1150→Phenylalanin, Aktivierungsschleife der Kinasedomäne

GST-TEV-IRKD^{Y1151F}	51F	Austausch Tyrosin 1151→Phenylalanin, Aktivierungsschleife der Kinasedomäne
GST-TEV-IRKD^{ΔCWT}	ΔCWT	Deletierter C-Terminus, Wildtype
GST-TEV-IRKD^{ΔCY1146F}	ΔCY1146F	Deletierter C-Terminus, Austausch Tyrosin 1146→Phenylalanin, Aktivierungsschleife der Kinasedomäne
GST-TEV-IRKD^{ΔCY1150F}	ΔCY1150F	Deletierter C-Terminus, Austausch Tyrosin 1150→Phenylalanin, Aktivierungsschleife der Kinasedomäne
GST-TEV-IRKD^{ΔCY1151F}	ΔCY1151F	Deletierter C-Terminus, Austausch Tyrosin 1151→Phenylalanin, Aktivierungsschleife der Kinasedomäne

Tabelle 4.1: Überblick über die untersuchten Insulinrezeptorkinase.

4.1.2 Generierung der GST-TEV-IRKD-Kinasekonstrukte

Da alle zu generierenden Kinasekonstrukte die gleiche kodierende Sequenz besitzen und sich lediglich in einer Punktmutation, die in der Mitte der Sequenz liegt, voneinander unterscheiden, konnten alle Konstrukte nach der gleichen Strategie kloniert werden. Exemplarisch wird hier die Generierung von GST-TEV-IRKD^{Y1151F} gezeigt.

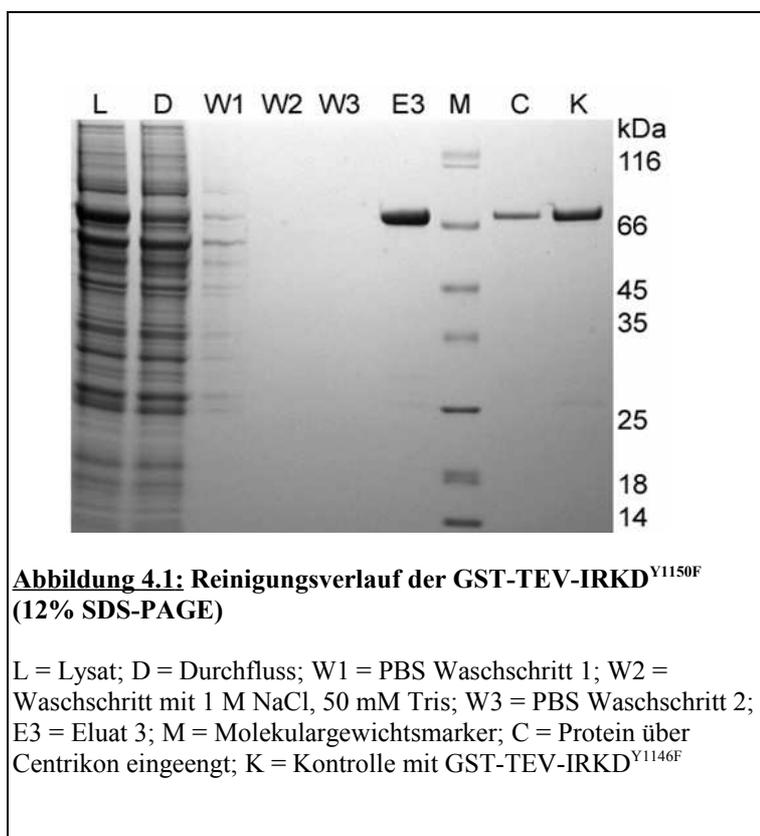
Ursprünglich lag die IRKD^{Y1151F} im Vektor pUC-IRKD^{Y1151F} vor (Nölle, 1998). Somit musste die codierende DNA-Sequenz in den pAcG2T-GST-TEV-Vektor umklont werden. Dieser Transfektionsvektor wird für das, für die Coexpression nötige, Baculovirus Expressionssystem verwendet. Mittels PCR wurde die DNA-Sequenz der LIRK aus dem Vektor pUC-LIRK^{Y1151F} amplifiziert. Für diese Amplifikation wurden die Primer so generiert, dass sie den codierenden Bereich der IRKD^{Y1151F} flankieren und gleichzeitig eine *Bam*HI- und *Eco*RI-Schnittstelle an den Randbereichen des Amplifikates generieren (6.1.7.3). Anschließend wurden das PCR-Produkt und der Zielvektor pAcG2T-GST-TEV mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI verdaut. Die 5'-Phosphatenden des Zielvektors wurden dann mittels Phosphatase dephosphoryliert und sowohl das das Insert wie auch die DNA der IRKD^{Y1151F} aus dem Reaktionsansatz über ein Agarosegel aufgereinigt. Für die folgende Ligation wurde ein Verhältnis von 1:5 (Vektor:Insert) eingesetzt (6.2.1.6). Nach anschließender Transformation in elektrokompente DH5α-Zellen und Selektion auf LB-

Amp-Agarplatten, konnten einzelne Kolonien selektiert werden. Der Nachweis der Ligation erfolgte mittels Restriktionstestverdau und Sequenzierung der DNA.

4.1.3 Expression und Reinigung der GST-TEV-IRKD-Konstrukte

Da die Integration der DNA-SEQUENZ in den Transfektionsvektor erfolgreich verlief, konnte im Anschluss mittels Co-Transfektion (6.2.2.1.3) das Konstrukt in *Sf9*-Zellen gebracht

werden. Die Viren wurden mittels Virusamplifikation vermehrt (6.2.2.1.5) und der Titer durch Plaque Assay (6.2.2.1.4) bestimmt. Die somit gewonnen Virusüberstände konnten zur Generierung von GST-TEV-IRKD-Konstrukten mittels Expression verwendet werden. Aus dem, nach der Lyse (6.2.2.1.7) entstandenem Solubilisat, konnten die gewünschten Proteine über Glutathion-Sepharose-Affinitätschromatographie (6.2.4.1) separiert werden. Nach



der Elution wurden die Proteine im Centrikon (6.2.4.3) gewaschen (zur Entfernung des Glutathions) und gleichzeitig aufkonzentriert. Die Ausbeute aller Kinase-Konstrukte ist in Tabelle 4.2 zusammengefasst. In Abbildung 4.1 wurde exemplarisch der Reinigungsverlauf der GST-TEV-IRKD^{Y1150F} dokumentiert. Alle GST-TEV-IRKD-Konstrukte wiesen ein

Konstrukt	Ausbeute[mg]/1*10 ⁸ Zellen
GST-TEV-IRKD ^{WT}	3,6
GST-TEV-IRKD ^{Y1146F}	2,9
GST-TEV-IRKD ^{Y1150F}	1,6
GST-TEV-IRKD ^{Y1151F}	2,7

Tabelle 4.2: Dokumentation der Ausbeuten der GST-TEV-IRKD-Konstrukte

Molekulargewicht von 73 kDa auf und konnten in reiner Form und hoher Ausbeute separiert werden.

4.1.4 Generierung der C-terminal deletierten Varianten der GST-TEV-IRKD-Kinasekonstrukte

Ausgehend von den GST-TEV-IRKD-Konstrukten sollten C-terminal trunkierte Varianten der Kinasemutanten generiert werden (K942-K1271).

Da alle vier GST-TEV-IRKD^{-WT / -Y1146F / -Y1150F / -Y1151F}-Konstrukte in Expressionsvektoren vorlagen, sollten anschließend durch die Einführung eines Stopcodons nach der Nukleotidsequenz kodierend für Lysin1271 die Expressionsvektoren so modifiziert werden, dass die C-terminal verkürzte Formen der Kinasen entstehen. Zur Kontrolle wurde zusätzlich eine XbaI Restriktionsschnittstelle als stille Mutation nach dem Stopcodon eingefügt.

Mit Hilfe von zwei Mutageneseprimern (6.1.7.4) wurde für jeden pAcG2T-GST-TEV-IRKD-Vektor eine PCR-Reaktion (6.2.1.3) durchgeführt und so gezielte Punktmutationen eingefügt. Dadurch wiesen die Nukleotidsequenzen aller Konstrukte ein neues Stopcodon sowie eine XbaI-Restriktionsschnittstelle auf. Anschliessend wurde das PCR-Produkt mit *DpnI* verdaut, um die methylierte maternale DNA zu entfernen und dann in e-komp. *DH5 α* -Zellen transformiert (6.2.1.1.4). Mehrere ausgewählte Kolonien wurden in Kultur hochgezogen, aus denen mittels alkalischer Lyse nach *Zhou* (6.2.1.2.1) die Plasmid-DNA isoliert wurde. Der Nachweis des zusätzlichen Stopcodons wurde durch Restriktionsanalyse mit *XbaI* und *BamHI* (6.2.1.4) erbracht. Ein Klon mit der gewünschten Mutation, wurde vervielfältigt und das Plasmid mittels *Nucleobond[®] Plasmid Kit* separiert (6.2.1.2.3). Durch anschließende Sequenzierung konnten die korrekten Sequenzen der GST-TEV-IRKDAC-Kinasekonstrukte nachgewiesen werden. Anschließend wurden die Kinasen durch Co-Transfektion in *Sf9*-Zellen geschleust, um die zur Expression der Kinasen benötigten Viren zu erzeugen (6.2.2.1.3). Durch eine Virusamplifikation konnten genügend Viren erzeugt und der Virustiter anhand des Plaque Assays bestimmte werden. Die gewonnenen Virusüberstände wurden für die Expressionen der Kinasekonstrukte verwendet.

4.1.5 Expression und Reinigung der der GST-TEV-IRKDΔC-Kinasekonstrukte

Nach erfolgreicher Transfektion in *Sf9*-Zellen (6.2.2.1.3) konnten alle vier generierten Konstrukte exprimiert werden. Die Zellen wurden anschließend aufgeschlossen (6.2.2.1.7) und jeweils die gewünschten Proteine über Glutathion-Sepharose-Affinitätschromatographie (6.2.4.1) isoliert. Nach der Elution wurden die Proteine im Centrikon (6.2.4.3) gewaschen (Entfernung vom Glutathion)

und aufkonzentriert. Die Ausbeute der GST-TEV-IRKDΔC-Konstrukte ist in Tabelle 4.3 zusammengefasst.

In Abbildung 4.2 wurde exemplarisch der

Reinigungsverlauf der GST-TEV-IRKDΔC^{Y1146F}

dokumentiert. Alle

exprimierten und gereinigten

GST-TEV-IRKDΔC-

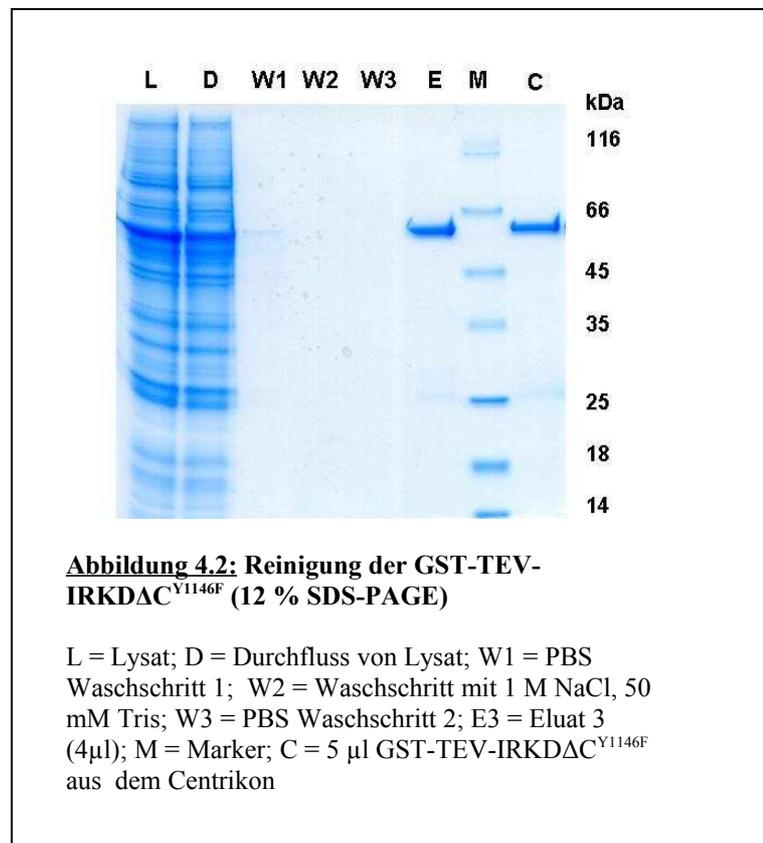
Mutanten wiesen im SDS-Gel

das erwartete

Molekulargewicht von 65 kDa

auf und konnten in reiner

Form separiert werden.



Konstrukt	Ausbeute [mg]/1*10 ⁸ Zellen
GST-TEV-IRKDΔC ^{WT}	1,2
GST-TEV-IRKDΔC ^{Y1146F}	1,5
GST-TEV-IRKDΔC ^{Y1150F}	1,9
GST-TEV-IRKDΔC ^{Y1151F}	1,3

Tabelle 4.3: Dokumentation der Ausbeuten nach Reinigung von GST-TEV-IRKDΔC-Konstrukte

4.1.6 Proteolytische Spaltung der GST-TEV-IRKD-Kinasekonstrukte

Alle generierten Kinasekonstrukte tragen zwischen dem GST-Tag und der Kinasesequenz eine Erkennungsmotiv für die TEV-Protease (ENLYFQ↓G). Dadurch ist es möglich die Kinasen vom GST-Tag abzutrennen und sie somit zu monomerisieren. Dadurch ist eine gesonderte Untersuchung der

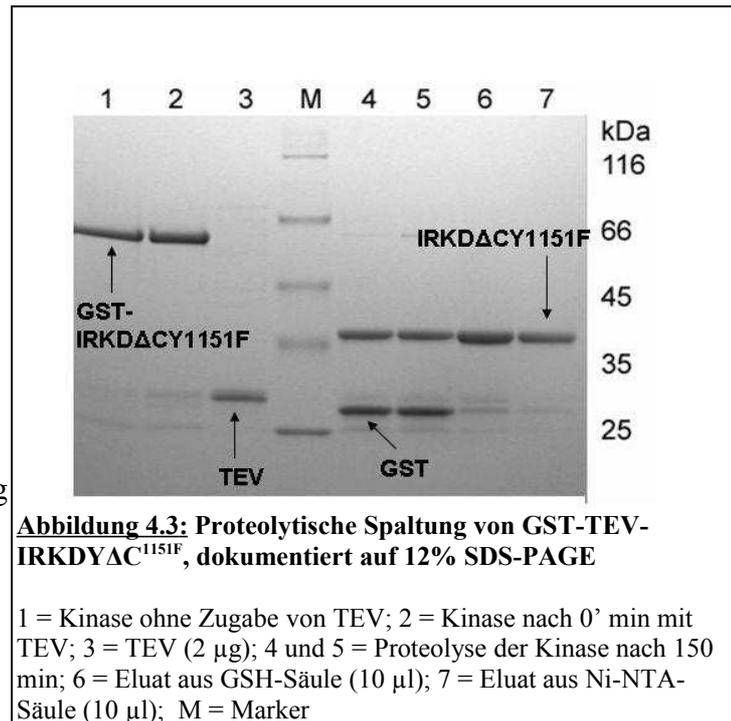
Kinaseuntereinheiten in der nativen PAGE, bei der die einzelnen

Phosphorylierungsstufen unterschieden werden können, möglich.

Durch mehrere Testproteolysen konnten die bestmöglichen Bedingungen für die Abtrennung des GST-Tags ermittelt werden.

Eine Reaktionsdauer von 150 min bei 30°C erwies sich als optimal und wurde zur

Herstellung monomerer Kinasen angewendet. Die im Spaltungsansatz noch verbliebenen Reste der ungeschnittenen Kinase, sowie der abgespaltene GST konnten über Glutathion-Sepharose-Affinitätschromatographie (6.2.4.1) entfernt werden. Die TEV-Protease besitzt einen Hexahistidintag (His-Tag), der für die Entfernung der Protease über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie (6.2.4.2) genutzt wird. Abschließend wurden die monomeren Kinasen auf eine Konzentration von ca. 0,5 µg/µl im Centrikon aufkonzentriert (6.2.4.3). In der Abbildung 4.3 ist der Reinigungsverlauf der IRKDΔC^{Y1151F} auf einer 12 % SDS-PAGE dokumentiert und wird an dieser Stelle stellvertretend für alle C-terminal delitierten Kinasekonstrukte gezeigt. Das Gel stellt die noch unverdaute Kinase bei 65 kDa (Spur 1) sowie das Protein, entnommen aus dem Spaltungsansatz sofort nach der Zugabe der TEV-Protease (Spur 2) dar. Eine Probe, entnommen aus dem Spaltungsansatz nach 150 minütiger Inkubation mit der TEV-Protease, ist in der Spur 4 und 5 gezeigt.

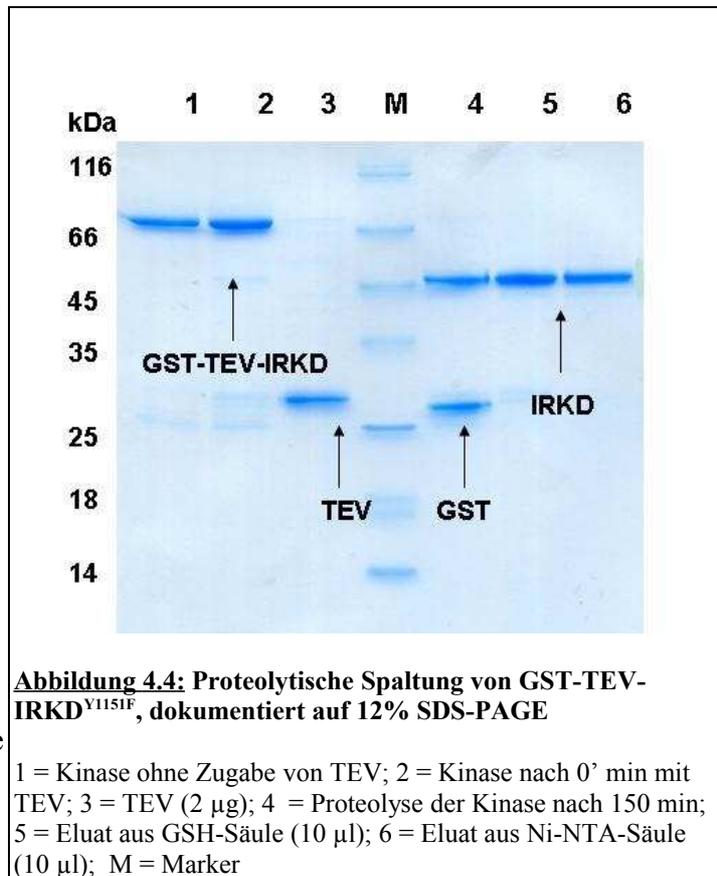


Es ist deutlich zu erkennen, dass die GST-TEV-IRKD Δ C^{Y1151F} nahezu vollständig von der TEV-Protease umgesetzt wurde.

Neben der monomeren Kinase, die im SDS-Gel als eine 36kDa Bande erscheint, ist die abgetrennte GST-Bande bei 29 kDa zu sehen. Nach anschließenden Reinigungsschritten zur Entfernung vom GST (Spur 6) und der TEV-Protease (Spur 7) konnte die monomere Kinase aufkonzentriert und für weitere Versuche eingesetzt werden.

Komplementär zur proteolytischen Spaltung der C-terminal deletierten Kinasen ist in der Abbildung 4.4 die Monomerisierung der Volllängenkinasen am Beispiel der GST-TEV-IRKD^{Y1151F} dargestellt.

Das SDS-Gel zeigt die noch unverdaute Kinase (Spur1) bei 73kDa, die Spaltungsansätze sofort nach TEV-Zugabe (Spur 2) und nach 150 Minuten Inkubationszeit (Spur 4). Im Gel sind der abgetrennte GST-Tag bei 29kDa und die monomere Kinase bei 46kDa deutlich zu sehen. Die nachfolgenden Reinigungsschritte sind in den Spuren 5 und 6 dargestellt. Auch bei allen Volllängenkinasen konnte die proteolytische Spaltung erfolgreich durchgeführt werden.

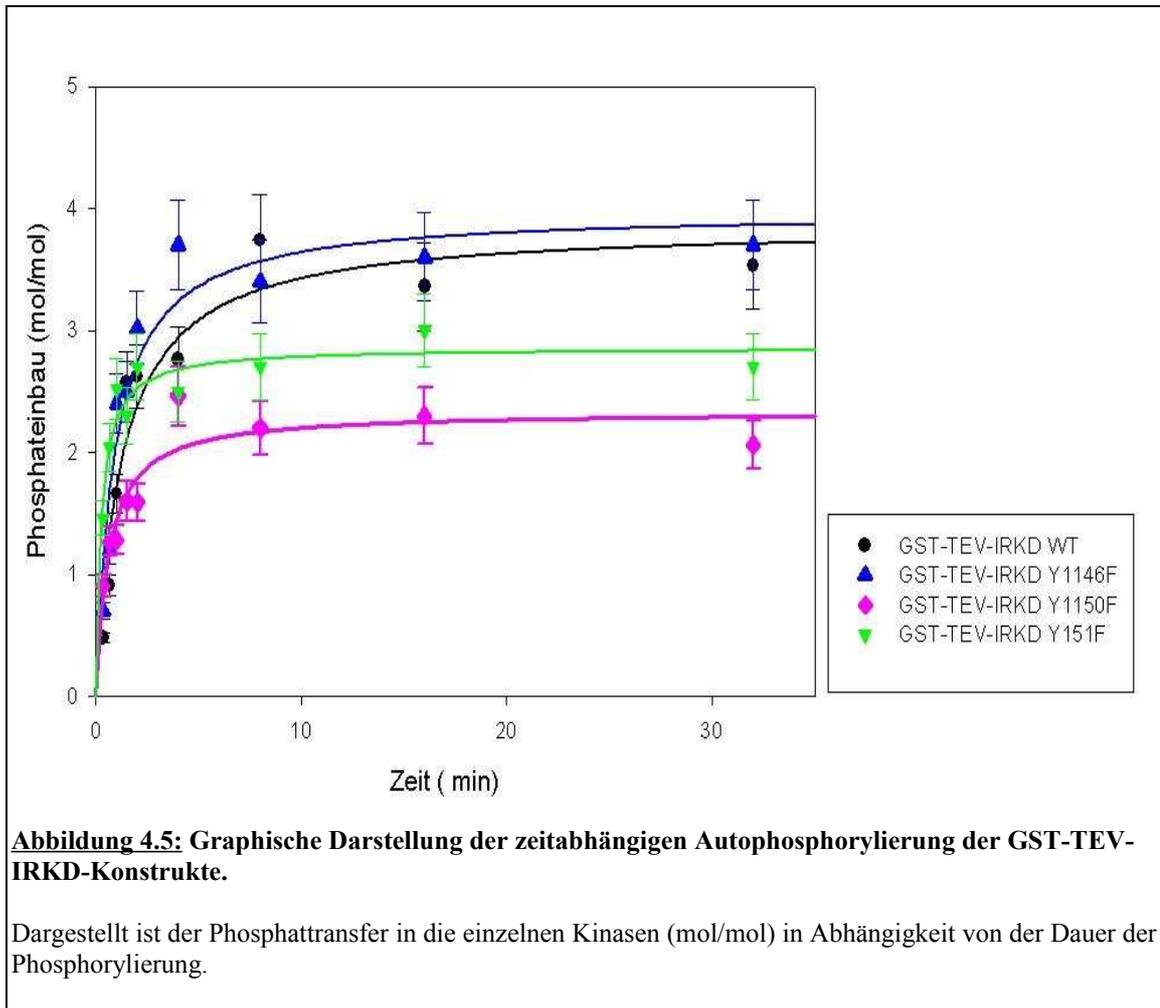


4.2 Charakterisierung der generierte Kinasekonstrukte

Die gereinigten Kinasekonstrukte wurden auf ihre Aktivität bezüglich der Auto- und Substratphosphorylierung untersucht. Alle Versuche wurde mehrmals (n=3-5) durchgeführt und werden in dieser Arbeit im Mittel oder exemplarisch gezeigt.

4.2.1 Autophosphorylierung der GST-TEV- IRKD-Konstrukte

Die Charakterisierung durch zeitabhängige radioaktive Autophosphorylierung sollte zeigen, wie die einzelnen Austausch der Tyrosine gegen Phenylalanin die Phosphorylierungseigenschaften der einzelnen Kinasemutanten beeinflussen. Um direkte Vergleiche zwischen den einzelnen Kinasevarianten durchführen zu können, wurden alle Versuche unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden alle Kinasemutanten unter Standardbedingungen (0,5µM Kinase, 1µM ATP, 30mM Mg²⁺, 5mM DTT) für die zeitabhängige Autophosphorylierungsreaktionen eingesetzt. Die spezifische Aktivität betrug 100cpm/pmol ATP. Zu festgelegten Zeitpunkten wurden den Phosphorylierungsansätzen Proben entnommen, die Reaktionen mit SDS-Probenpuffer abgestoppt und die Proben im 12% SDS-Gel (6.2.5.3) nach Größe aufgetrennt. Die Gele wurden anschließend in Peptidfärbelösung angefärbt (6.2.5.5). Die Kinasebanden wurden aus den SDS-Gelen ausgeschnitten und mittels Cerenkov-Messung quantifiziert. Um quantitative Aussagen über die Aktivität der Kinasekonstrukte treffen zu können, wurde der Phosphattransfer (mol übertragenes Phosphat), der Phosphateinbau (mol übertragenes Phosphat/ mol Kinase) und die Initialgeschwindigkeit (mol übertragenes Phosphat/ mol Kinase/ min) ermittelt und graphisch in der Abbildung 4.5 dargestellt.

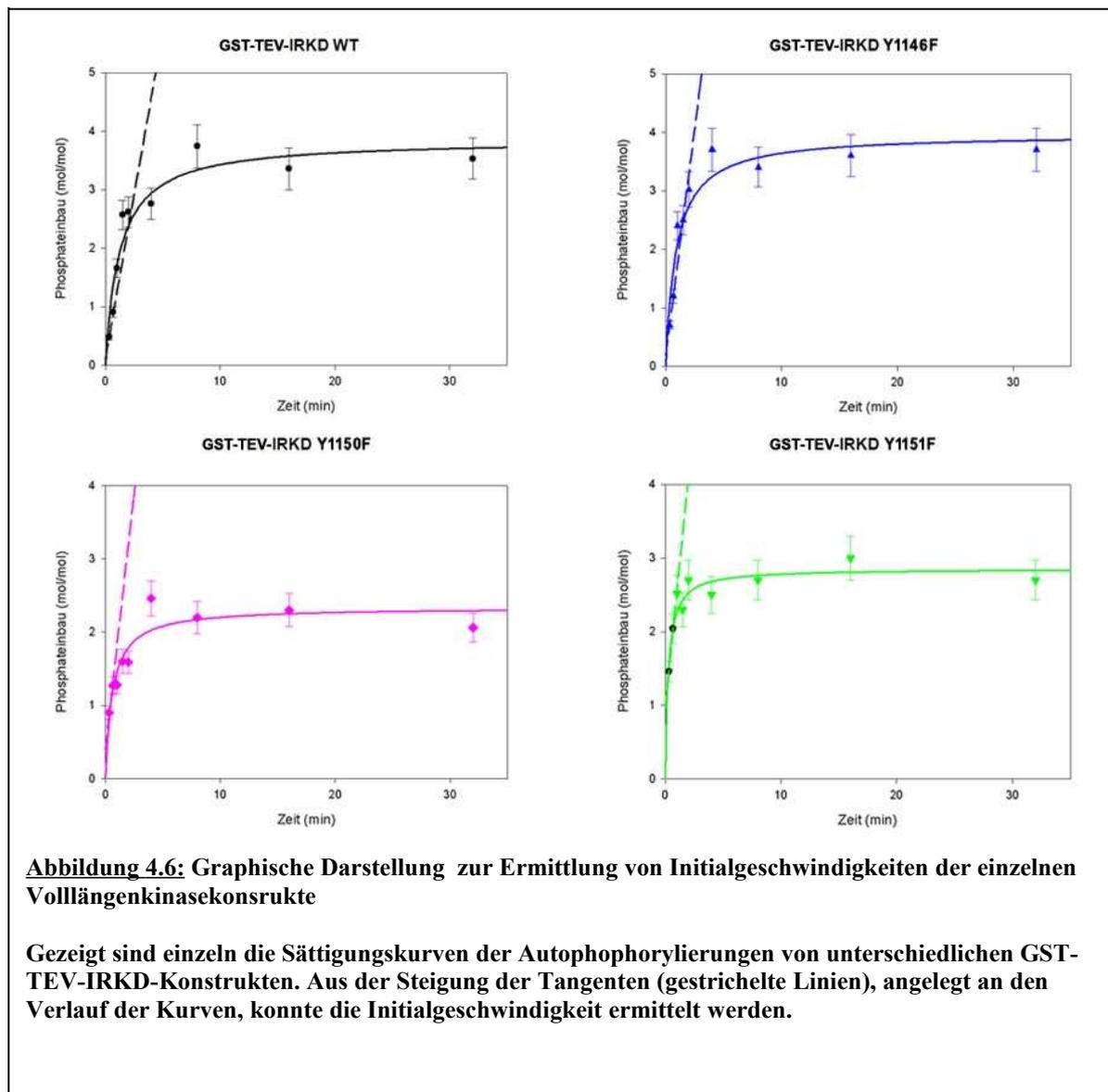


Aus dem Vergleich der verschiedenen Kinasekonstrukte (Abbildung 4.5) werden die Unterschiede des Autophosphorylierungsverhaltens einzelner Mutanten deutlich. So heben sich die GST-TEV-IRKD^{WT} und die GST-TEV-IRKD^{Y1146F} deutlich von den anderen Kinasen ab. Diese Konstrukte zeigen den höchsten Phosphateinbau und die GST-TEV-IRKD^{Y1146F} zeigt die höchste Initialgeschwindigkeit (Tabelle 4.4).

	Phosphateinbau (mol/mol)	Initialgeschwindigkeit (mol/mol/min)
GST-TEV-IRKD ^{WT}	3,7	1,8
GST-TEV-IRKD ^{Y1146F}	3,7	2,8
GST-TEV-IRKD ^{Y1150F}	2,5	1,5
GST-TEV-IRKD ^{Y1151F}	3	2,6

Tabelle 4.4: Phosphateinbau und Initialgeschwindigkeiten der Vollängenkinase-Konstrukten

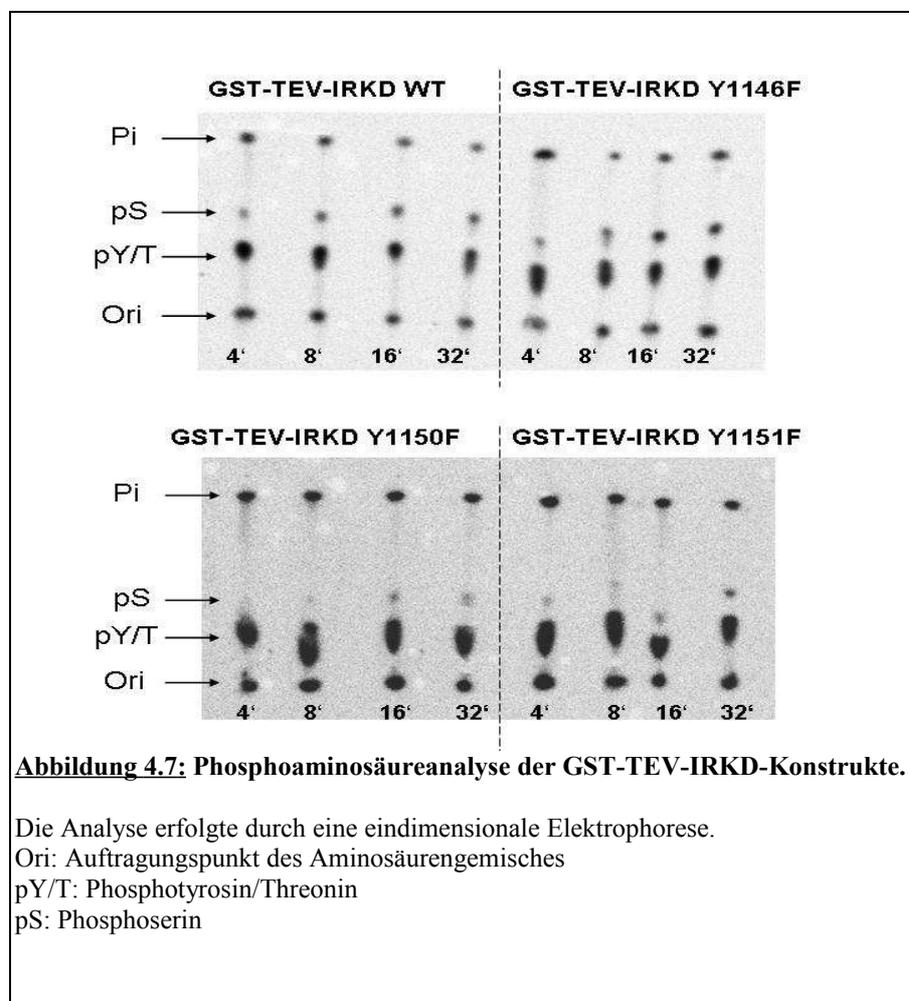
Die Initialgeschwindigkeiten der Kinasen konnten aus der Steigung der Tangenten, die an das Diagramm in den initialen Phase angelegt wurden (Abbildung 4.6, gestrichelte Linien), bestimmt werden.



Nach der durchgeführten Phosphorylierungsreaktion wurden die Proteine zu den Zeitwerten von 4, 8, 16 und 32 Minuten in den ausgeschnittenen Gelbanden tryptisch verdaut und die Phosphopeptide aus dem Gel eluiert (6.2.10.1). Die so eluierten Peptide wurden anschließend einer Phosphoaminosäureanalyse (PASA) unterzogen. Die Auftrennung der Phosphopeptide

erfolgte über eine eindimensionale Elektrophorese (pH1,9, 6.2.11). Die Auswertung der Elektrophorese im Phosphoimager (6.2.11.1) ist in der Abbildung 4.7 dargestellt.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, phosphorylieren sich die Insulinrezeptorkinasen während der Aktivierung an Tyrosinresten. Frühere Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass der Insulinrezeptor als natürliches Dimer nach Insulinstimulierung duale Aktivität aufweist (Heidenreich *et al.*, 1994), d.h. dass er sich selbst an Tyrosin- und Serinresten phosphoryliert. Eine Phosphoaminosäureanalyse sollte zeigen wie die einzelnen eingeführten Mutationen in den GST-TEV-IRKD-Konstrukten die Fähigkeiten der Kinase zur dualen Spezifität zu beeinflussen vermögen.



Zu beobachten ist, dass außer Tyrosinphosphorylierungen auch Serinphosphorylierungen für alle Kinasen detektiert werden konnten (Tabelle 4.5) .

Zeit [min]	pY / T [%]				pS [%]			
	4	8	16	32	4	8	16	32
GST-TEV-IRKD ^{WT}	95	84	80	76	5	16	20	24
GST-TEV-IRKD ^{Y1146F}	90	83	78	70	10	17	22	30
GST-TEV-IRKD ^{Y1150F}	100	99	97,5	97	-----	1	2,5	3
GST-TEV-IRKD ^{Y1151F}	97,5	97	94	92	2,5	3	6	8

Tabelle 4.5: Phosphoaminosäurezusammensetzung der GST-TEV-IRKD-Konstrukte

Die Daten bestätigen, dass der Anteil der Serinphosphate bei jedem untersuchten Konstrukt mit dem zeitlichen Verlauf der Phosphorylierung steigt. Deutlich ist auch die starke Abnahme der Serinphosphorylierung für die GST-TEV-IRKD^{Y1150F} und GST-TEV-IRKD^{Y1151F}, verglichen mit den GST-TEV-IRKD^{WT} und GST-TEV-IRKD^{Y1146F}, zu verzeichnen. Die GST-TEV-IRKD^{Y1146F} hebt sich sowohl in ihrem Autophosphorylierungsverhalten als auch in ihrer Fähigkeit zur dualen Aktivität von den anderen Kinasekonstrukten ab. Folgende Tendenz, sowohl in der Aktivierung als auch in der dualen Aktivität, konnte verzeichnet werden (absteigend gezeigt): GST-TEV-IRKD^{WT} = GST-TEV-IRKD^{Y1146F} > GST-TEV-IRKD^{Y1151F} > GST-TEV-IRKD^{Y1150F}.

Neben der radioaktiven Autophosphorylierung wurden die hergestellten monomeren Formen der unterschiedlichen Vollängenkinasemutanten auf das Autophosphorylierungsverhalten in der nativen Page untersucht. In der nativen PAGE unterscheiden sich phosphorylierte Proteine in ihrem elektrophoretischen Laufverhalten da durch die zusätzlichen negativen Ladungen ihre Mobilität höher ist und somit die einzelnen Phosphorylierungsstufen eines Proteins sichtbar von einander getrennt werden.

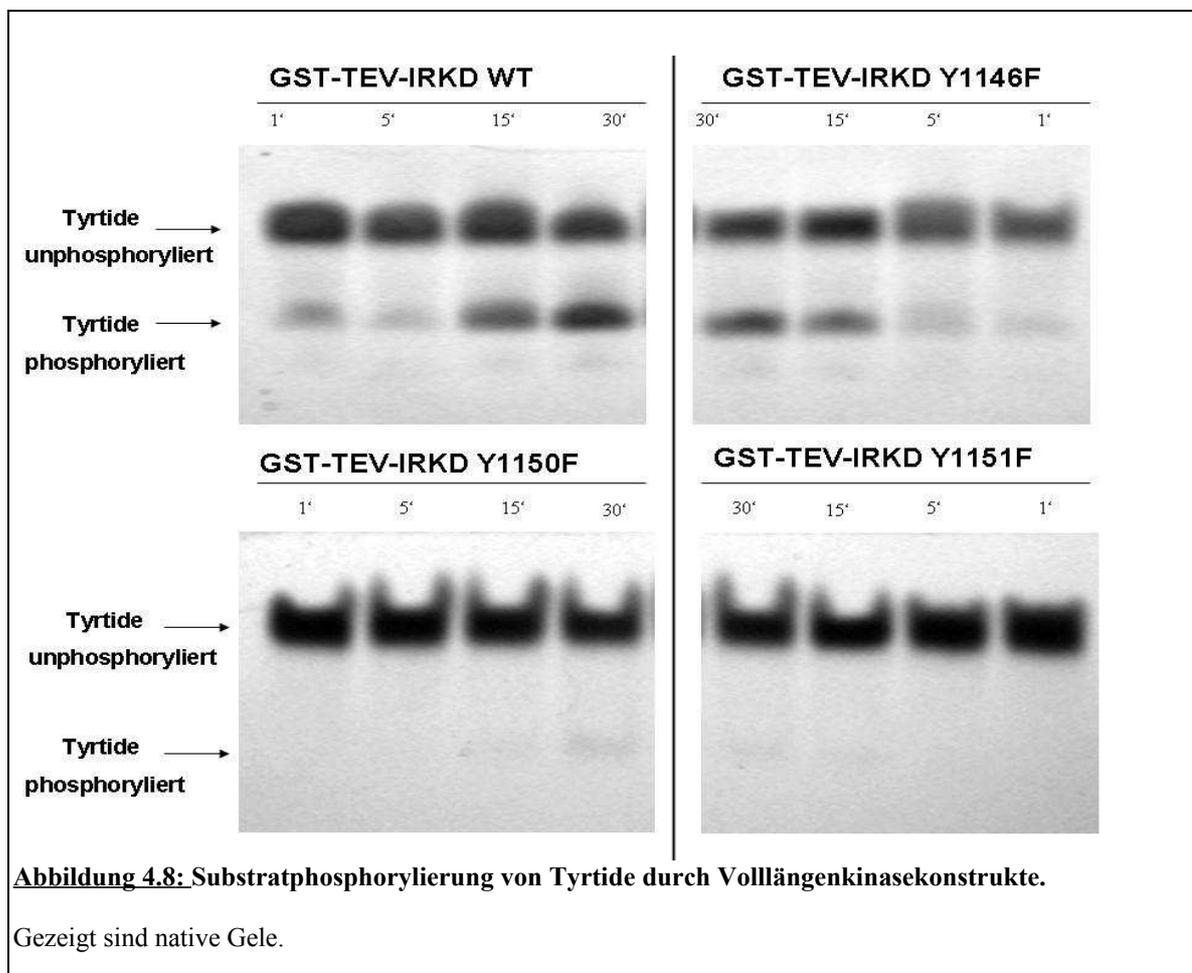
Für die untersuchten Kinase-Konstrukte konnte keine eindeutige Auftrennung der einzelnen Phosphorylierungsstufen gezeigt werden (Anhang/Abbildung 8.10). Die Kinasen schifteten aufgrund ihrer hohen Molekulargewichte zu sehr stark im nativen Gel.

4.2.2 Substratphosphorylierung durch GST-TEV-IRKD-Konstrukte

Alle generierten GST-TEV-IRKD-Konstrukte zeigten Autophosphorylierungsaktivität. Von Interesse ist hier auch das Substratphosphorylierungsverhalten der generierten Kinasekonstrukte. Als Substrat wurde hierfür Tyrtide verwendet. Bei Tyrtide handelt es sich

um ein 9,2 kDa großes Peptid aus dem Insulinrezeptorsubstrat 1 (human IRS-1). Es besitzt eine Phosphorylierungsstelle (Y612) für Rezeptortyrosinkinasen, die in der Erkennungssequenz YMXM liegt. Aufgrund des unterschiedlichen Laufverhaltens von unphosphorylierten und phosphorylierten Tyrtide in der nativen PAGE kann die Aktivität der verwendeten Kinase optisch dargestellt werden.

Für den Vergleich der unterschiedlichen Konstrukte wurde eine zeitabhängige Substratphosphorylierung von 50µM Tyrtide durch 50nM Kinase unter Standardbedingungen (10mM ATP, 30mM MgCl₂, 1M DTT) durchgeführt. Zu festgelegten Zeitpunkten wurden den Reaktionsansätzen Proben entnommen, die Reaktion durch Zugabe von nativen Probenpuffer terminiert und die Proben über das native Gel (6.2.5.4) aufgetrennt (Abbildung 4.8).



Wie aus der Abbildung 4.8 deutlich zu erkennen ist, konnte für die GST-TEV-IRKD^{Y1150F} und für GST-TEV-IRKD^{Y1151F} keine nennenswerte katalytische Aktivität in der

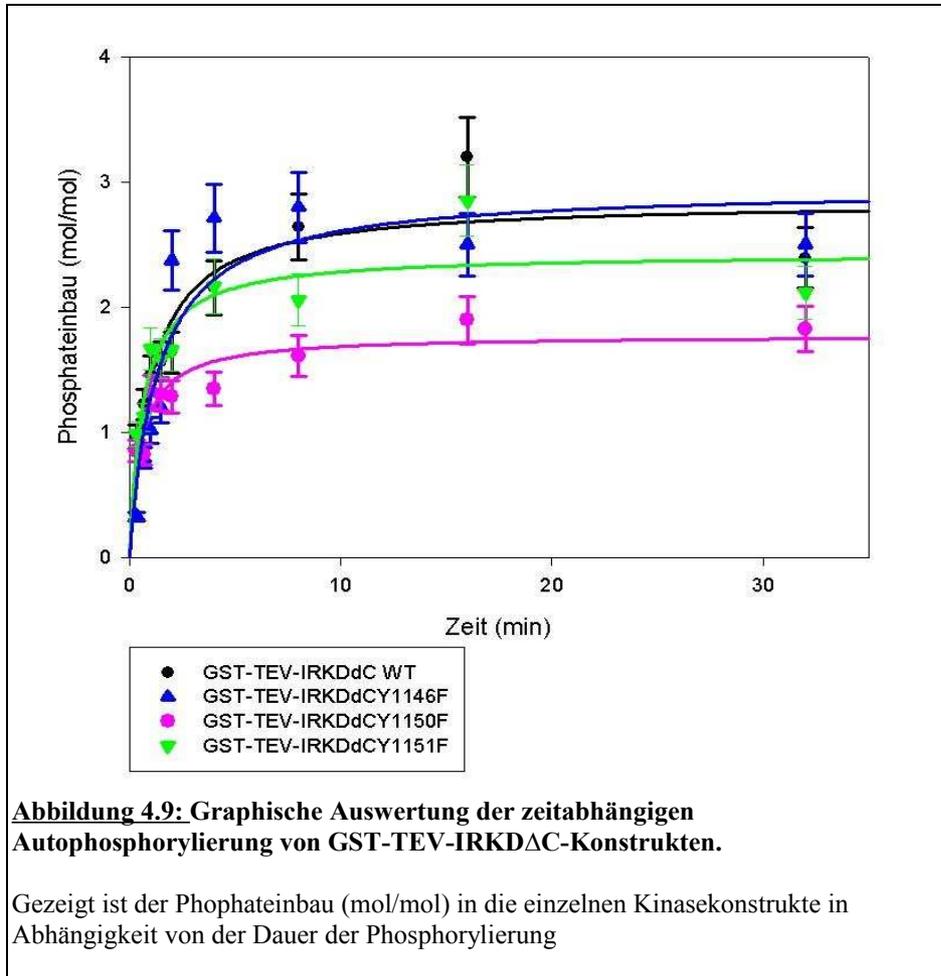
Substratphosphorylierung nachgewiesen werden, obwohl beide Konstrukte katalytische Aktivität in der Autophosphorylierung zeigten.

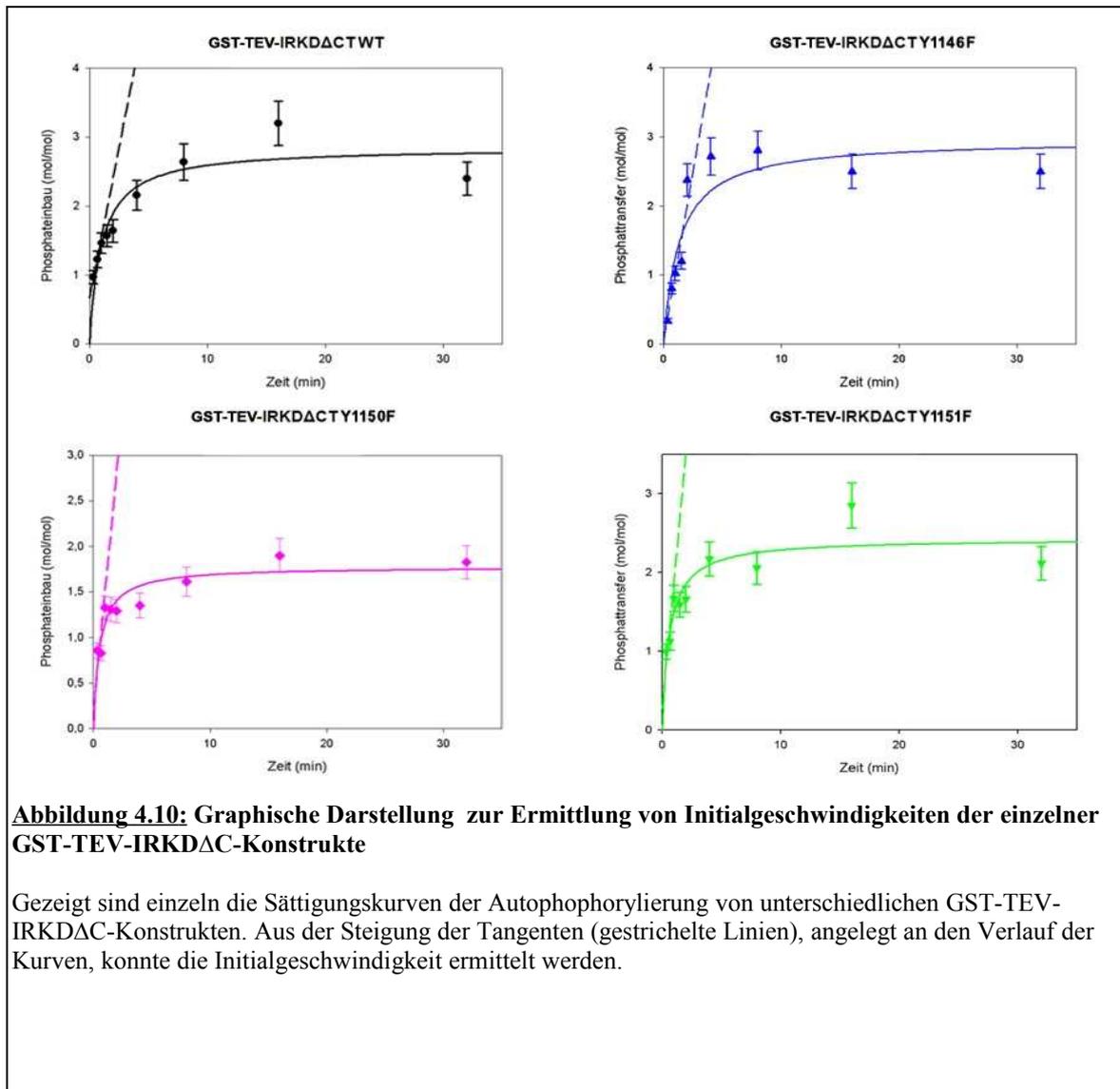
Ergänzend hierzu wurde eine Substratphosphorylierung von Tyrtide durch unterschiedliche monomere, vorphosphorylierte Kinasekonstrukte durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Die monomeren Kinasen wurden vorab jeweils mit 10 μ M unter Standardbedingungen (1mM ATP, 30mM MgCl₂, 1mM DTT) für 30 Minuten vorphosphoryliert. Durch die erhöhte lokale Konzentration der Kinasen (10 μ M) werden die Monomere aktiviert, vergleichbar zur GST-vermittelten Dimerisierung. Anschließend wurden die monomeren, aktivierten Kinasekonstrukte für die Phosphorylierungsreaktion eingesetzt. Vergleichbar mit den GST-Dimeren konnte auch hier nur für IRKD^{WT} und IRKD^{Y1146F} eine katalytische Aktivität festgestellt werden.

4.2.3 Autophosphorylierung der GST-TEV-IRKD Δ C-Konstrukte

Um den Einfluss des C-Terminus auf das Aktivierungsverhalten der einzelnen GST-TEV-IRKDAC-Konstrukte zu analysieren, wurden diese einer Autophosphorylierungsreaktion unterzogen. Es wurde eine zeitabhängige radioaktive Autophosphorylierung durchgeführt, um speziell die Aktivität der jeweiligen Kinasekonstrukte quantitativ bestimmen zu können. Für die Autophosphorylierungsreaktion wurde 1mM γ [³²P]-ATP mit einer spezifischen Aktivität von ca. 150 cpm/ pmol ATP und je 0,5 μ M Kinasekonstrukte eingesetzt. Die Autophosphorylierungsreaktion wurde unter Standardbedingungen (30 mM MgCl₂, 5 mM DTT) zeitabhängig durchgeführt. Die radioaktiven Proben wurden mittels 12%iger SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, in Peptidfärbelösung angefärbt und die Radioaktivität mittels einer Autoradiographie (6.2.9.1) analysiert. Die Proteinbanden wurden aus den SDS-Gelen ausgeschnitten und über Cerenkov-Messung quantifiziert. Um quantitative Aussagen über die Aktivität der Kinasekonstrukte treffen zu können, wurde der Phosphattransfer (mol übertragenes Phosphat), der Phosphateinbau (mol übertragenes Phosphat/ mol Kinase) und die Initialgeschwindigkeit (mol übertragenes Phosphat/ mol Kinase/min) ermittelt und graphisch in der Abbildung 4.9 und der Abbildung 4.10 dargestellt. Aus den vorliegenden Daten wird deutlich, dass schon nach 5 Minuten ein Sättigungsniveau für alle untersuchten Kinasen erreicht ist. Dabei fand ein höherer Phosphateinbau in die GST-TEV-IRKDAC^{WT}

statt, gefolgt von der GST-TEV-IRKD Δ C^{Y1146F} und der GST-TEV-IRKD Δ C^{Y1151F}. Der niedrigste Phosphateinbau konnte bei der GST-TEV-IRKD Δ C^{Y1150F} detektiert werden (Tabelle 4.6).

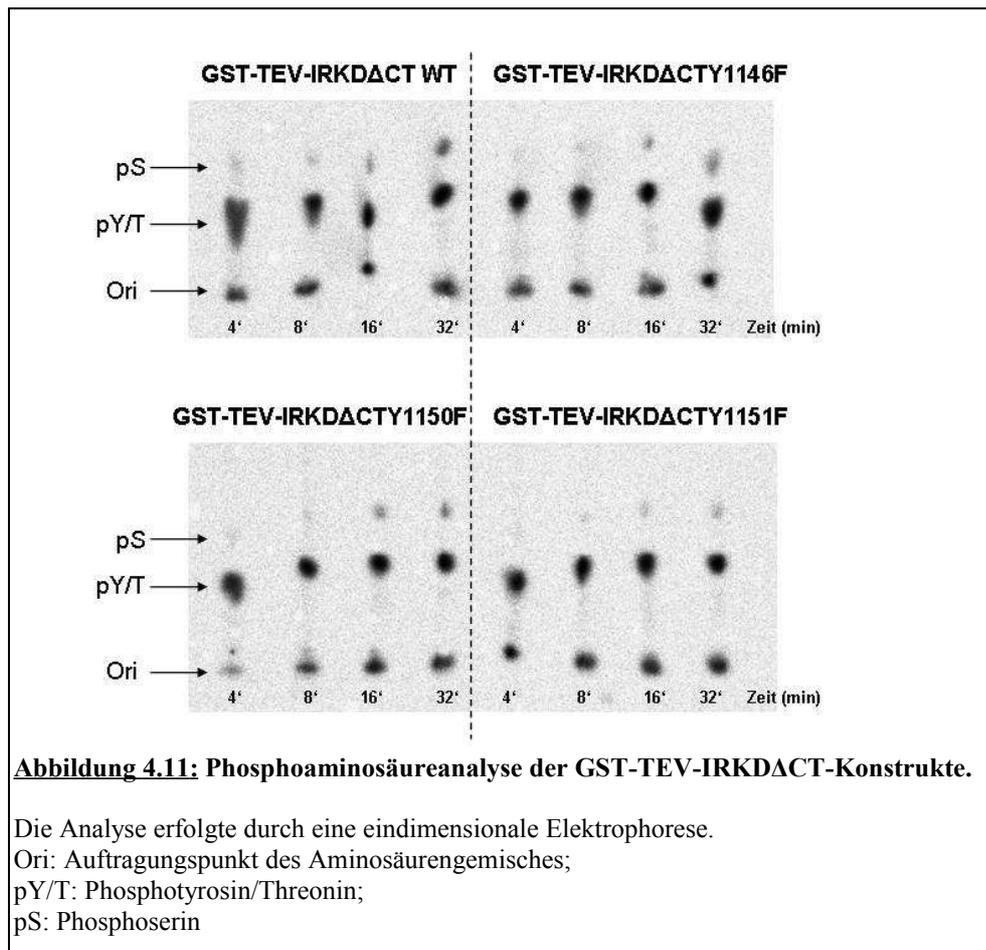




	Phosphateinbau (mol/mol)	Initialgeschwindigkeit (mol/mol/min)
GST-TEV-IRKΔC ^{WT}	3,2	1,7
GST-TEV-IRKΔC ^{Y1146F}	2,8	1
GST-TEV-IRKΔC ^{Y1150F}	2	1,4
GST-TEV-IRKΔC ^{Y1151F}	2,8	1,7

Tabelle 4.6: Phosphateinbau und Initialgeschwindigkeiten der GST-TEV-IRKΔC - Konstrukte

Im Anschluß an die Phosphorylierungsreaktion wurden die Gelbanden der 4, 8, 16 und 32 Minutenwerte tryptisch verdaut und die Phosphopeptide aus dem Gel eluiert (6.2.10.1). Nach tryptischer Elution wurden die Proben elektrophoretisch auf ihre Phosphoaminosäurezusammensetzung untersucht (pH 1,9). Die Ergebnisse dieser Analysen sind in der Abbildung 4.11 dargestellt und in der Tabelle 4.7 zusammengefasst.



Zeit [min]	pY / T [%]				pS [%]			
	4	8	16	32	4	8	16	32
GST-TEV-IRKΔACT ^{WT}	92	91	88	82	8	9	12	20
GST-TEV-IRKΔACT ^{Y1146F}	92	94	93	85	8	6	7	15
GST-TEV-IRKΔACT ^{Y1150F}	97	96	91	89	3	4	9	10
GST-TEV-IRKΔACT ^{Y1151F}	98	94	93	91	2	6	7	8

Tabelle 4.7: Phosphoaminosäurezusammensetzung der GST-TEV-IRKΔACT-Konstrukte

Die Daten bestätigen, dass die Serinphosphorylierung bei jedem untersuchten Konstrukt zeitlich nachgeschaltet erfolgt. Deutlich zu verzeichnen ist die starke Abnahme der Serinphosphorylierung für die GST-TEV-IRKD^{Y1150F} und GST-TEV-IRKD^{Y1151F}, verglichen mit der GST-TEV-IRKD^{WT} und der GST-TEV-IRKD^{Y1146F}.

4.2.4 Autophosphorylierung der monomeren IRK Δ CT-Konstrukte

Ergänzend zu den durchgeführten Untersuchungen der GST-TEV-IRK Δ CT-Konstrukte sollten die entsprechenden monomere Kinasekonstrukte untersucht werden.

Für die Charakterisierung von monomeren Kinasen konnten mehrere Verfahren genutzt werden. Als erstes wurde das Autophosphorylierungsverhalten der einzelnen Kinasen im nativen Gel untersucht werden. Diese Methode ermöglicht eine optische Analyse einzelner Phosphorylierungsstufen des untersuchten Proteins.

Für die zeitabhängige Autophosphorylierungsreaktion wurden je 10 μ M Kinasekonstrukte und 5 mM ATP eingesetzt (30 mM MgCl₂, 1 mM DTT). Zu festgelegten Zeitpunkten (0'-45' min) wurden den Phosphorylierungsansätzen Proben entnommen und in der nativen PAGE (6.2.5.4) aufgetrennt. Die Auftrennung der phosphorylierten Proben in der nativen PAGE ist in der Abbildung 4.12 dargestellt. Für die IRK Δ CT^{WT} konnten 6 Phosphorylierungsstufen detektiert werden, für alle untersuchten IRK Δ CT-Mutanten jeweils 5. Die monomere IRK Δ CT^{WT} kann an folgenden Positionen phosphoryliert werden: Tyrosin 972 und 960 in der Juxtamenbranregion, Tyrosine 1140, 1150, 1151 in der Aktivierungsschleife und ein Serinrest im N-Terminus der Kinase. Den IRK Δ CT-Mutanten fehlt jeweils eine Tyrosinphosphorylierungsstelle in der Aktivierungsschleife.

Die nativen Gele konnten im folgenden densitometrisch ausgewertet werden.

In der Abbildung 4.13 ist der durchschnittliche Phosphateinbau (mol/mol) für den Zeitwert 45 Minuten zusammengefasst.

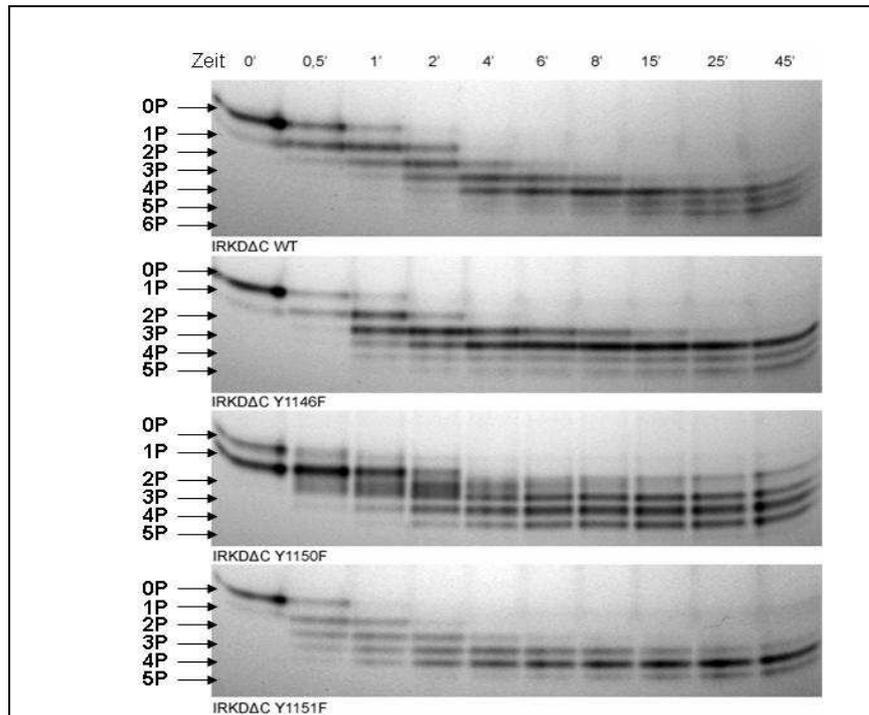


Abbildung 4.12: Autophosphorylierung der IRKDAC-Konstrukte.

Die zeitabhängige Autophosphorylierung wurde mit 10µM Kinase und 5mM ATP durchgeführt. Auftrennung in der nativen PAGE.

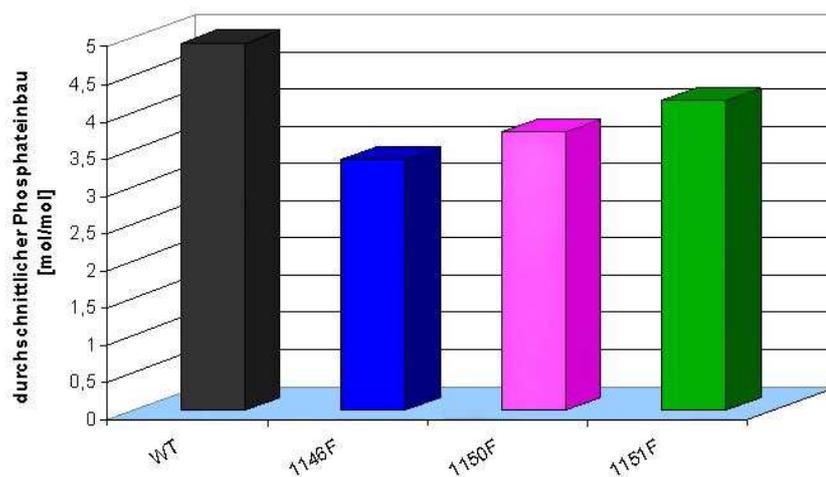
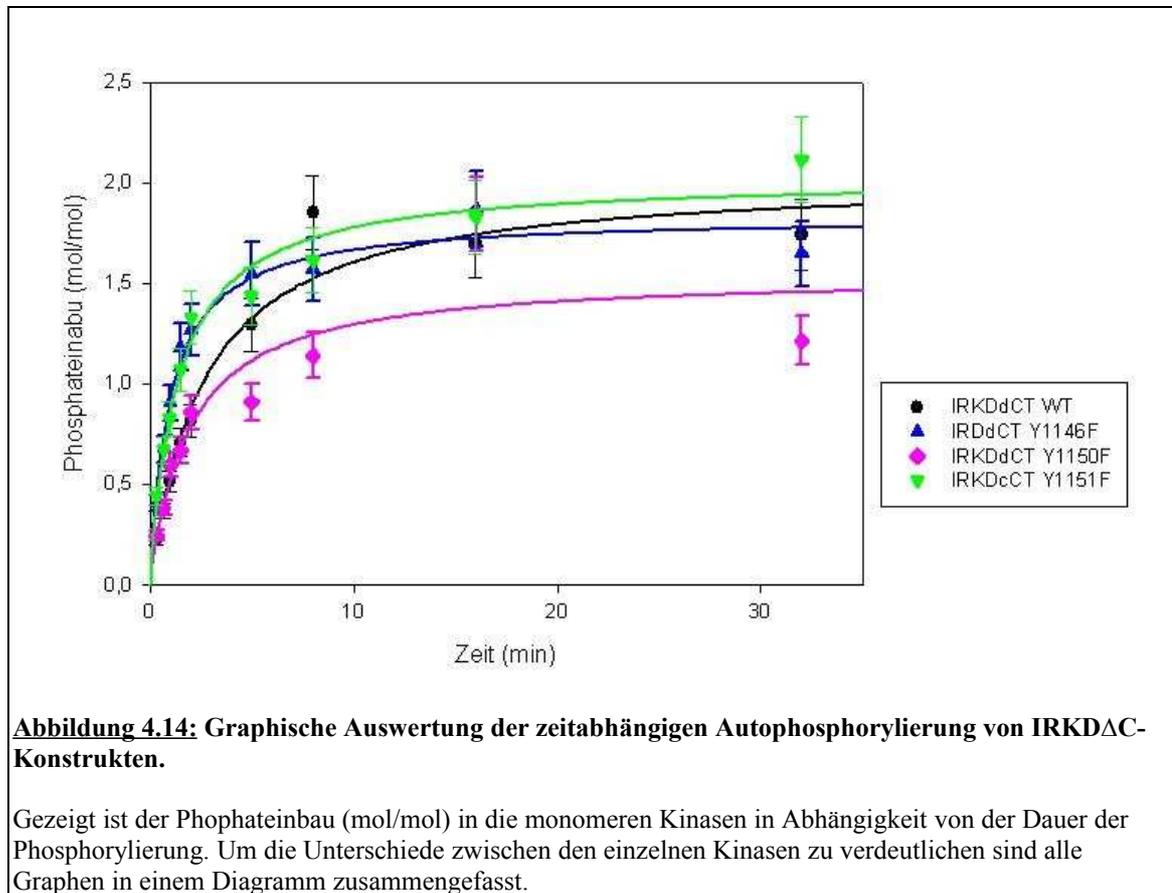


Abbildung 4.13: Autophosphorylierung der IRKDC-T-Konstrukte nach 45 Minuten.

Graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung des Phosphateinbaus nach 45' Autophosphorylierung (5mM ATP, 10m Kinase). Ermittelt wurden die Hauptphosphorylierungsstufen der einzelnen Kinasekonstrukte. Die Y-Achse entspricht dem Phosphateinbau (mol/mol).

Die IRKDΔC^{WT} wurde mit durchschnittlich 4,9 Phosphaten pro Kinaseuntereinheit am stärksten phosphoryliert. Bei der IRKDΔC^{Y1151F} wurde die Hauptphosphorylierungsstufe durchschnittlich mit 4,2 Phosphaten, gefolgt von der IRKDΔC^{Y1150F} mit 3,7 und IRKDΔC^{Y1146F} mit 3,4 Phosphaten pro Kinaseuntereinheit gemessen.

Neben der optischen Analyse sollten die monomeren IRKDΔC-Konstrukte in einer radioaktiven Autophosphorylierungsreaktionen untersucht werden. Für diese Versuche wurde 1 mM ATP und γ [³²P]-ATP mit einer spezifischen Aktivität von ca. 150 cpm/ pmol ATP und je 2 μ M monomerer Kinase eingesetzt. Die Reaktionen verliefen unter Standardbedingungen (30 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 50 mM Tris pH 7,5, RT). Zu bestimmten Zeitpunkten wurden den Reaktionsansätzen Proben entnommen, die Reaktionen wurden im SDS-Probenpuffer abgestoppt und über 12 % SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt (6.2.5.3). Die Gele wurden angefärbt, die Proteinbanden aus den Gelen ausgeschnitten und ihre Radioaktivität gemessen. Abschließend konnte aus der Cerenkov-Strahlung der Phosphateinbau [mol Phosphat/ mol Kinaseuntereinheit] ermittelt werden, und als Funktion der Zeit in der Abbildung 4.14 dargestellt werden.



Um eine quantitative Aussage über das Aktivierungsverhalten der monomeren Kinasekonstrukte treffen zu können, wurde neben dem Phosphateinbau auch die Initialgeschwindigkeit [pmol Phosphat/ pmol Kinaseuntereinheit/ min] bestimmt. Die Initialgeschwindigkeiten wurde als Steigung der Tangente, die an den initialen Bereich der Sättigungskurven angelegt wurde, ermittelt (Abbildung 4.15).

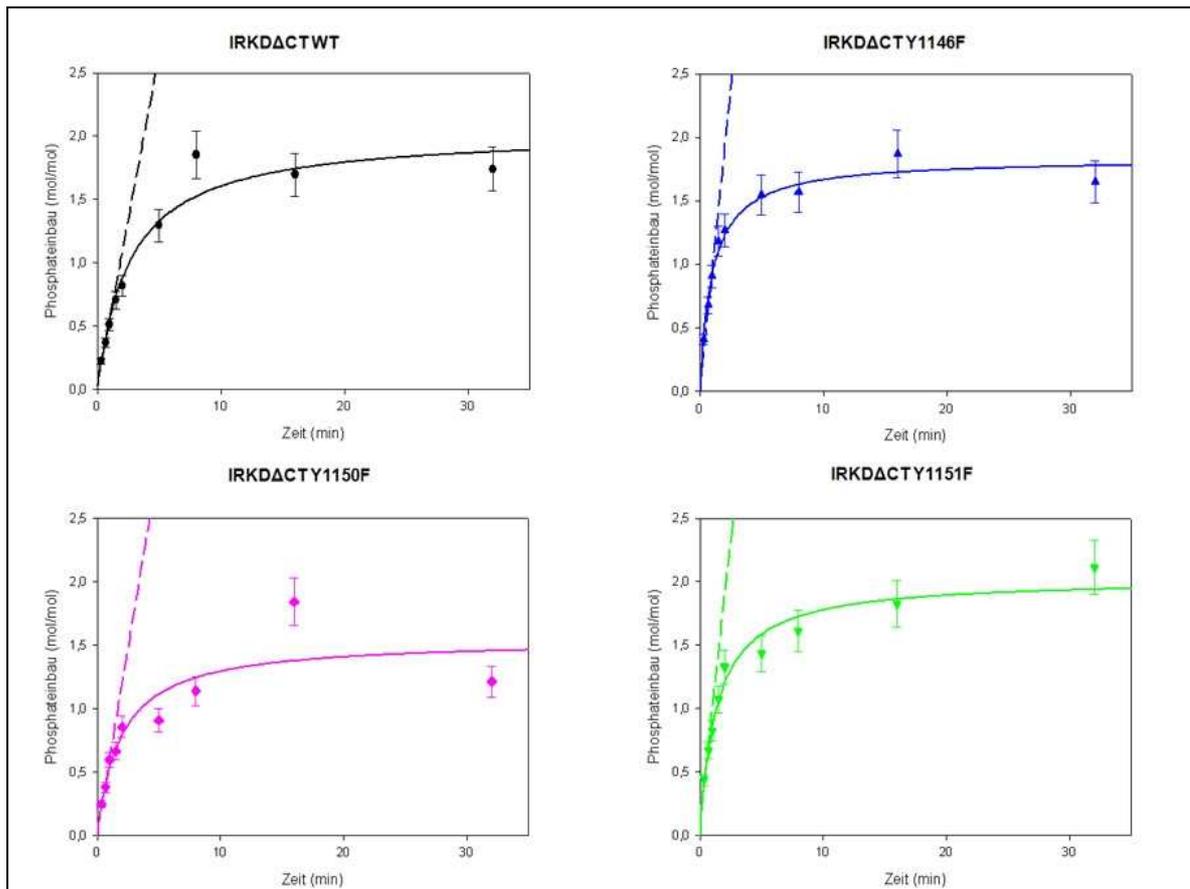


Abbildung 4.15: Graphische Darstellung zur Ermittlung von Initialgeschwindigkeiten der einzelnen IRK Δ C-Konstrukte.

Gezeigt sind einzeln die Sättigungskurven der Autophosphorylierung von unterschiedlichen IRK Δ C-Konstrukten. Aus der Steigung der Tangenten (gestrichelte Linien), angelegt an den Verlauf der Kurven, wurde die Initialgeschwindigkeit ermittelt.

Nach 16 Minuten scheint das Maximum des Phosphateinbaus für alle Kinasekonstrukte erreicht zu sein. Dabei verhalten sich alle Kinasen nahezu gleich. Die IRK Δ C^{Y1150F} zeigte aber im Durchschnitt eine etwas geringere Aktivität als die drei anderen Kinasen.

Die höchsten Initialgeschwindigkeiten zeigten die IRKD Δ C^{Y1146F} und die IRKD Δ C^{Y1151F} mit 1,0 bzw. 0,9 mol Phosphat/ mol Kinaseuntereinheit/ min. Die IRKD Δ C^{WT} zeigte die niedrigste Initialgeschwindigkeit mit 0,5 gefolgt von IRKD Δ C^{Y1150F} mit 0,6 mol Phosphat/ mol Kinaseuntereinheit/ min (Tabelle 4.8).

	Phosphateinbau (mol/mol)	Initialgeschwindigkeit (mol/mol/min)
IRKD Δ C ^{WT}	1,9	0,5
IRKD Δ C ^{Y1146F}	2	1
IRKD Δ C ^{Y1150F}	1,2	0,6
IRKD Δ C ^{Y1151F}	2,1	0,9

Tabelle 4.8: Phosphateinbau und Initialgeschwindigkeiten der IRKD Δ C - Konstrukte

4.2.5 Substratphosphorylierung durch GST-TEV-IRKD Δ CT-Konstrukte

In den ersten Schritten der Charakterisierung konnte gezeigt werden, dass die dimeren und die monomeren IRKD Δ CT-Konstrukte eine qualitativ erfassbare katalytische Aktivität in der Autophosphorylierung aufweisen. Von Interesse ist hier auch das Verhalten der generierten Kinasekonstrukte bei der Substratphosphorylierung. Zum Nachweis der Aktivität eignet sich die Phosphorylierung des hIRS-1 Peptides Tyrtide. Zusätzlich wurde die Substratphosphorylierung mit dem artifiziellen Substrat PolyGluTyr durchgeführt, um die Auswirkung von spezifischen Enzym-Substrat-Wechselwirkungen zu untersuchen. Bei PolyGluTyr handelt es sich um ein Heteropolymer mit repetitiven Glutaminsäure-Tyrosin-Sequenzen, im Verhältnis von 4:1 (Glu:Tyr). PolyGluTyr ist aufgrund der sauren Umgebung der Tyrosine ein sehr gutes Substrat für Tyrosinkinase.

Für den Vergleich der unterschiedlichen Konstrukte wurde eine zeitabhängige Substratphosphorylierung von 50 μ M Tyrtide durch 50nM Kinase unter Standardbedingungen (10mM ATP, 30mM MgCl₂, 1M DTT) durchgeführt. Zu festgelegten Zeitpunkten wurden den Reaktionsansätzen Proben entnommen, die Reaktion durch Zugabe von nativem Probenpuffer

terminiert und die die Proben über das native Gel (6.2.5.4) aufgetrennt. In der Abbildung 4.16 sind die nativen Gele der zeitabhängigen Substratphosphorylierung dargestellt.

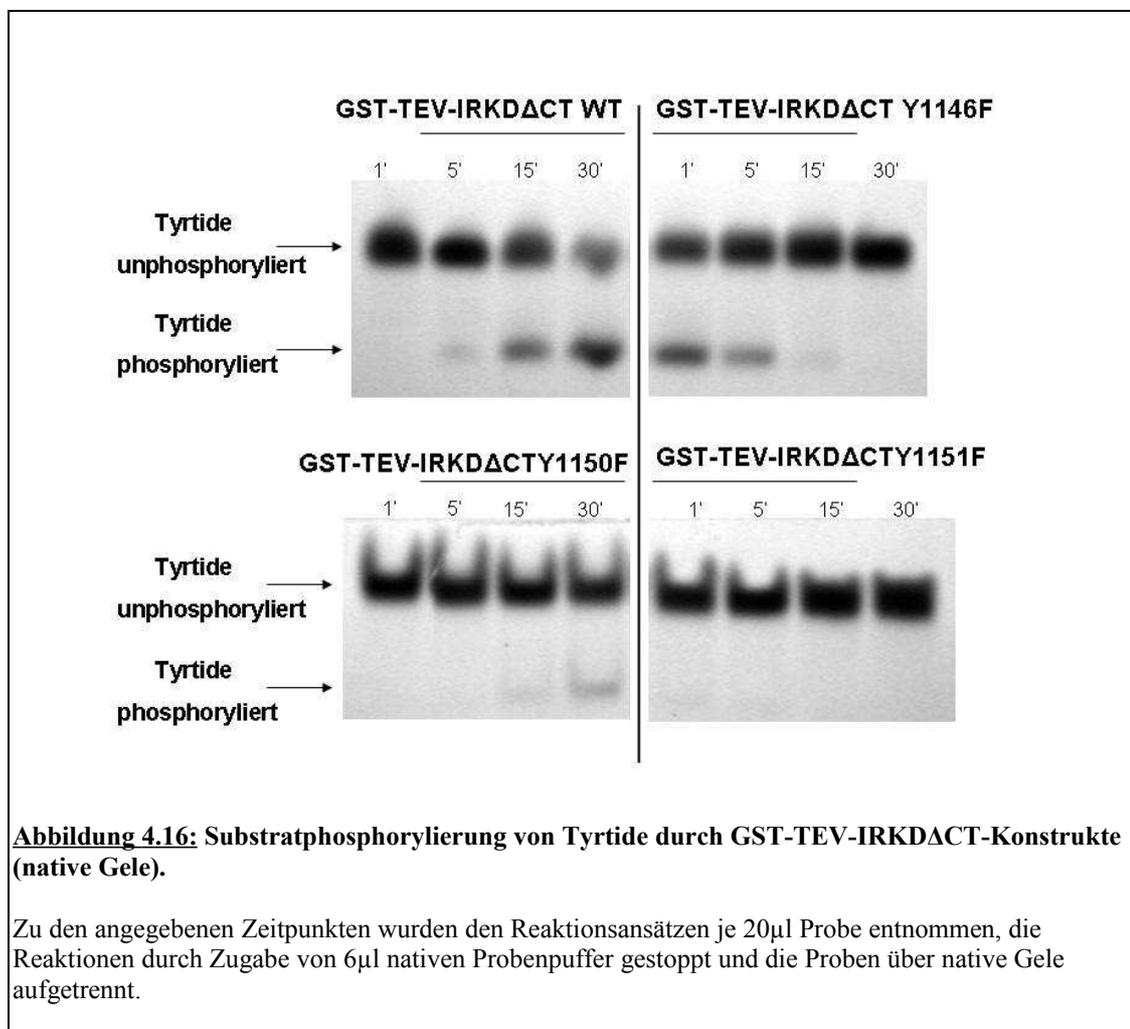


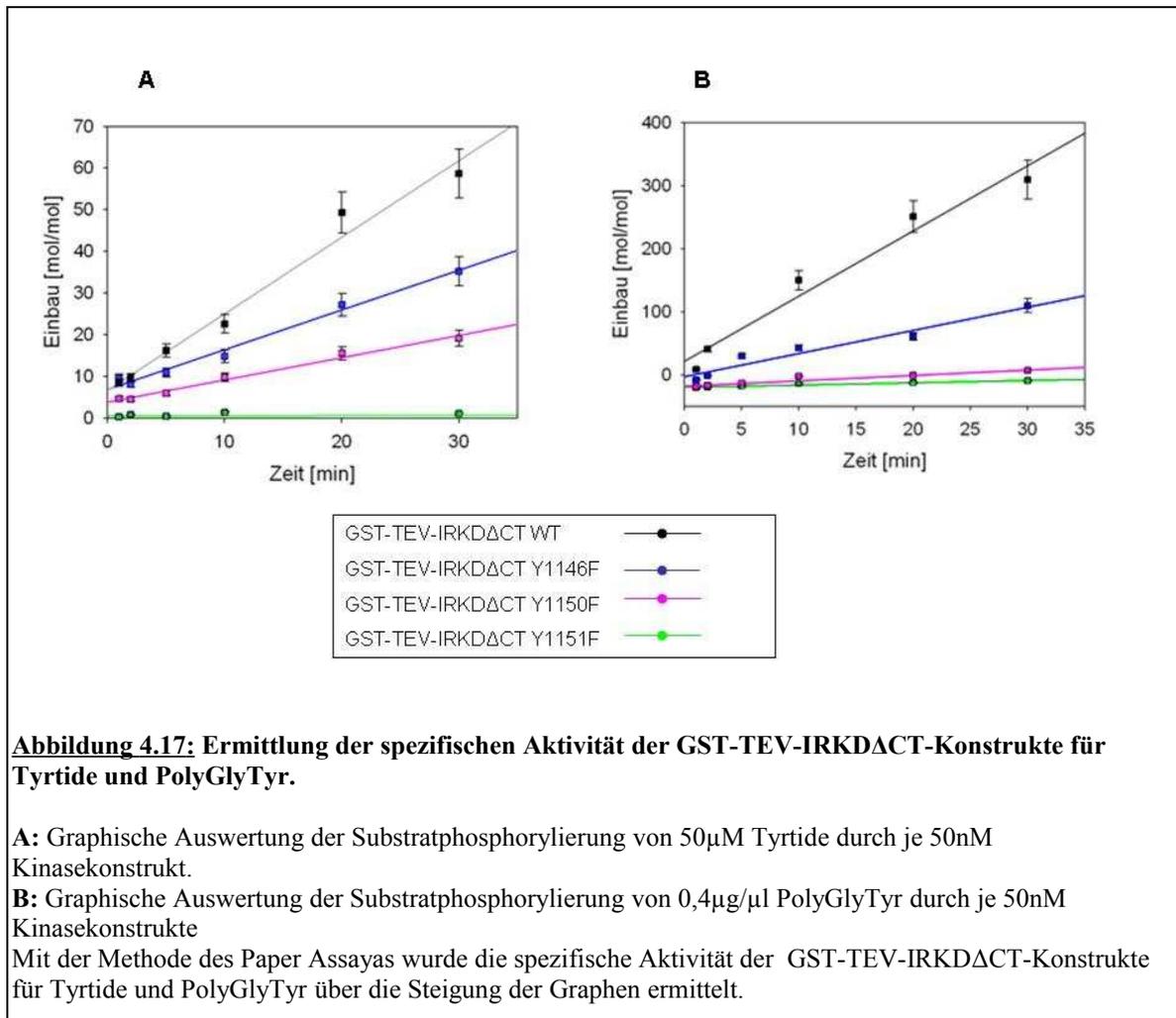
Abbildung 4.16: Substratphosphorylierung von Tyrtide durch GST-TEV-IRKΔACT-Konstrukte (native Gele).

Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden den Reaktionsansätzen je 20µl Probe entnommen, die Reaktionen durch Zugabe von 6µl nativen Probenpuffer gestoppt und die Proben über native Gele aufgetrennt.

Deutlich ist die Phosphorylierung von Tyrtide durch die GST-TEV-IRKΔACT^{WT} und die GST-TEV-IRKΔACT^{Y1146F} erkennbar. Für die GST-TEV-IRKΔACT^{Y1150F} und GST-TEV-IRKΔACT^{Y1151F} konnte keine nennenswerte katalytische Aktivität in der Substratphosphorylierung von Tyrtide nachgewiesen werden.

Zur Quantifizierung der katalytischen Aktivität der Hybride bei der Substratphosphorylierung wurde die Methode des Paper Assays (6.2.9.1) verwendet. Als Substrate dienten Tyrtide und das artifizielle Substrat PolyGluTyr. Auf diese Weise konnten Unterschiede in der katalytischen Aktivität der GST-TEV-IRKΔACT-Mutanten aufgrund von spezifischen Enzym-Substrat-Wechselwirkungen untersucht werden.

Um die katalytische Aktivität der Hybrid-Mutanten quantitativ erfassen zu können, wurde der Phosphateinbau in das Substrat Tyrtide mit radioaktiv markiertem γ [P³²]-ATP gemessen. Zu diesem Zweck wurde eine zeitabhängige Substratphosphorylierung von 50 μ M Tyrtide bzw. 0,4 μ g/ μ l PolyGlyTyr unter Standardbedingungen (30 mM MgCl₂, 1 mM DTT, in 50 mM Tris/HCl pH 7,5) und 1 mM γ [P³²]-ATP (150 cpm/pmol ATP) durchgeführt. Da die exakte Kettenlänge von PolyGlyTyr nicht einheitlich ist und das Molekulargewicht stark schwankt, ist eine Konzentrationsangabe nur in μ g/ μ l möglich. Die Reaktion wurde zu den entsprechenden Zeiten (2', 4', 8', 16', 32') durch Zugabe von 6 μ l 500 mM EDTA je 10 μ l Probe gestoppt. In einer Doppelbestimmung wurden die Proben auf Phosphozellulose-Papier getropft, nach unterschiedlichen Waschschritten die Radioaktivität durch Cerenkov-Zählung bestimmt und die spezifische Aktivität [(pmol übertragenes Phosphat/pmol Kinase)/min] ermittelt. Die Auswertungen des Assays für Tyrtide (Tabelle 4.9) ergab ein übereinstimmendes Ergebnis mit der Substratphosphorylierung in der nativen Page (Abbildung 4.17A und Abbildung 4.16) Erneut zeigt die GST-TEV-IRK Δ CT^{WT} die höchste katalytische Aktivität. Im Vergleich dazu erreicht die GST-TEV-IRK Δ CT^{Y1146F} eine Aktivität von 56% , die GST-TEV-IRK Δ CT^{Y1150F} noch 28%, während die GST-TEV-IRK Δ CT^{WT} mit ca. 2% nahezu inaktiv, in Bezug auf die Substratphosphorylierung, ist.



	Spez. Aktivität für Tyrtide (%)	Spez. Aktivität für PolyGlyTyr (%)
GST-TEV-IRKDACT ^{WT}	100	100
GST-TEV-IRKDACT ^{Y1146F}	56	36
GST-TEV-IRKDACT ^{Y1150F}	28	10
GST-TEV-IRKDACT ^{Y1151F}	2	4

Tabelle 4.9: Spezifische Aktivität der GST-TEV-IRKDACT-Kinasen in der Substratphosphorylierung von Tyrtide und PolyGlyTyr.

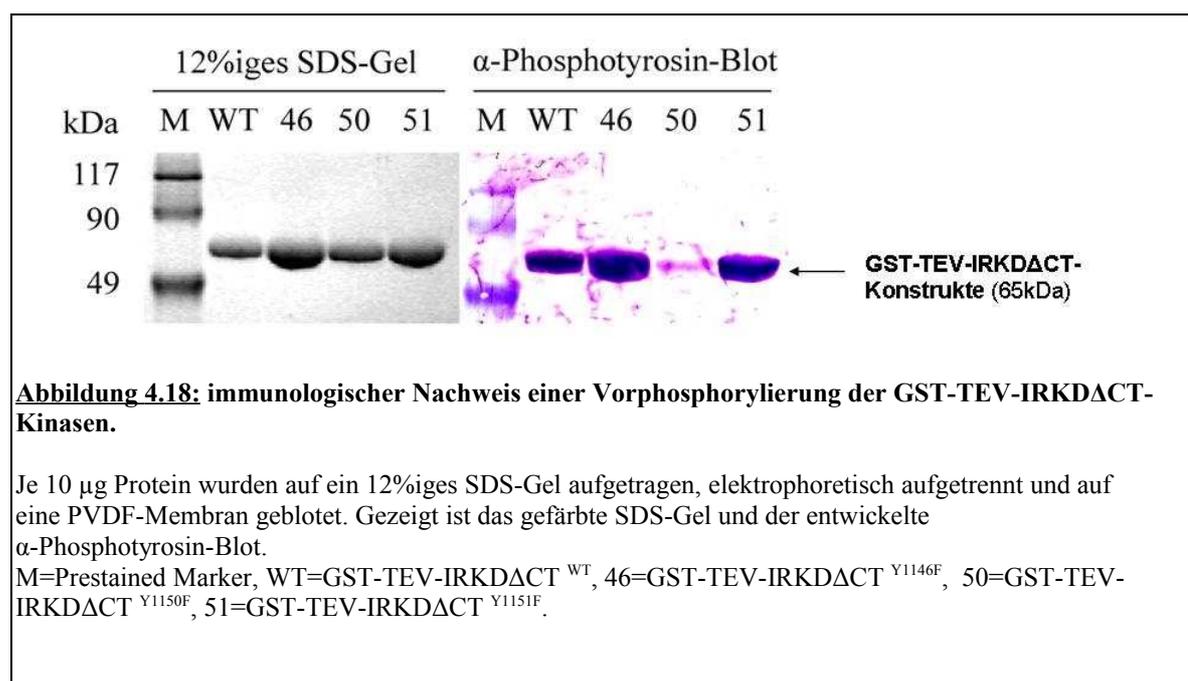
Die Auswertung des Paper Assays für PolyGlyTyr (Abbildung 4.17B) ergab ein ähnliches Bild wie für die Substratphosphorylierung von Tyrtide. Erneut ist für GST-TEV-IRK Δ CT^{WT} die höchste spezifische Aktivität festzustellen. Die spezifische Aktivität der Kinasemutanten wurde wieder in Relation zu GST-TEV-IRK Δ CT^{WT} gesetzt (Tabelle 4.9).

4.2.6 Immunologische Nachweis einer Vorphosphorylierung

Von besonderem Interesse ist die Untersuchung der möglichen Vorphosphorylierung der Kinasen, da diese gleichbedeutend mit der Voraktivierung sein könnte.

Bei der Autohosphorylierung der monomeren IRK Δ CT-Konstrukte konnte eine Vorphosphorylierung bereits festgestellt werden (Abbildung 4.12). Es ist bei allen untersuchten Kinasekonstrukten (bei 0 Minuten Zeitwert) deutlich eine zweite Bande zu erkennen.

Es ist ebenso von Interesse, ob die dimeren GST-TEV-IRK Δ CT-Kinasekonstrukte auch eine Vorphosphorylierung aufweisen. Hierzu wurde ein 12% SDS-Gel mit je 10 μ g Protein beladen, ein Elektrobplot (6.2.6.1) durchgeführt und die Membran mit α -Phosphotyrosin-Antikörper inkubiert. In der Abbildung 4.18 sind der entwickelte α -Phosphotyrosin-Blot und



das angefärbte SDS-Gel gezeigt. Der Blot zeigt eine deutlich Vorphosphorylierung bei allen vier untersuchten GST-TEV-IRKD Δ CT -Konstrukten.

4.2.7 Interaktionsstudien der GST-TEV-IRKD Δ CT-Konstrukte mit der SH2-Domäne

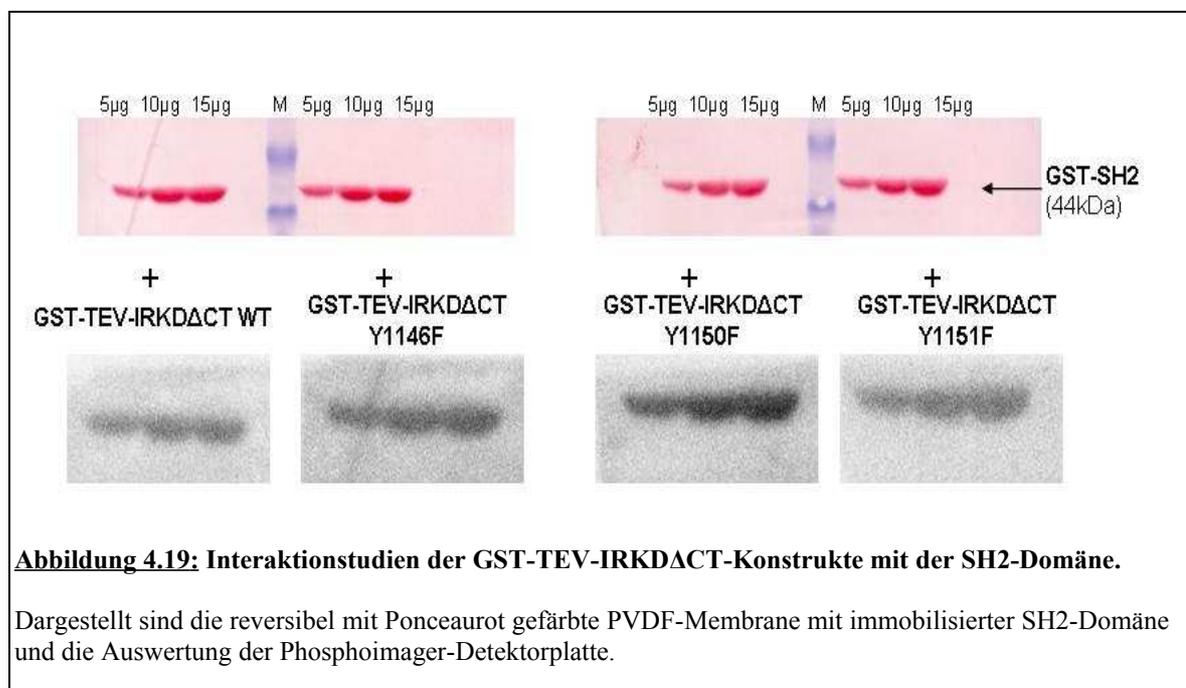
Die SH2 –Domänen wurden erstmals von Sadowski *et al.*, 1986 und Pawson *et al.*, 1988 in den beiden Onkoproteinen Src und Fps beschrieben. An der Signaltransduktion beteiligte Proteine beinhalten häufig Sequenzen, die für SH2-Domänen charakteristisch sind. Die SH2-Domäne umfasst ca. 100 Aminosäurereste, die hochaffin ($K_d \sim 0,1-1$ nM) an Phosphotyrosine in einem spezifischen Aminosäurekontext binden. Die SH2-domänentragenden Proteine haben, soweit bekannt, keine katalytische Aktivität, sondern scheinen nur die Rolle eines Adapterproteins zu übernehmen, welches einen Komplex mit weiteren Molekülen ausbildet. Kristallographische Untersuchungen zeigen, dass zur Bindung der SH2-Domäne *in vitro* ein phosphorylierter Tyrosinrest benötigt wird (Felder *et al.*, 1993). Die Interaktion des SH2-Domänen-haltigen Proteins mit der Kinase kann auf zwei Arten erfolgen: Zum einem über die Bindung an das Phosphotyrosin des pYXXM- oder pYMXM Motivs im C-Terminus der Rezeptorkinase (Cohen *et al.*, 1995) und zum anderen über Phosphotyrosin in der Aktivierungsschleife. Während die C-terminale Interaktion schon länger bekannt ist, ist die Kenntnis der Wechselwirkung der SH2-Domäne mit der Aktivierungsschleife relativ neu (Murdaca *et al.*, 2004). Auch die SH2-Domäne der PI3-Kinase wechselwirkt mit der Aktivierungsschleife des Insulinrezeptors. In diesem Zusammenhang besonders interessant erscheint die Untersuchung der Interaktion der GST-TEV-IRKD Δ CT -Konstrukte mit der SH2-Domäne. Somit können die bevorzugten Interaktionsstellen für die IRKD gefunden werden.

Hierfür wurde die GST-SH2 in drei verschiedenen Mengen (5 μ g,10 μ g,15 μ g) über ein SDS-Gel aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine über das Wet-Blot Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen (6.2.6.2). Zum Nachweis der erfolgreichen Immobilisierung von GST-SH2 auf die PVDF-Membran wurden die immobilisierten Proteine reversibel mit dem kolloidalen Farbstoff Ponceaurot angefärbt. Die Membran wurde nach dem Blocken mit einer BSA-Lösung mit den phosphorylierten Kinasekonstrukten inkubiert. Die GST-TEV-

IRK Δ CT-Konstrukte wurden je mit 5 μ M, in 250 μ l Volumen, einer Autophosphorylierungsreaktion unterzogen (30 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM γ [P³²]-ATP (350 cpm/pmol ATP)). Die Reaktion wurde durch 30 μ l 500mM EDTA terminiert und die Proteine über eine mini-GST-Säule gegeben. Nach mehreren aufeinander folgenden Waschschritten konnten die Kinasen von der Säule eluiert werden.

Die Cerenkov-Strahlung der Eluate wurde gemessen, und die Eluate auf 30800 cpm normiert. Die radioaktiven Kinasen wurden anschließend 1 Stunde mit den Blotmembranen inkubiert. Um unspezifisch gebundene Kinasen von der Membran zu lösen, wurden die PVDF-Membrane mehreren Waschschritten unterzogen und anschließend auf der Molecular-Imager®-Plattform (BioRad) für 20 Stunden exponiert. Die Auswertung der Molecular-Imager®-Detektorplatte ist in der Abbildung 4.44 dargestellt.

Interessant erscheint die Tatsache, dass alle untersuchten Tyrosinpositionen eine Interaktion mit der SH2-Domäne zeigen. Die stärkste Bindung der SH2 konnte an die GST-TEV-IRK Δ CT^{Y1150F} detektiert werden. Die GST-TEV-IRK Δ CT^{Y1151F} interagiert nur halb so stark mit der SH2-Domäne. Die GST-TEV-IRK Δ CT^{Y1146F} zeigt im Vergleich zu GST-TEV-IRK Δ CT^{Y1150F} nur ca. 75% Interaktionsstärke, die GST-TEV-IRK Δ CT^{WT} ca. 60%.

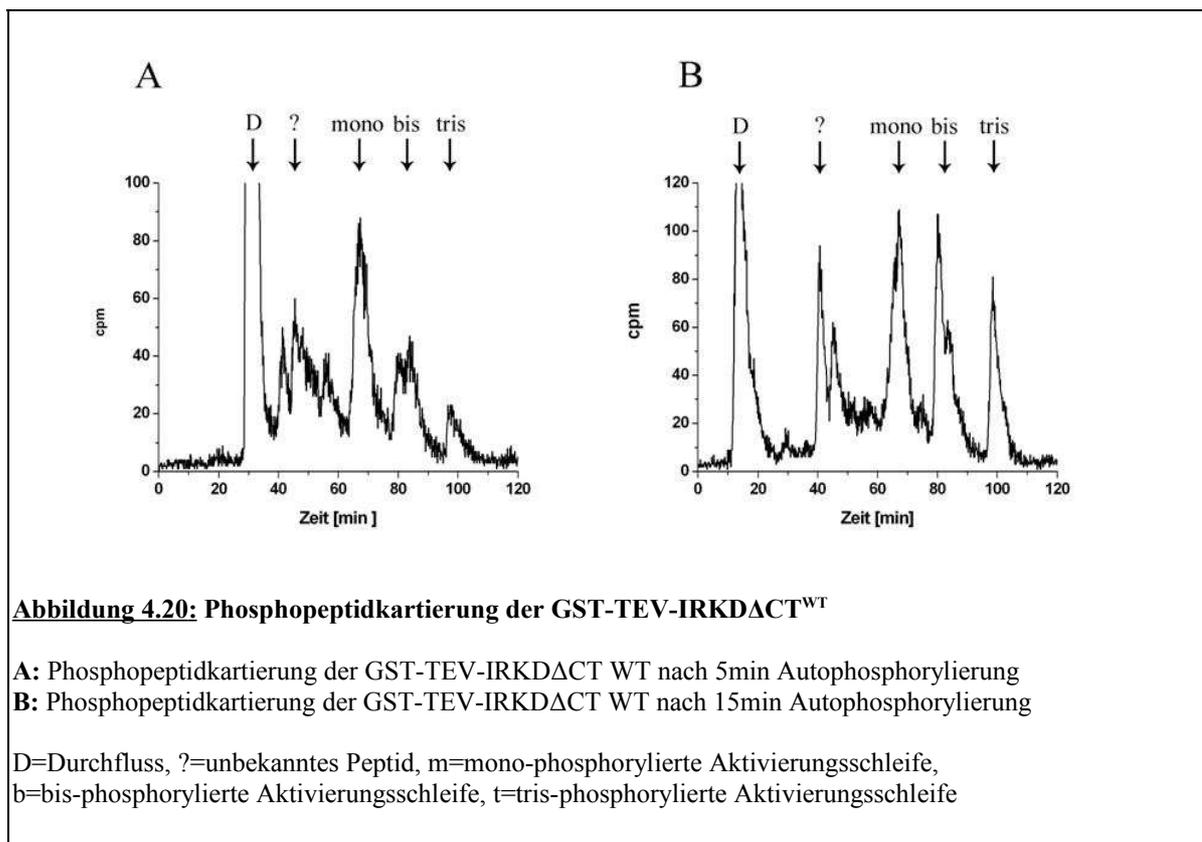


4.2.8 Identifizierung der Phosphorylierungsstellen der GST-TEV-IRKΔCT-Kinasekonstrukte durch Phosphopeptidkartierung (Peptid Map)

Für die Aktivierung der IRKD ist die Phosphorylierung der Tyrosine in der Aktivierungsschleife von essentieller Bedeutung. Die Reihenfolge der Besetzung und der Phosphorylierungsgrad, der zur Aktivierung der IRKD notwendig ist, wird in der Literatur (Dickens und Tavare 1992; Wei et al. 1995) kontrovers diskutiert.

Um Rückschlüsse auf die Reihenfolge der Besetzung der Phosphotyrosine in der Aktivierungsschleife zu erhalten, wurde die Methode der Phosphopeptidkartierung (Peptid Map, (6.2.10.2) ausgewählt (Al-Hasani 1995). Die Phosphopeptidkartierung wurde von Al-Hasani für die lösliche IRKD-His entwickelt. Nach einer Autophosphorylierung mit anschließendem tryptischen Verdau der Kinase konnten 48 Peptide (bei einem vollständigen Verdau) identifiziert werden, von denen 29 Peptide potentielle Phosphorylierungsstellen (Ser, Thr, Tyr) enthielten. Das Peptidgemische konnte mittels HPLC-Anionenaustausch-Chromatographie mit einem zweistufigen Salzgradienten in 14 radioaktive Fraktionen getrennt werden (90% Ausbeute der Radioaktivität). Durch Edman-Sequenzierung war es möglich, den einzelnen Elutionspeaks im Chromatogramm die entsprechende Aminosäuresequenz und somit die jeweilige Phosphorylierungsstelle der verwendeten IRKD zuzuordnen. Die Ergebnisse der Arbeit von Al-Hasani ermöglichen es nun, die in den GST-TEV-IRKΔCT-Mutanten besetzten Phosphorylierungsstellen anhand der Retentionszeiten zu identifizieren.

Für die Phosphopeptidkartierung wurde zunächst eine Autophosphorylierungsreaktion mit 0,5 uM je Kinasekonstrukt über 5 und 15 min unter Standardbedingungen (1 mM γ [P³²]-ATP, 500 cpm/pmol ATP, 30 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7,5) durchgeführt. Dem Ansatz wurden Proben von 20 μ l entnommen und mit je 6 μ l SDS-Probenpuffer denaturiert. Nach der Auftrennung der Proben SDS-PAGE wurden die radioaktiven Banden mittels Autoradiographie detektiert und ausgeschnitten. Über Nacht erfolgte der tryptische Verdau der Proteinbanden und die Elution der Peptide. Die eluierten, radioaktiven Peptide wurden im Anschluss über HPLC-Anionenaustausch-Chromatographie aufgetrennt. In der Abbildung 4.20 sind die entstanden Elutionsprofile der GST-TEV-IRKΔCT^{WT} dargestellt.



In beiden Chromatogrammen sind jeweils fünf Peaks zu erkennen. Der erste Peak bei 30 bzw. 20 min kann Peptiden zugeordnet werden, die nicht an der Säule der HPLC gebunden haben. Es folgt ein breiter Peak, der sich über den Bereich 40 bis 50 min erstreckt, dem kein Peptid eindeutig zugeordnet werden konnte. Der nächste Peak, bei ca. 60 min, wurde von Al-Hasani der monophosphorylierten Aktivierungsschleife zugeordnet. Nach einer Retentionszeit von ca. 80 min tritt die bisphosphorylierte Form der Aktivierungsschleife auf. Abschließend wird die tris-phosphorylierte Form bei ca. 100 min detektiert. Die Ausbildung von Doublets oder Schultern deutet auf eine Besetzung unterschiedlicher Aminosäuren der Aktivierungsschleife innerhalb einer Phosphorylierungsstufe hin. Im weiteren Verlauf der Arbeit konzentriert sich die Diskussion der Chromatogramme auf die interessanten Peaks der Aktivierungsschleife.

Bei einem Vergleich der Chromatogramme beider Zeitwerte ist eine Zunahme der Peaks für die bis- bzw. tris-phosphorylierte Formen der Aktivierungsschleife bei 15 Minuten im Vergleich zum 5 Minuten Wert zu erkennen. Nach 15 Minuten ist eine annähernde Gleichverteilung der mono-, bis- und trisphosphorylierten Formen der Aktivierungsschleife zu verzeichnen. Nach Wei (1995) findet die Phosphorylierung der Tyrosine der

Aktivierungsschleife in folgender Reihenfolge statt: Zuerst erfolgt die Phosphorylierung von Y1150, gefolgt von Y1146 und zuletzt wird Y1151 phosphoryliert. Demnach entspricht der Monopeak der Besetzung von Y1150. Der Peak der bisphosphorylierten Form tritt als Doublet auf, was auf eine unterschiedliche Besetzung der bisphosphorylierten Form hindeutet. Nach Wei würde die eine Spitze des Doublets der Besetzung von Y1150/Y1146 und die andere der Besetzung von Y1150/Y1151 entsprechen. Der Trispeak entspricht der Besetzung aller drei Tyrosine der Aktivierungsschleife.

Nachfolgend werden nun die Phosphopeptidkartierungen für den Zeitwert von 15 Minuten gezeigt, da diese stärker ausgebildete Peaks aufweisen. Die Phosphopeptidkartierungen des 5 Minuten Zeitwertes sind im Anhang (Abbildung 8.13) zu finden.

In der Abbildung 4.21 sind die Chromatogramme der GST-TEV-IRK Δ CT^{Y1146F}, GST-TEV-IRK Δ CT^{Y1150F} und GST-TEV-IRK Δ CT^{Y1151F} gezeigt. Die GST-TEV-IRK Δ CT^{Y1146F} zeigt vorwiegend mono-Phosphorylierung, mit einem extrem ausgeprägten Monopeak, der stark aufgespalten erscheint. Der bis-Phosphorylierungspeak ist nur halb so groß wie der Monopeak.

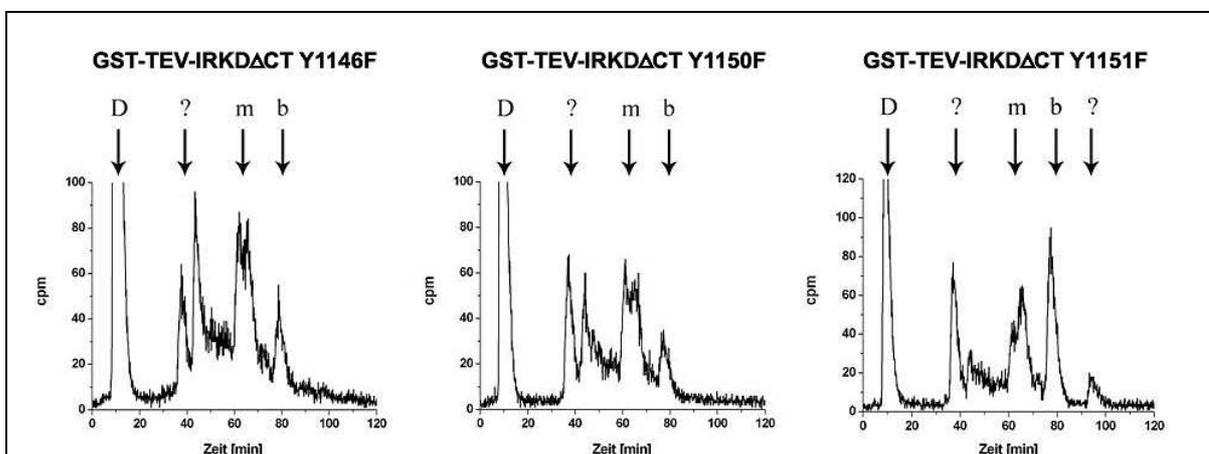


Abbildung 4.21: Phosphopeptidkartierung der GST-TEV-IRK Δ CT- Kinasemutanten.

Gezeigt sind die Chromatogramme der GST-TEV-IRK Δ CT^{Y1146F}, GST-TEV-IRK Δ CT^{Y1150F}, GST-TEV-IRK Δ CT^{Y1151F} für den Zeitwert 15 Minuten.

D=Durchfluss, ?=unbekanntes Peptid, m=mono-phosphorylierte Aktivierungsschleife, b=bis-phosphorylierte Aktivierungsschleife, t=tris-phosphorylierte Aktivierungsschleife

Die Phosphopeptidkartierung der GST-TEV-IRK Δ CT^{Y1150F} weist vorwiegend die monophosphorylierte Form der Aktivierungsschleife auf, deren Peak eine Aufspaltung zum

Doublet zeigt. Der bisphosphorylierte Peak erscheint um die Hälfte kleiner im Verhältnis zum mono-Peak.

Die GST-TEV-IRK Δ CT^{Y1151F} zeigt hauptsächlich die höchst mögliche Besetzung der Aktivierungsschleife. Die bisphosphorylierte Form erscheint doppelt so stark verglichen mit der mono-Form. Der Monopeak weist eine starke Doupletaufspaltung auf. Bei ca. 100 Minuten erscheint ein Peak, dem kein Peptid zugeordnet werden kann.

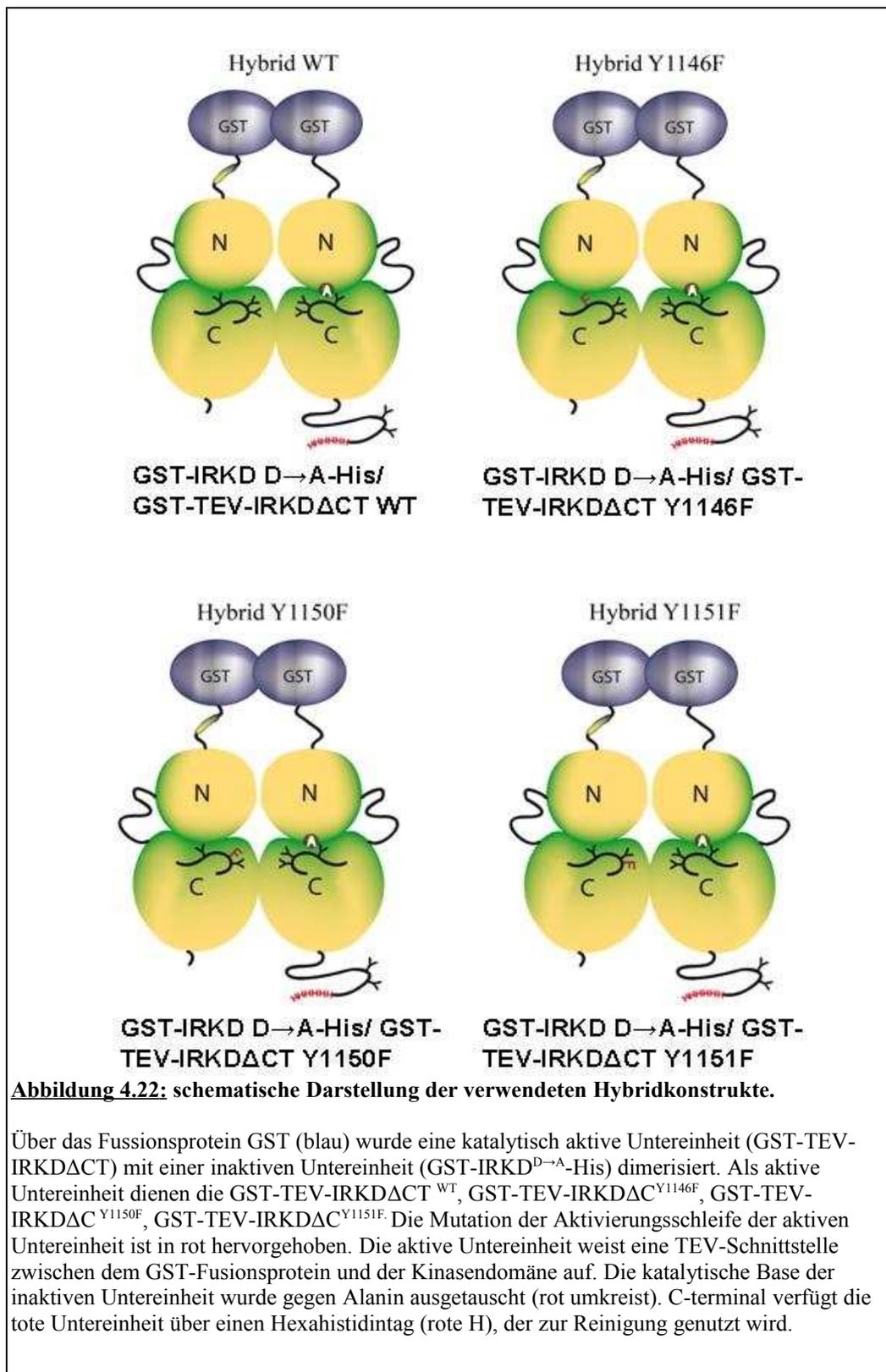
Abschließend muss festgehalten werden, dass die Phosphopeptidkartierung die Ergebnisse der radioaktiven Autophosphorylierung bestätigte. Der unterschiedliche Phosphateinbau in die Kinasekonstrukte konnte auf die unterschiedliche Besetzung der Aktivierungsschleife zurückgeführt werden.

4.3 Generierung, Expression und Reinigung von Heterodimeren der Insulinrezeptorkinase-Konstrukte

4.3.1 Verwendete Kinasekonstrukte

Der Insulinrezeptor tritt in der Zelle als ein natürliches Dimer auf. Da sich die Reinigung des Holorezeptors in der Vergangenheit als schwierig erwiesen hat, wurde in der Arbeitsgruppe ein Modellsystem entwickelt. Dazu wurde die intrazelluläre Kinasedomäne des Insulinrezeptors N-terminal mit dem Faltungsdimer Glutathion-S-Transferase (GST aus *Schistosoma japonicum*) fusioniert. Auf diese Weise kann der hormonegebundene, aktive, dimere IR imitiert werden. Mit Hilfe des GST-Tags können in situ unterschiedliche Untereinheiten miteinander dimerisiert werden, die so genannten Hybride (Fischer 2005). Die jeweiligen Untereinheiten sind frei wählbar. Sie können sich in Größe, katalytischer Aktivität und sogar in der Kinasenfamilie unterscheiden (Bernards 2008; Cording 2008; Herweg 2007). Über Hybridisierung ist es sogar möglich ein Substrat kovalent an die Kinase zu binden (vgl. Karau). Zur Gewinnung von Hybriden wird bei der Coexpression (6.2.2.1.5) eine *Sf9*-Insektenzelle gleichzeitig mit zwei Viren infiziert, die jeweils die DNA einer der beiden Hybriduntereinheiten tragen. Dabei kommt es auch zur Bildung von Homodimeren, die anschließend von dem gewünschten Hybrid separiert werden müssen. Unterscheiden sich die beiden Hybriduntereinheiten in der Größe voneinander, so können sie gesondert untersucht werden.

Um den Einfluss der Dimerisierung bei der Aktivierung des IRs untersuchen zu können, wurde in unserer Arbeitsgruppe ein „lebend/tot“ Hybrid (Hybrid Herweg) generiert und charakterisiert (Herweg 2007). Dieses bestand aus einer C-terminal deletierten, katalytisch aktiven Kinaseuntereinheit (GST-IRKD Δ CT) und einer katalytisch defizienten Kinaseuntereinheit (GST-IRKD^{D→A}-His), die in ihren Eigenschaften einer Pseudokinase entspricht. Auf diese Weise konnte die Autophosphorylierung in trans ausgeschlossen werden. Aufbauend auf dieser Arbeit sollten „lebend/tot“ Hybride bestehend aus der GST-IRKD^{D→A}-His (tote Kinase) und den GST-TEV-IRKD Δ CT-Kinasevarianten generiert werden (Abbildung 4.22). Als Vergleich zu den Hybriden werde die schon generierten und charakterisierten GST-TEV-IRKD Δ CT-Kinasekonstrukte eingesetzt werden.



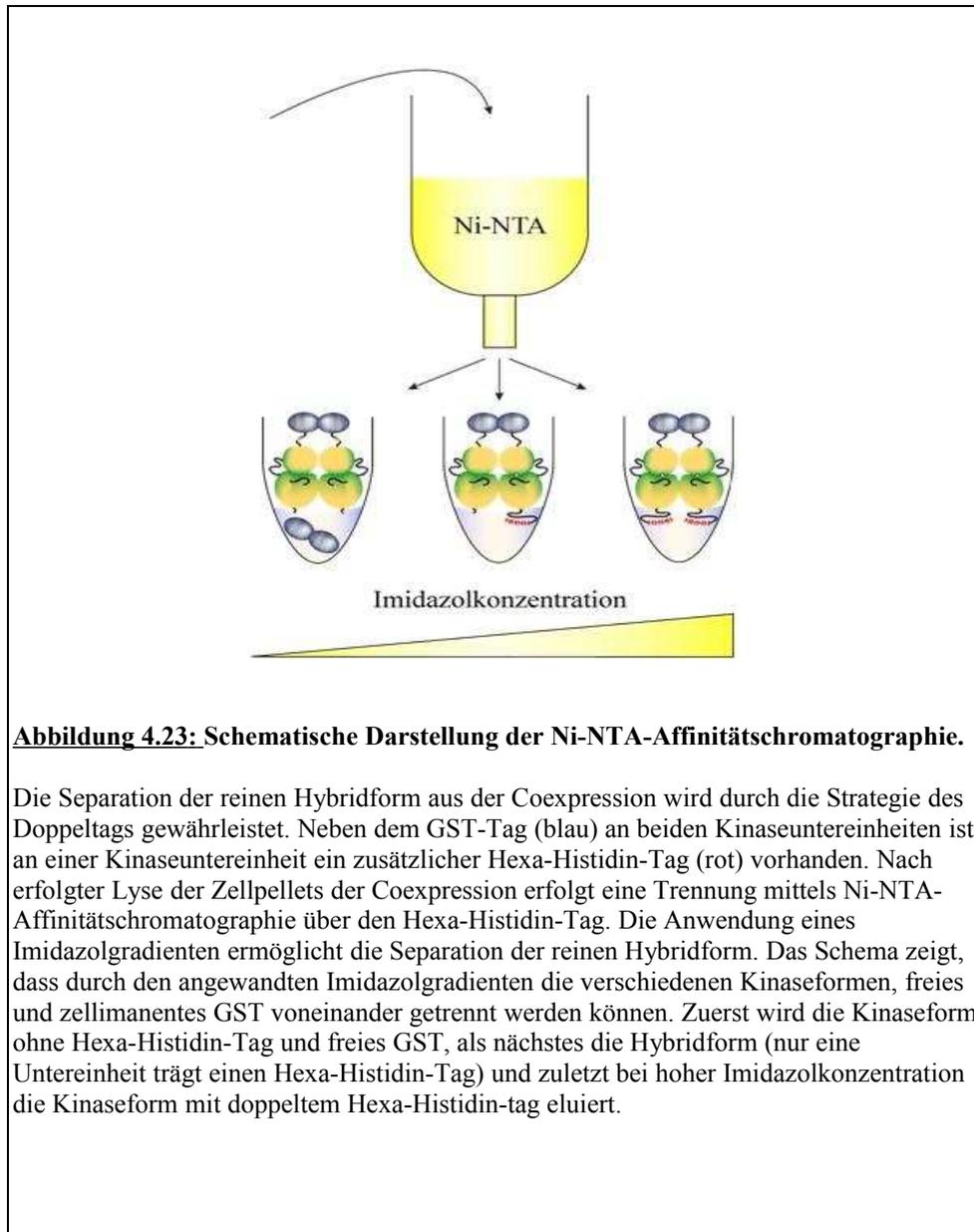
Bei der inaktiven Kinasemutante GST-IRKD^{D→A}-His ist die katalytische Base Aspartat 1120 durch ein Alanin ausgetauscht, mit der Folge, dass weder eine Substrat- noch eine Autophosphorylierung dieser Kinase möglich ist. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass eine solch inaktive Kinase von aktiven Kinasen als Substrat erkannt und somit phosphoryliert werden kann (Baer *et al.* 2001). Neben dem GST-Tag besitzt die GST-IRKD^{D→A} einen zusätzlichen Hexahistidintag (His-Tag), der zur Separierung der Hybride ausgenutzt werden kann. Die, als Dimerisierungspartner dienenden, C-terminal trunkierten Varianten der Insulinrezeptorkinase sind in dieser Arbeit bereits beschrieben und charakterisiert worden.

Die generierten Hybride sollten auf ihre Aktivität hin in der Auto- und Substratphosphorylierung charakterisiert werden. Als Referenz zu den Hybriden dienen die GST-TEV-IRKΔCT-Kinasekonstrukte.

4.3.2 Strategie des „Doppeltags“

Bei der Expression der Hybride in den *Sf9*-Insektenzellen entstehen neben den gewünschten Heterodimeren zwei Homodimere: das aktive GST-TEV-IRKΔCT-Konstrukt und die inaktive GST-IRKD^{D→A}-His. Um die beiden unerwünschten Homodimere vom Hybrid zu trennen, wurde für die Arbeit die Strategie des „Doppeltags“ ausgenutzt (Ettich 2006). Dabei wurden beide Reinigungstags, sowohl der GST- als auch der His-Tag für die Hybridseparierung über Affinitätschromatographie verwendet.

Zur Hybridisierung wurde der N-terminal vorhandene GST-Tag genutzt, der während der Expression ein Faltungsdimer bildet, und somit zwei Kinaseuntereinheiten dimerisieren lässt. Die beiden Untereinheiten im Heterodimer unterscheiden sich in ihrer Größe voneinander. Die katalytisch defiziente Untereinheit trägt zusätzlich ein Hexahistidintag. Dieses wird bei der Separation der Hybride über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie genutzt. Das Einsetzen eines Imidazolgradienten ermöglicht die Trennung eines reinen Hybrids von den Heterodimeren (Abbildung 4.23).



4.3.3 Expression und Reinigung der Hybride

Für alle Konstrukte wurden die Virusüberstände, die die rekombinante DNA der vorgestellten Hybriduntereinheiten beinhalten, bereits generiert (4.1). So konnten diese mittels Coexpression im Baculovirus-Expressionssystem (6.2.2.1.5) hergestellt werden.

Zur Hybridisierung wurde der N-terminale GST-Dimerisierungstag verwendet, der bereits während der Expression ein Faltungsdimer bildet und somit zwei Kinaseuntereinheiten dimerisieren lässt. Die beiden verwendeten Untereinheiten im Hybrid unterscheiden sich in ihrer Größe voneinander. Sie sind über den GST-Tag dimerisiert und die katalytisch defiziente Kinaseuntereinheit trägt zusätzlich einen His-Tag.

Die Lyse der Zellpellets der Coexpression erfolgte nach dem, in der Arbeitsgruppe standardisierten Protokoll (6.2.2.1.7). Bei der Coexpression kommt es neben der Ausbildung von Hybriden ebenso zur Bildung von Homodimeren (GST-Kinasen), bestehend aus zwei aktiven Kinaseuntereinheiten oder aus zwei katalytisch defizienten Kinaseuntereinheiten. Alle drei Kinaseformen wurden im unterschiedlichen Verhältnis exprimiert, wobei die Expression des Hybrids am schwächsten erscheint. Bei der Separation der Hybride wurde die Affinität beider Reinigungstags zur verwendeten Matrix ausgenutzt, um die unerwünschten Homodimere zu entfernen. Im ersten Schritt der Reinigung erfolgte mit Hilfe einer Nickel-NTA-Affinitätschromatographie (6.2.4.2) die Trennung beider Homodimere vom Hybrid. (Cording2008). Durch Konkurrenz wird mit steigender Imidazolkonzentration zunächst das Hybrid und anschließend das doppelt His-getagte inaktive Homodimer von der Säule eluiert.

Der Reinigungsverlauf der Ni-NTA-Reinigung wurde auf einem 12% SDS-Gel dokumentiert und in der Abbildung 4.24 dargestellt.

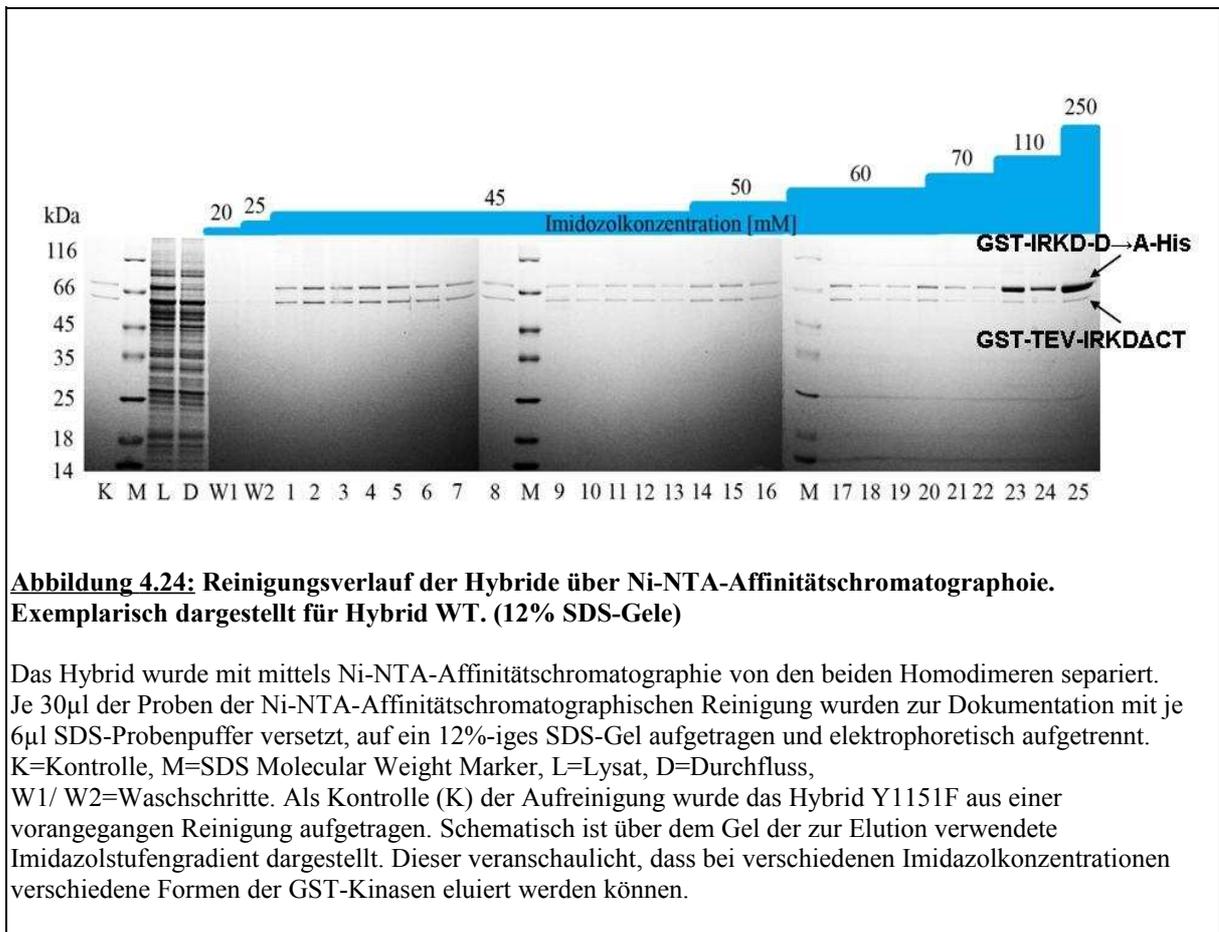


Abbildung 4.24: Reinigungsverlauf der Hybride über Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Exemplarisch dargestellt für Hybrid WT. (12% SDS-Gele)

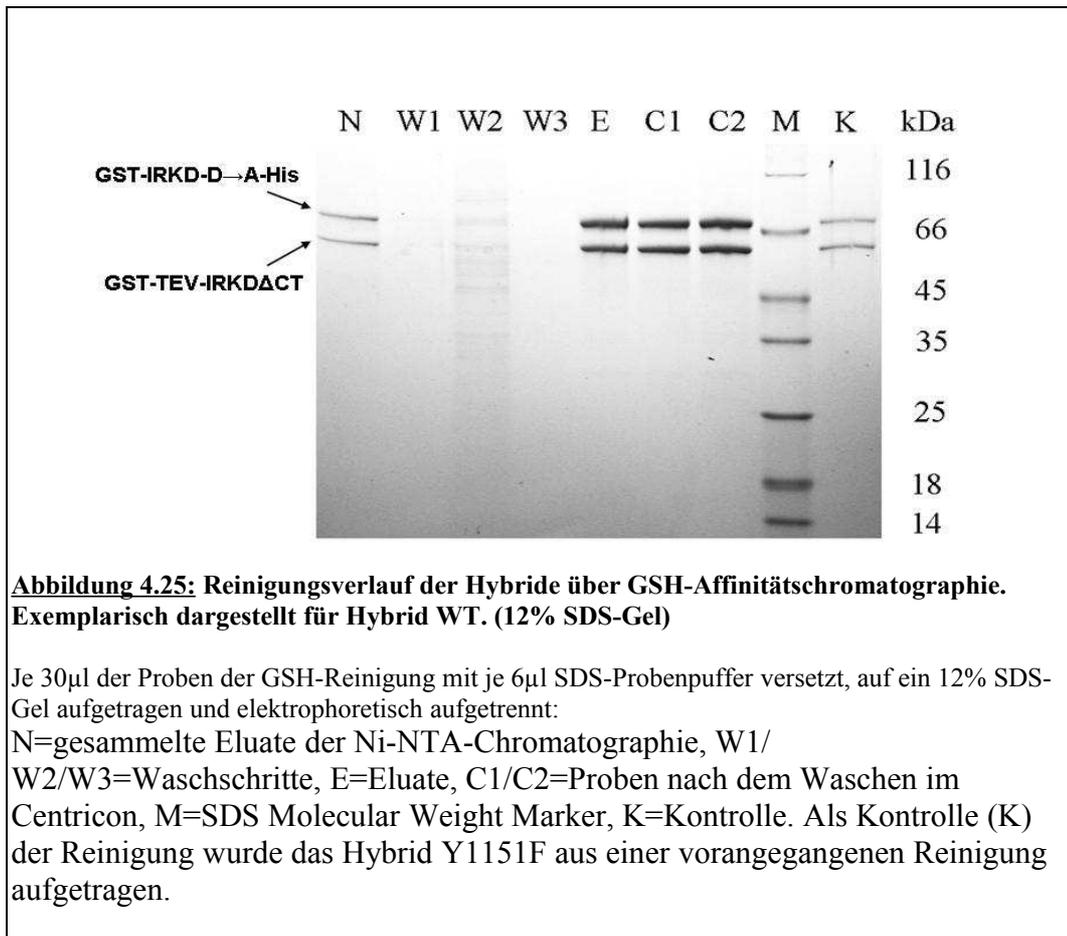
Das Hybrid wurde mit mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie von den beiden Homodimeren separiert. Je 30µl der Proben der Ni-NTA-Affinitätschromatographischen Reinigung wurden zur Dokumentation mit je 6µl SDS-Probenpuffer versetzt, auf ein 12%-iges SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. K=Kontrolle, M=SDS Molecular Weight Marker, L=Lysat, D=Durchfluss, W1/ W2=Waschschritte. Als Kontrolle (K) der Aufreinigung wurde das Hybrid Y1151F aus einer vorangegangenen Reinigung aufgetragen. Schematisch ist über dem Gel der zur Elution verwendete Imidazolstufengradient dargestellt. Dieser veranschaulicht, dass bei verschiedenen Imidazolkonzentrationen verschiedene Formen der GST-Kinasen eluiert werden können.

Das aktive Homodimer, das keinen His-Tag trägt, befindet sich im Durchfluss. Nach dem Beladen der Säule erfolgten zwei Waschschritte mit 20 mM und 25 mM Imidazol, um unspezifisch gebundene Proteine von der Säule zu entfernen. Die Elution wurde manuell, mit stufenweise steigenden Imidazolkonzentrationen von 45 mM bis 250 mM Imidazol, durchgeführt. Mittels Spot-Test (6.2.5.1) wurde der Proteingehalt der jeweiligen Fraktion bestimmt. In Abbildung 4.24 ist exemplarisch die Separierung des Hybrids WT gezeigt. Es ist erkennbar, dass die aktive GST-TEV-IRKD^{WT} nicht an die Säule gebunden hat, sondern sich im Durchfluss befindet. Die nachfolgenden Eluate, bei 45 mM Imidazol, enthalten das gewünschte Hybrid, erkennbar an der Intensität der Proteinbanden. Bei Hybriden sind beide Untereinheiten im äquimolaren Verhältnis vorhanden, daher steht auch die Intensität der beiden Proteinbanden im Verhältnis 1:1. Beginnend bei 50 mM Imidazol nimmt die Intensität der Bande, der doppelt getagten inaktiven Kinaseuntereinheiten (GST-IRKD^{D→A}-His), langsam zu und ab 70 mM Imidazol ist eine deutliche Zunahme der inaktiven Komponente zu

verzeichnen. Ab 110mM Imidazol wird vorwiegend das doppelt getagte inaktive Homodimer eluiert. Alle, bei 45mM Imidazol eluierten, Fraktionen (mit Proteinbanden im Verhältnis 1:1) wurden vereinigt und anschließend über eine GSH-Affinitätschromatographie erneut gereinigt (6.2.4.1), um die Hybride aufzukonzentrieren. Die aufgefangenen Fraktionen der Reinigung wurden ebenfalls in einem 12%igen SDS-Gel getrennt (Abbildung 4.25).

Nach dem Beladen der GSH-Säule mit den Eluaten der Ni-NTA-Reinigung folgten drei Waschschritte. Zuerst wurde ein Waschschritt mit PBS-Puffer durchgeführt, um unspezifisch gebundene Proteine von der Säule zu entfernen. Es folgte ein Hochsalzwaschschritt (1M NaCl) um Proteine, die über schwache ionische Wechselwirkungen gebunden sind, zu eluieren. Mit PBS-Puffer wurde die Säule für das kompetitive Eluieren mit 10 mM reduzierten Glutathion in 50 mM Tris/HCl vorbereitet. Die Konzentration der Eluate wurde erneut mittels Spot-Test überprüft. Proteinhaltige Eluate wurden vereinigt und über ein Centricon glutathionfrei gewaschen (6.2.4.3).

Abbildung 4.25 zeigt exemplarisch ein Reinigungsgel der GSH-Reinigung von Hybrid WT. Es ist erkennbar, dass sich im ersten Waschschritt noch unspezifisch gebundene Proteine befinden, die über die Ni-NTA-Reinigung nicht entfernt werden konnten. Zudem wird das Hybrid, im Vergleich zur Ni-NTA-Reinigung, von der GSH-Matrix deutlich konzentrierter eluiert.



Alle Hybride konnten in reiner Form und mit guten Ausbeuten separiert werden (Tabelle 4.10).

Konstrukt	Ausbeute [mg]/1*10 ⁸ Zellen
Hybrid WT	1,1
Hybrid Y1146F	0,4
Hybrid Y1150F	2,9
Hybrid Y1151F	1,2

Tabelle 4.10: Dokumentation der Reinigung der Hybride.

Zum Detektieren der aktiven GST-TEV-IRKD^{WT} wurde der Durchlauf aus der Ni-NTA-Reinigung über eine GSH-Reinigung aufgearbeitet (Anhang/Abbildung 8.14). Zu erkennen

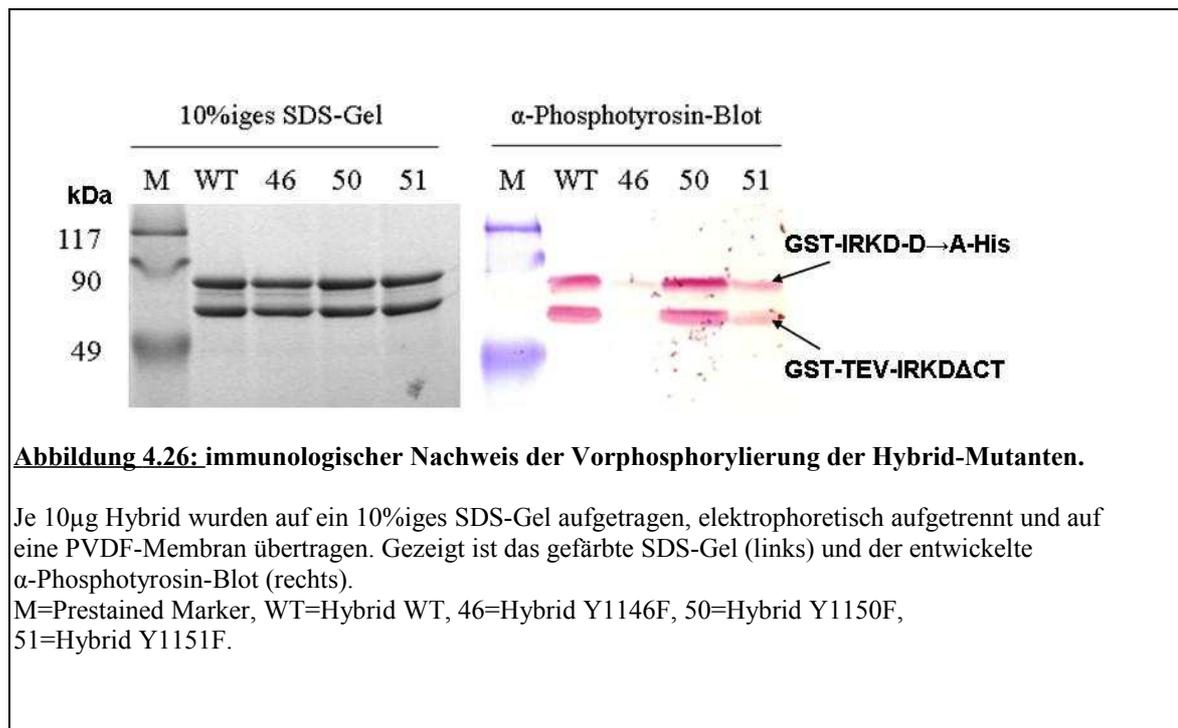
ist, dass neben der GST-TEV-IRKD^{WT} im Durchlauf der Ni-NTA-Reinigung zusätzlich noch freies GST und geringe Mengen an Hybrid nachweisbar sind.

Ergänzend zu den Hybridreinigungen über zwei aufeinander folgende Affinitätschromatographien wurde ein immunologischer Nachweis der Reinigungstags durchgeführt. Hierzu wurden zwei Antikörper verwendet, die als Epitop je einen Reinigungstag erkennen (α -GST- und α -His-Antikörper). Je 10 μ g Hybrid in einem 10% SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend einem Elektroblob unterzogen. Die PVDF-Membran mit immobilisierten Proteinen wurde geteilt, eine Hälfte mit α -GST- und die andere Hälfte der Membran mit α -His-Antikörpern inkubiert. Für beide Reinigungstags konnte ein immunologischer Nachweis erfolgreich erbracht werden (Anhang/Abbildung 8.15).

4.3.4 Immunologischer Nachweis einer Vorphosphorylierung

Von besonderem Interesse ist hier die Untersuchung einer Vorphosphorylierung der generierten Hybride, da für alle, bei der Herstellung der Hybride verwendeten Kinasen bereits eine Vorphosphorylierung nachgewiesen werden konnte (4.2.6).

Für diese Experiment wurden je 10 μ g Hybrid in einem 10% SDS-Gel aufgetrennt. Nach dem Gellauf wurde ein Elektroblob durchgeführt und die PVDF-Membran mit α -Phosphotyrosin-Antikörpern inkubiert. In der Abbildung 4.26 ist das gefärbte SDS-Gel und die entwickelte PVDF-Membran abgebildet. Deutlich zu erkennen ist eine Vorphosphorylierung von drei Hybriden: Hybrid WT, Hybrid Y1150F, und Hybrid Y1151F. Das Hybrid Y1146F weist als einziges Konstrukt keine Vorphosphorylierung auf.



4.3.5 Dephosphorylierung der Hybride

Bei den Hybriden konnte eine ungleiche Vorphosphorylierung festgestellt werden. Während drei der Hybride nach der Reinigung vorphosphoryliert vorlagen (Hybrid WT, Hybrid Y1150F und Hybrid Y1151F), konnte bei dem Hybrid Y1146F keine Vorphosphorylierung nachgewiesen werden. Dies erschwert einen Vergleich der Hybride bezüglich ihrer Aktivität. Daher sollte versucht werden die vorphosphorylierten Hybride zu dephosphorylieren.

Die Phosphorylierungsreaktion unterliegt dem Massenwirkungsgesetz. Es ist also die Möglichkeit gegeben die Reaktion durch Zugabe von Produkt umzukehren. Daher wurden sowohl die Hybride als auch die GST-TEV-IRKDACT-Kinasen über einen Zeitraum von 30 min mit 30 mM ADP unter Standardbedingungen behandelt (30 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7,5). Dem Reaktionsansatz wurde alle 5 min Proben entnommen (je 10µg Protein) und auf einem 12% SDS-Gel aufgetrennt, anschließend geblotet und mit α-Phosphotyrosin-Antikörpern inkubiert.

In der Abbildung 4.27 sind exemplarisch die Blots für das Hybrid Y1151F und die GST-TEV-IRK Δ CT^{Y1151F} gezeigt. Es wurde auch nach 30 Minuten ADP-Behandlung sowohl beim Hybrid als auch bei der Kinase eine anhaltende Tyrosinphosphorylierung nachgewiesen.

Neben der Dephosphorylierung mit ADP wurden sowohl Hybride als auch die Referenzkinasen der enzymatischen Dephosphorylierung unterzogen. Dazu wurde das Enzym alkalische Phosphatase verwendet. Die Proteine wurden über einen Zeitraum von einer Stunde mit der alkalischen Phosphatase bei Raumtemperatur unter folgenden Bedingungen inkubiert: 10 μ M ZnCl₂, 0,5 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 1 mM DTT in 100 mM Tris/HCl pH 8,6. Nach 30 und 60 Minuten wurde dem Ansatz je 10 μ g Proteingemisch entnommen und geblotet. Wie aus der Abbildung 4.28 (exemplarisch die GST-TEV-IRK Δ CT^{Y1151F} dargestellt) ersichtlich wird, ist diese Methode nicht zur Dephosphorylierung vorliegender Kinasen und Hybride geeignet.

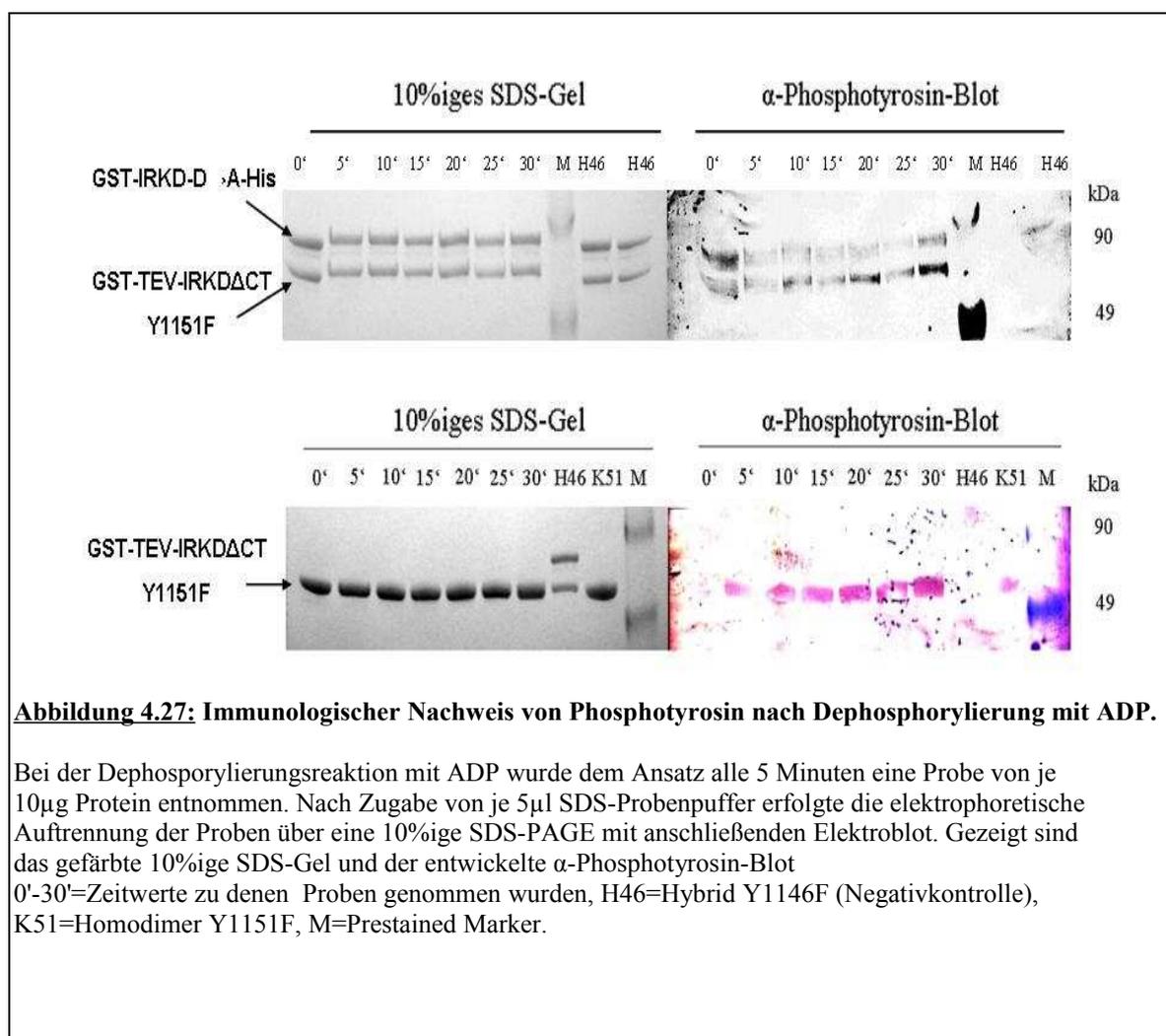
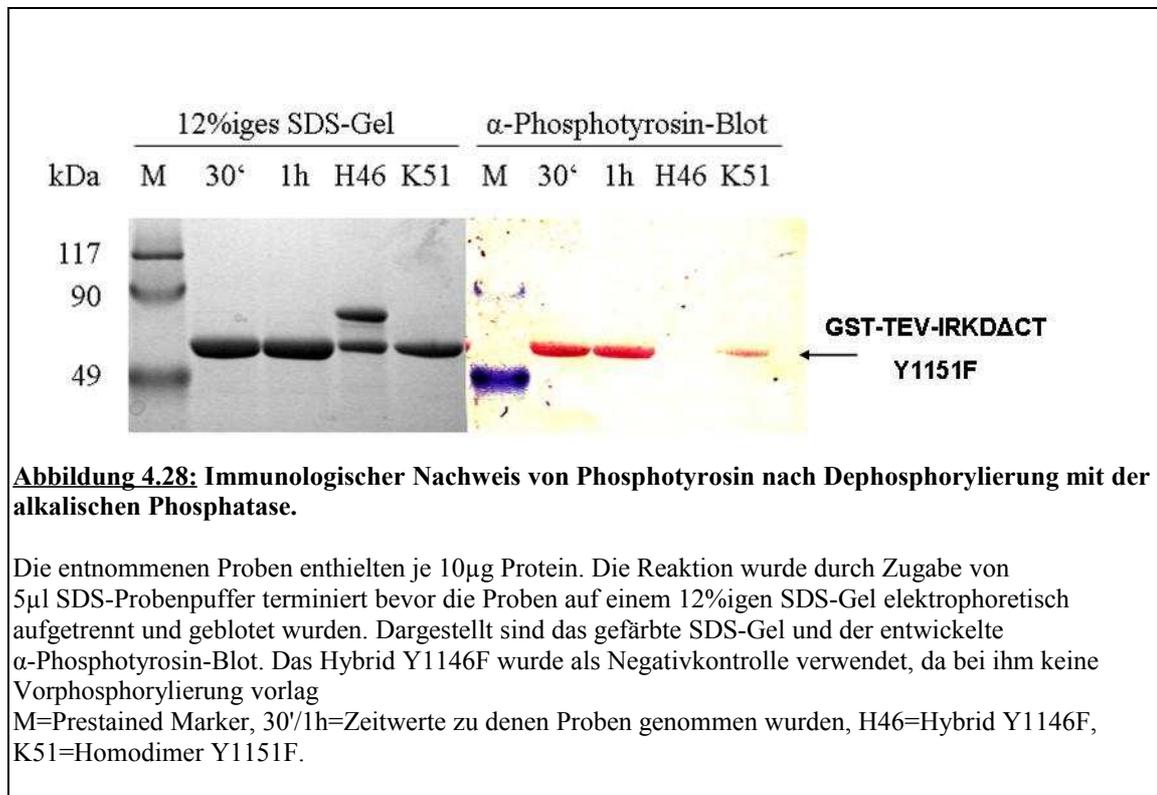


Abbildung 4.27: Immunologischer Nachweis von Phosphotyrosin nach Dephosphorylierung mit ADP.

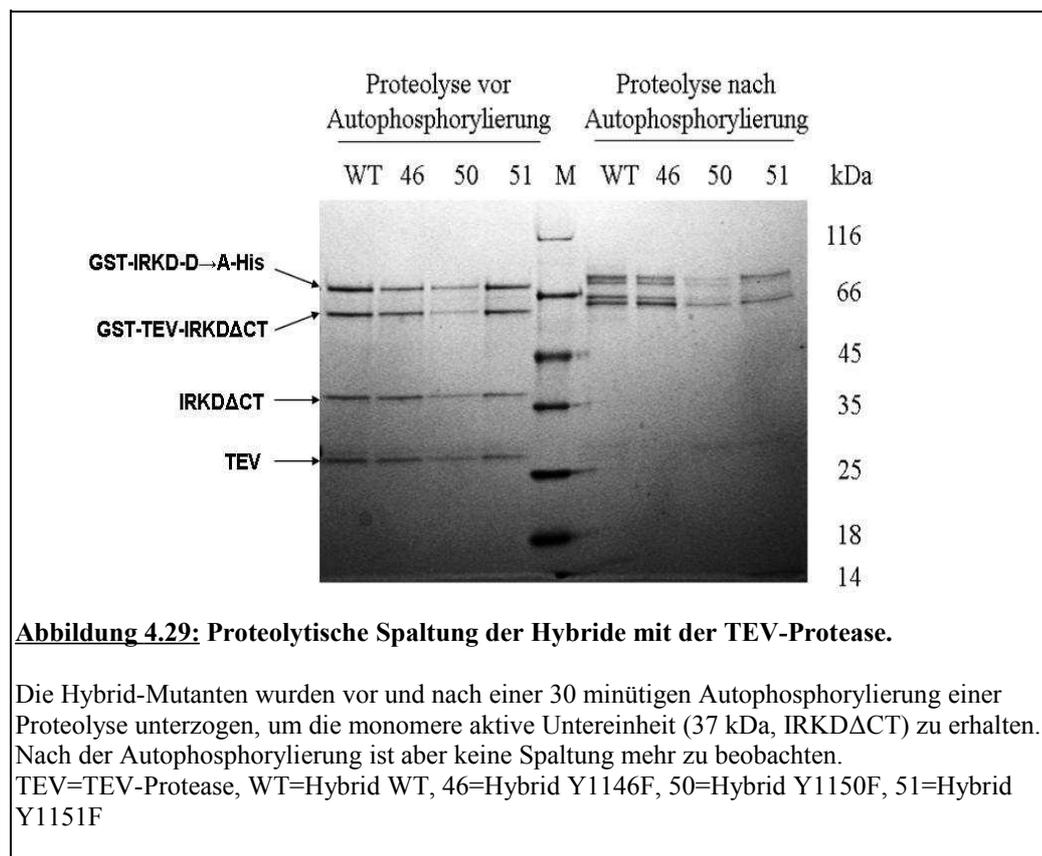
Bei der Dephosphorylierungsreaktion mit ADP wurde dem Ansatz alle 5 Minuten eine Probe von je 10 μ g Protein entnommen. Nach Zugabe von je 5 μ l SDS-Probenpuffer erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proben über eine 10%ige SDS-PAGE mit anschließenden Elektrobplot. Gezeigt sind das gefärbte 10%ige SDS-Gel und der entwickelte α -Phosphotyrosin-Blot
0'-30'=Zeitwerte zu denen Proben genommen wurden, H46=Hybrid Y1146F (Negativkontrolle), K51=Homodimer Y1151F, M=Prestained Marker.



4.3.6 Proteolytische Spaltung der Hybride

Die aktiven Kinaseuntereinheiten der Hybride (GST-TEV-IRKDACT^{WT}, GST-TEVTRKDACT^{Y1146F}, GST-TEV-IRKDACT^{Y1150F} und GST-TEV-IRKDA^{Y1151F}) enthalten alle eine Schnittstelle für die TEV-Protease. Die Kinasen konnten bereits durch TEV-Proteolyse erfolgreich monomerisiert werden. Die proteolytische Spaltung der Hybride ermöglicht eine gesonderte Untersuchung der aktiven Kinaseuntereinheit in der nativen PAGE, wodurch der Grad der Vorphosphorylierung untersucht werden kann. Ferner ist die Möglichkeit von Interesse, die aktive Kinaseuntereinheit nach vorangegangener Phosphorylierung (Auto- oder Substratphosphorylierung) hinsichtlich der Phosphorylierungsstufe zu untersuchen. Die Proteolyse wurde 4 Stunden unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 0,5 mM EDTA und 50 mM Tris/HCl pH 8,0. Nach der abgeschlossener Proteolyse wurde der Ansatz mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt und im 12% SDS-Gel aufgetrennt.

Neben den unphosphorylierten Proteinen wurden Hybride, die zuvor einer Autophosphorylierungsreaktion unter Standardbedingungen unterzogen wurden, für die proteolytische Spaltung eingesetzt.



Die Abbildung 4.29 zeigt die Ergebnisse der proteolytischen Spaltung der Hybride vor und nach der Autophosphorylierung. Vor der Autophosphorylierung ist eine Bande auf Höhe von 37 kDa sichtbar, die der monomeren aktiven Kinaseuntereinheit zugeordnet werden kann. Da jedoch keine Abnahme der unteren Proteinbande des Hybrids (aktive Kinaseuntereinheit mit GST-Tag) erkennbar ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Proteolyse nur zu einem geringen Maß stattfindet. Nach der Autophosphorylierung findet augenscheinlich keine Proteolyse der Hybride mehr statt.

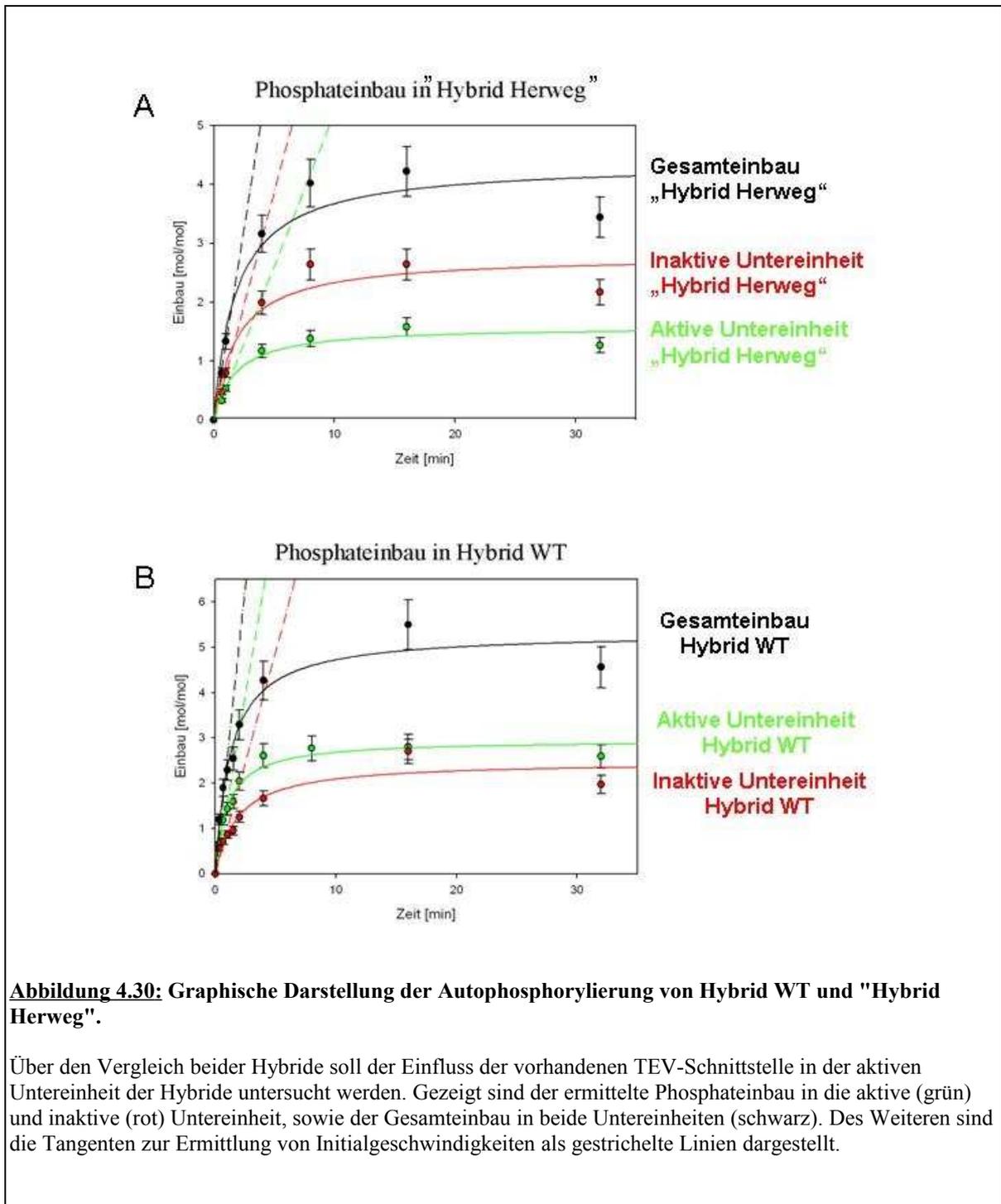
4.4 Charakterisierung der Hybride

Die gereinigten Hybride wurden auf ihre Aktivität bezüglich der Autophosphorylierung und der Substratphosphorylierung untersucht. Alle Versuche wurden mehrfach durchgeführt (n=3-6) und sind im Mittel oder exemplarisch gezeigt. Die Phosphorylierungsreaktionen erfolgten unter normierten Bedingungen. Des Weiteren wurden alle Hybride bzw. die Referenzkinasen auf ihre aktiven Untereinheiten normiert eingesetzt.

4.4.1 Untersuchungen des Einflusses der TEV-Schnittstelle auf die katalytische Aktivität der Hybride

Die TEV-Schnittstelle verfügt über ein Tyrosin, das, wie frühere Arbeiten gezeigt haben, ebenfalls phosphoryliert werden kann. Um zu klären, welchen Einfluss die TEV-Schnittstelle auf die katalytische Aktivität der Hybride hat, wurde das vorgestellte Hybrid WT mit dem lebend/tot Hybrid von Herweg (Herweg 2007), das über keine TEV-Schnittstelle verfügt, verglichen.

Hierfür wurden beide Hybride einer Autophosphorylierungsreaktion mit 1 mM γ [³²P]-ATP unterzogen. Die Reaktion verlief unter Standardbedingungen (1 mM DTT, 30 μ M MgCl₂, pH 7,5) und wurde zum jeweiligen Zeitwert mit SDS-Probenpuffer abgestoppt. Die Proben wurden über eine 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt, ihre Radioaktivität mittels Autoradiographie detektiert und durch Cerenkov-Messung quantifiziert. Um quantitative Aussagen über die Aktivität der Hybride treffen zu können, wurde der Phosphattransfer [mol übertragenes Phosphat], der Phosphateinbau (mol übertragenes Phosphat / mol aktive Untereinheit) und die Initialgeschwindigkeit (mol übertragenes Phosphat / mol aktive Untereinheit / min) ermittelt und graphisch dargestellt (Abbildung 4.30).



Im Ergebnis verhielten sich beide Hybride bezüglich des Gesamtphosphateinbaus nahezu gleich. Der Gesamteinbau resultiert aus der Summe des Einbaus in beide Untereinheiten des jeweiligen Hybrids. Bereits nach 15 Minuten ist der maximale Phosphateinbau bei beiden

Hybriden zu beobachten. Sowohl das Hybrid WT, als auch das „Hybrid Herweg“ zeigen einen maximalen Gesamteinbau von 4,1 mol/mol (Tabelle 4.11). Unterschiede werden erst deutlich, wenn der Phosphateinbau in die Untereinheiten näher betrachtet wird. Die aktive Untereinheit des „Hybrid Herweg“ baut mit 1,5 mol/mol weniger ein als die aktive Untereinheit des Hybrid WT, die 2,2 mol/mol einbaut. Anders verhält es sich bei dem Phosphateinbau in die katalytisch defiziente Untereinheit. Hier baut das „Hybrid Herweg“ mit 2,6 mol/mol mehr ein als das Hybrid WT (mit 1,8 mol/mol). Theoretisch ist für die aktive Untereinheit ein maximaler Einbau von 4 mol/mol im „Hybrid Herweg“ und 5 mol/mol im Hybrid WT möglich. In die inaktive Untereinheit ist für beide Hybride ein Phosphateinbau von maximal 6 mol/mol zu erreichen. Somit erzielen beide Hybride in ihre Untereinheiten nicht annähernd den theoretisch möglichen Phosphateinbau.

	Hybrid WT gesamt	Hybrid WT aktive Untereinheit	Hybrid WT inaktive Untereinheit
Phosphateinbau (mol/mol)	4,1	2,2	1,8
Initialgeschwindigkeit (mol/mol/min)	1,9	1,0	0,9
	„Hybrid Herweg“ gesamt	„Hybrid Herweg“ aktive Untereinheit	„Hybrid Herweg“ inaktive Untereinheit
Phosphateinbau (mol/mol)	4,1	1,5	2,6
Initialgeschwindigkeit (mol/mol/min)	1,3	0,5	0,8

Tabelle 4.11: Phosphateinbau und Initialgeschwindigkeiten des Hybrids WT und "Hybrids Herweg".

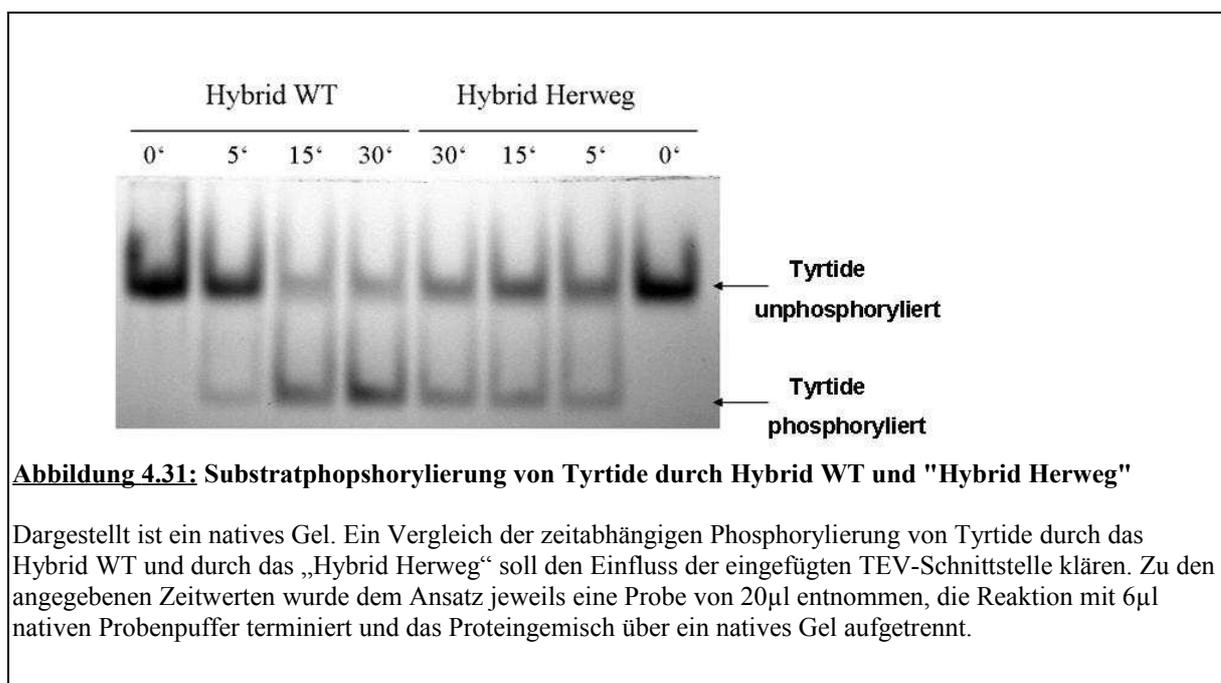
Das Vorhandensein einer TEV-Schnittstelle in der aktiven Kinaseuntereinheit des Hybrid WT führte zu einer Veränderung der Initialgeschwindigkeiten. Die Initialgeschwindigkeit für den Gesamteinbau ist bei beiden Hybriden annähernd gleich, jedoch findet der Einbau in die aktive Untereinheit des Hybrid WT schneller statt als beim „Hybrid Herweg“, dagegen ist der Einbau in die inaktive Untereinheit des Hybrid WT gegenüber dem Hybrid Herweg verlangsamt.

Das Einfügen der TEV-Schnittstelle führte demnach zu einem geringeren und verlangsamt Phosphateinbau in die katalytisch defiziente Untereinheit des Hybrid WT. Gleichzeitig kann

ein erhöhter und schnellerer Phosphateinbau in die aktive Untereinheit des Hybrid WT verzeichnet werden.

Der Einfluss der vorhandenen TEV-Schnittstelle auf die katalytische Aktivität der Hybride soll auch bezüglich der Substratphosphorylierung untersucht werden. Um eine sinnvolle Aussage treffen zu können ist es notwendig die Aktivität des Hybrids WT mit dem „Hybrid Herweg“ im direkten Vergleich zu testen.

Für diesen Vergleich wurde eine zeitabhängige Substratphosphorylierung von 50 μM Tyrtide durch 100 nM Hybrid unter Standardbedingungen (10 mM ATP, 30 mM MgCl_2 , 1 mM, pH 7,5) durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von nativen Probenpuffer unterbrochen und die Proben über native PAGE aufgetrennt.

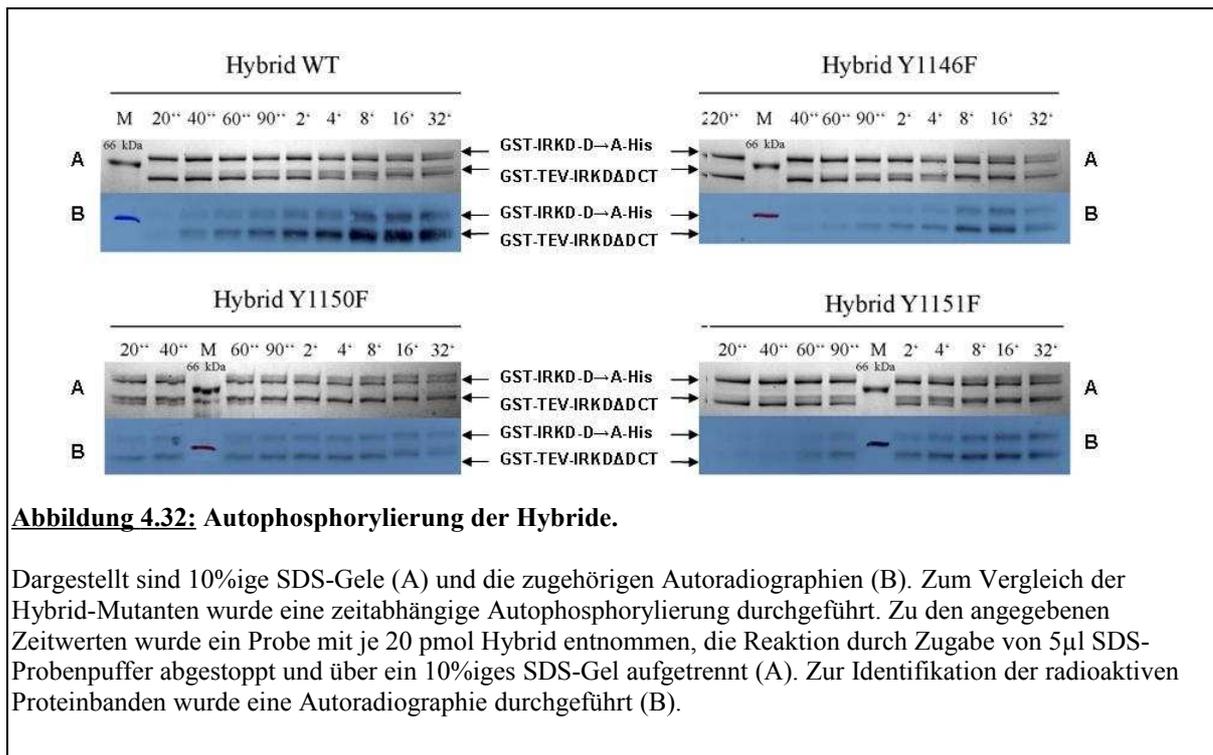


Auch im Bezug auf die Substratphosphorylierung in der nativen PAGE (Abbildung 4.31) konnte kein Unterschied zwischen dem Hybrid WT und dem „Hybrid Herweg“ ohne TEV-Schnittstelle festgestellt werden.

4.4.2 Autophosphorylierung der Hybride

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die vorhandene TEV-Schnittstelle keinen störenden Einfluss auf die Gesamtaktivität der Hybride hat, wurden die Hybrid-Mutanten zunächst auf ihr Verhalten in der Autophosphorylierung untersucht. Alle folgenden Aussagen bezüglich einer ermittelten katalytischen Aktivität, sowohl bei den Hybride als auch bei den Referenzkinasen, beziehen sich auf die Anzahl der aktiven Untereinheiten.

Dazu wurde eine zeitabhängige Autophosphorylierung unter Standardbedingungen durchgeführt (1 μ M je Hybrid, 1 mM γ [32 P]-ATP, spezifischen Aktivität von 150 cpm /pmol ATP, 1 mM DTT, 30 μ M $MgCl_2$, pH 7,5). Den Phosphorylierungsansätzen wurden zu festgelegten Zeitpunkten Proben entnommen, die Reaktionen mit SDS-Probenpuffer gestoppt und die Proben anschließend im 10%SDS-Gelen aufgetrennt.

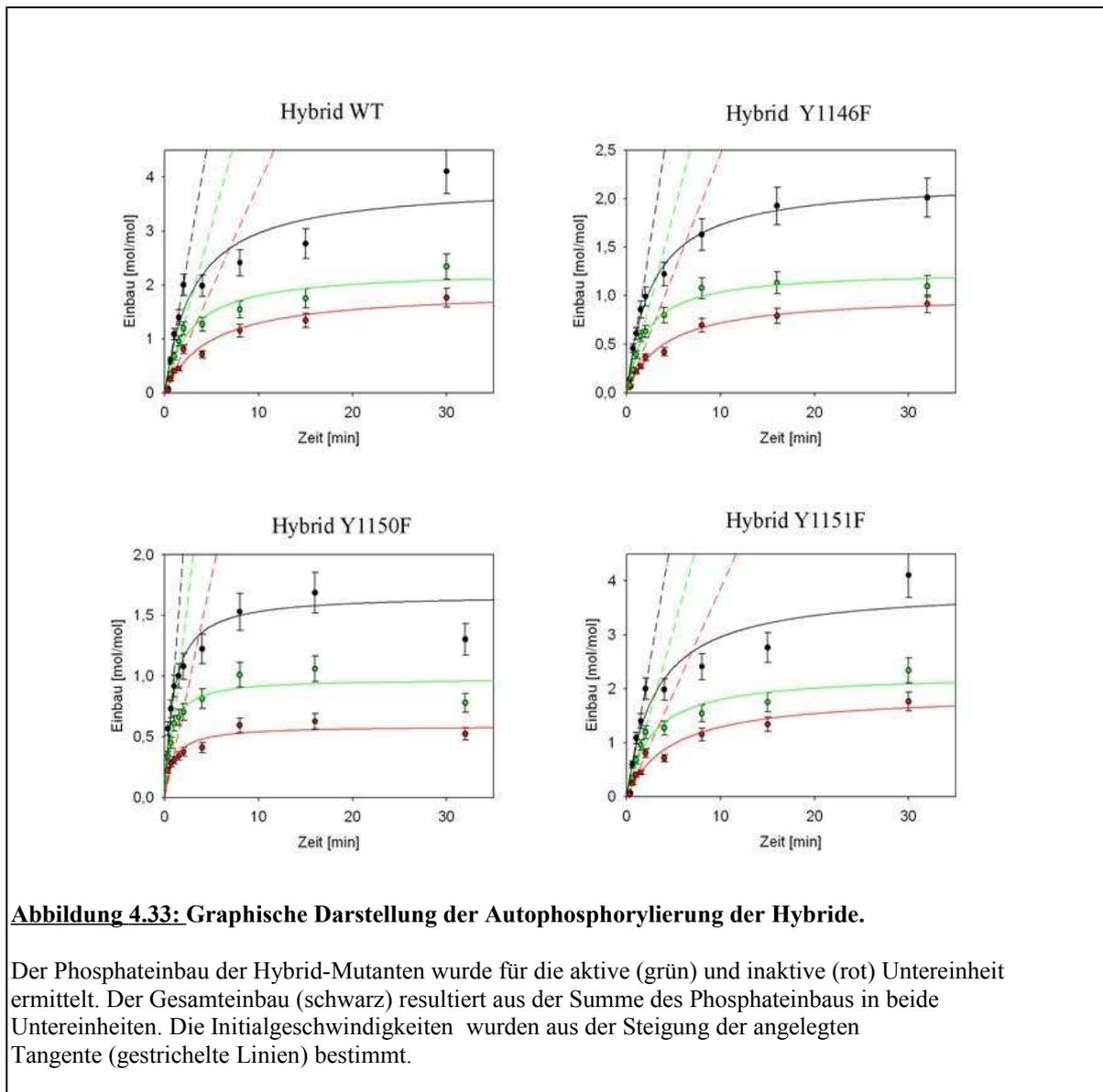


Im Anschluss wurden die Gele angefärbt und autoradiographiert (Abbildung 4.32). Die radioaktiven Banden der Gele wurden ausgeschnitten und mittels Cerenkov-Messung quantifiziert.

Um quantitative Aussagen über die Aktivität der Hybride treffen zu können, wurde der Phosphattransfer (mol übertragenes Phosphat), der Phosphateinbau (mol übertragenes Phosphat/ mol Kinase) und die Initialgeschwindigkeit (mol übertragenes Phosphat/ mol Kinase/ min) der beiden Untereinheiten der Hybride ermittelt und graphisch dargestellt (Abbildung 4.33).

Bei allen Hybrid-Mutanten konnte bereits nach neunzig Sekunden ein deutlicher Phosphateinbau in beide Untereinheiten detektiert werden, das an der Schwärzung des Röntgenfilms gut erkennbar ist (Abbildung 4.32B). Dabei ist ein stärkerer Phosphateinbau in die katalytisch defiziente Untereinheit erkennbar. Im Gel macht sich der zunehmende Phosphateinbau durch einen Shift der jeweiligen Proteinbande zu einem höheren apparenten Molekulargewicht bemerkbar. Durch zunehmende Phosphorylierung erscheinen die Proteinbanden diffuser.

Bei allen Hybriden wurde der Phosphateinbau in die aktive und in die katalytisch defiziente Untereinheit ermittelt. Der Gesamteinbau resultiert aus der Summe des Phosphateinbaus in die aktive und inaktive Untereinheit des jeweiligen Hybrids. Auf den ersten Blick ist erkennbar, dass sich bei allen Hybriden das Verhältnis des Phosphateinbaus in die aktive und inaktive Untereinheit ähnelt. (vgl. Abbildung 4.33).



Dies wird auch nach qualitativer Auswertung der Daten bestätigt (Tabelle 4.12). Demnach findet der Phosphateinbau zu ca. 60% in die aktive und zu ca. 40% in die katalytisch defiziente Untereinheit der Hybride statt. Dies gilt ungeachtet der absolut erreichten Phosphateinbauten. Die sich bei der Phosphatinkorporation abzeichnende Tendenz ist auch bei den Initialgeschwindigkeiten wieder zu erkennen. Der Phosphateinbau in die aktive Untereinheit der Hybride trägt ca. 60% und der Phosphateinbau in die inaktive Untereinheit ca. 40% zur Gesamtinitialgeschwindigkeit bei.

	<u>Hybrid WT</u> Gesamteinbau	<u>Hybrid WT</u> akt. Untereinheit	<u>Hybrid WT</u> inakt. Untereinheit
Phosphateinbau (mol/mol)	4,1	2,2	1,8
Anteil Phosphateinbau(%)	100	54	44
Initialgeschwindigkeit (mol/mol/min)	1,9	1,0	0,9
Anteil Initialgeschwindigkeit(%)	100	53	47

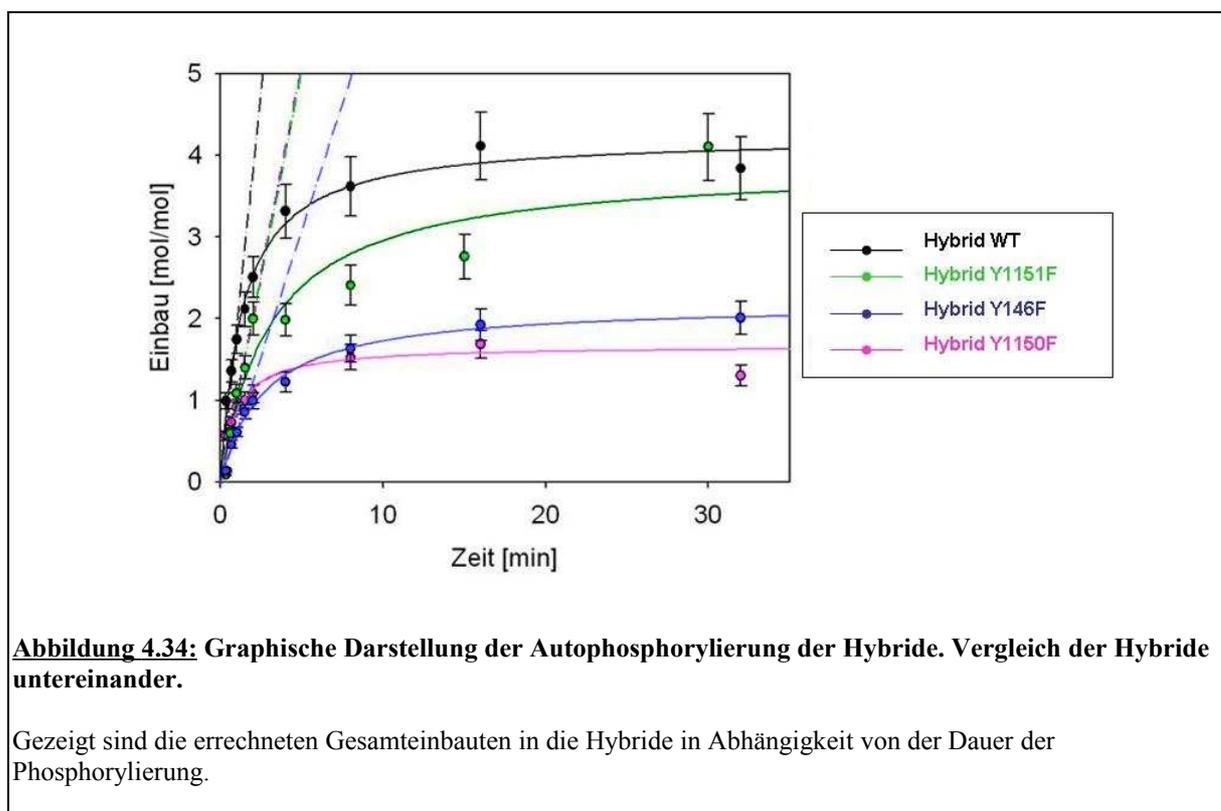
	<u>Hybrid Y1146F</u> Gesamteinbau	<u>Hybrid Y1146F</u> akt. Untereinheit	<u>Hybrid Y1146F</u> inakt. Untereinheit
Phosphateinbau (mol/mol)	2,0	1,2	0,9
Anteil Phosphateinbau(%)	100	60	40
Initialgeschwindigkeit (mol/mol/min)	0,6	0,4	0,2
Anteil Initialgeschwindigkeit(%)	100	67	33

	<u>Hybrid Y1150F</u> Gesamteinbau	<u>Hybrid Y1150F</u> akt. Untereinheit	<u>Hybrid Y1150F</u> inakt. Untereinheit
Phosphateinbau (mol/mol)	1,6	1,0	0,6
Anteil Phosphateinbau(%)	100	36	38
Initialgeschwindigkeit (mol/mol/min)	1,0	0,7	0,4
Anteil Initialgeschwindigkeit(%)	100	70	30

	Hybrid Y1151F Gesamteinbau	Hybrid Y1151F akt. Untereinheit	Hybrid Y1151F inakt. Untereinheit
Phosphateinbau (mol/mol)	3,6	2,1	1,6
Anteil Phosphateinbau(%)	100	58	44
Initialgeschwindigkeit (mol/mol/min)	1,0	0,6	0,4
Anteil Initialgeschwindigkeit(%)	100	60	40

Tabelle 4.12: Phosphateinbau und Initialgeschwindigkeiten der Hybride unter Berücksichtigung der Untereinheiten.

Bei einem direkten Vergleich des Phosphatgesamteinbaus in die Hybride werden jedoch die Unterschiede zwischen den Hybriden deutlich.



Das Hybrid WT zeigt sowohl den höchsten Phosphateinbau als auch die höchste Initialgeschwindigkeit. Beim Hybrid Y1151F konnte zwar ein ähnlich hoher Phosphateinbau

detektiert werden, jedoch erfolgt dieser nur halb so schnell. Die Hybride Y1146F und Y1150F weisen dagegen nur einen etwa halb so großen Einbau auf. Wie schon bei Hybrid Y1151F ist der Phosphateinbau bei Hybrid Y1150F ebenfalls nur halb so schnell im Vergleich zum Hybrid WT. Beim Hybrid Y1146F erfolgt der Phosphateinbau besonders langsam, diese Hybrid liegt aber auch als Einziges nicht vorphosphoryliert vor.

In einem weiteren Schritt sollten die Hybrid-Mutanten untereinander und mit den entsprechenden GST-TEV-IRKΔACT-Kinasekonstrukten verglichen werden.

Für den Vergleich der Hybrid-Mutanten mit den jeweiligen Referenzkinasen wurde eine zeitabhängige Autophosphorylierung (1 μM Hybrid und 0,5 μM Homodimer) unter Standardbedingungen (1 mM γ [³²P]-ATP, spezifischen Aktivität von 150 cpm / pmol ATP, 1 mM DTT, 30 μM MgCl₂, pH 7,5) durchgeführt.

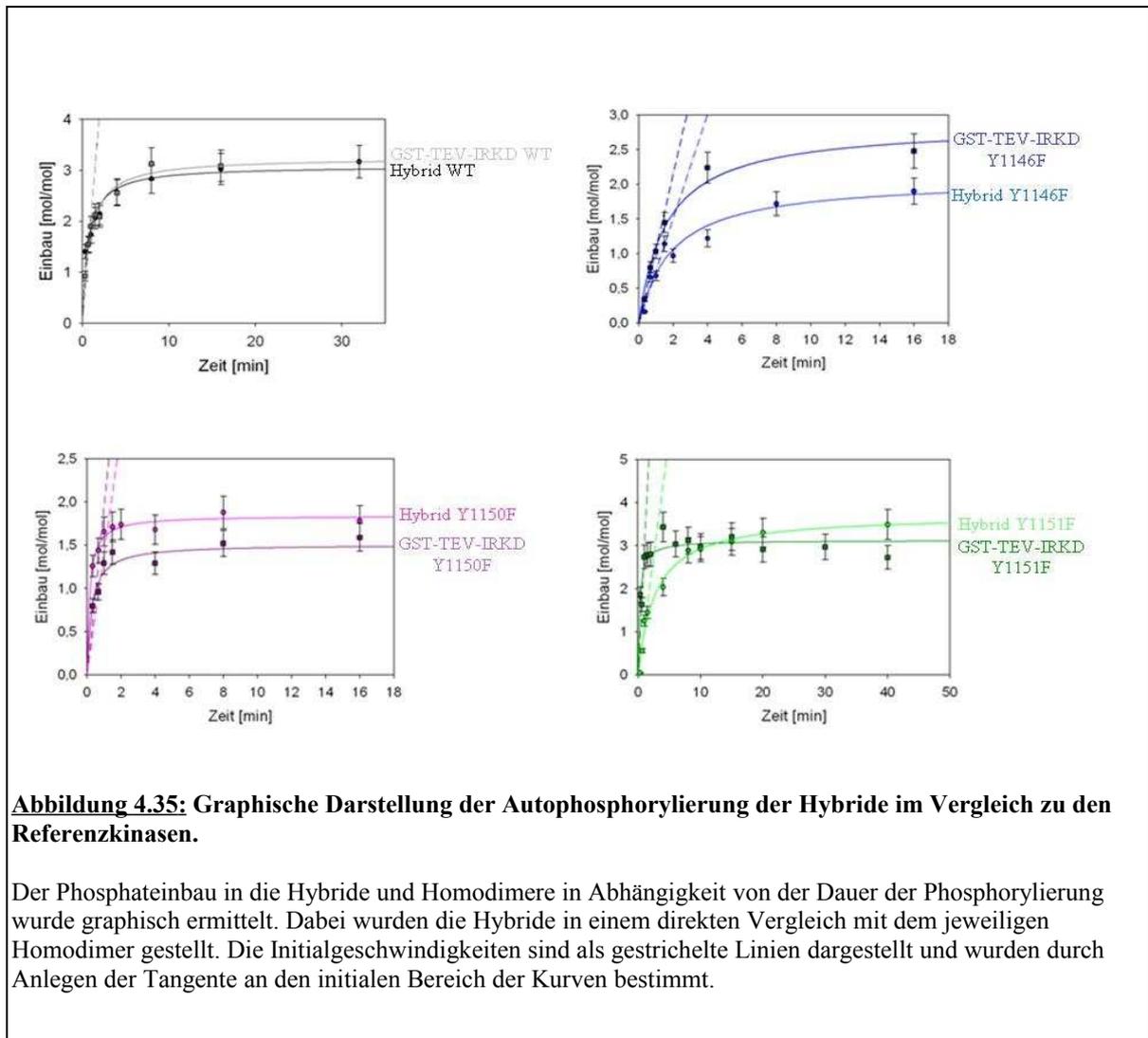
Dieser Vergleich ergab ein analoges Verhalten der einzelnen Hybride mit den zugehörigen Referenzkinasen sowohl in Bezug auf den Phosphateinbau als auch die Initialgeschwindigkeit (vgl. Tabelle 4.13 und Tabelle 4.14). Die einzige Ausnahme bildet das Hybrid Y1146F, das die gleiche Initialgeschwindigkeit wie die Referenzkinase aufweist, jedoch nicht den gleichen Phosphateinbau erreicht (Hybrid Y1146F 1,9 mol/mol; Homodimer Y1146F 2,6 mol/mol). Dabei muss aber beachtet werden, dass die GST-TEV-IRKΔACT^{Y1146F} vorphosphoryliert ist, das Hybrid Y1146F jedoch nicht.

	<u>Hybrid WT</u>	<u>Hybrid Y1146F</u>	<u>Hybrid Y1150F</u>	<u>Hybrid Y1151F</u>
Phosphateinbau (mol/mol)	3,0	1,9	1,8	3,5
Initialgeschwindigkeit (mol/mol/min)	2,0	0,8	1	1,1

Tabelle 4.13: Phosphateinbau und Initialgeschwindigkeiten der Hybride.

	<u>GST-TEV- IRK^{WT}</u>	<u>GST-TEV- IRK^{Y1146F}</u>	<u>GST-TEV- IRK^{Y1150F}</u>	<u>GST-TEV- IRK^{Y1150F}</u>
Phosphateinbau (mol/mol)	3,2	2,6	1,5	3,1
Initialgeschwindigkeit (mol/mol/min)	2,0	1,0	1,4	1,8

Tabelle 4.14: Phosphateinbau und Initialgeschwindigkeiten der Kinasen.



4.4.3 Substratphosphorylierung durch die Hybride

In ersten Schritten der Charakterisierung der Hybride konnte eine qualitativ erfassbare katalytische Aktivität in der Autophosphorylierung gezeigt werden. Von Interesse ist hier auch das Verhalten der generierten Hybride in der Substratphosphorylierung. Zum Nachweis der Aktivität eignet sich die Phosphorylierung des hIRS-1 Peptides Tyrtide. Zusätzlich sollte die Substratphosphorylierung mit dem artifiziiellen Substrat PolyGluTyr durchgeführt werden,

um die Auswirkung von spezifischen Enzym-Substrat-Wechselwirkungen genauer zu untersuchen.

Im ersten Schritt der Charakterisierung der Hybride in der Substratphosphorylierung sollte ein Vergleich zwischen den Hybriden, den zugehörigen Referenzkinasen und dem voraktivierten monomeren Kinasen bei der Phosphorylierung von Tyrtide durchgeführt werden. Dazu wurde ein Zeitwert gewählt, bei dem die Hälfte des eingesetzten Substrates umgesetzt wird. Geeignet war dafür eine Substratphosphorylierung von 50 μ M Tyrtide durch 100 nM Hybrid für 15 Minuten unter Standardbedingungen (10 mM ATP, 30 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, pH 7,5). Die Reaktion wurde durch Zugabe von nativen Probenpuffer unterbrochen und die Proben im nativen Gel aufgetrennt. Als Kontrollen dienten die jeweiligen GST-TEV-IRKDACT-Kinasen (50 nM) und die vorphosphorylierten Monomere (IRKDACT^{WT}, IRKDACT^{Y1146F}, IRKDACT^{Y1150F}, IRKDACT^{Y1151F}, mit jeweils 100 nM), die den aktiven Untereinheiten der Hybride entsprechen. Vorab wurden je 10 μ M Monomer (1 mM ATP, 30 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, pH 7,5) für 30 Minuten vorphosphoryliert, um diese zu aktivieren. Durch die hohe lokale Konzentration der monomeren Kinasen wird ein Aktivierungsgrad erreicht, der bei den Hybriden und Homodimeren allein durch die GST-vermittelte Dimerisierung zustande kommt.

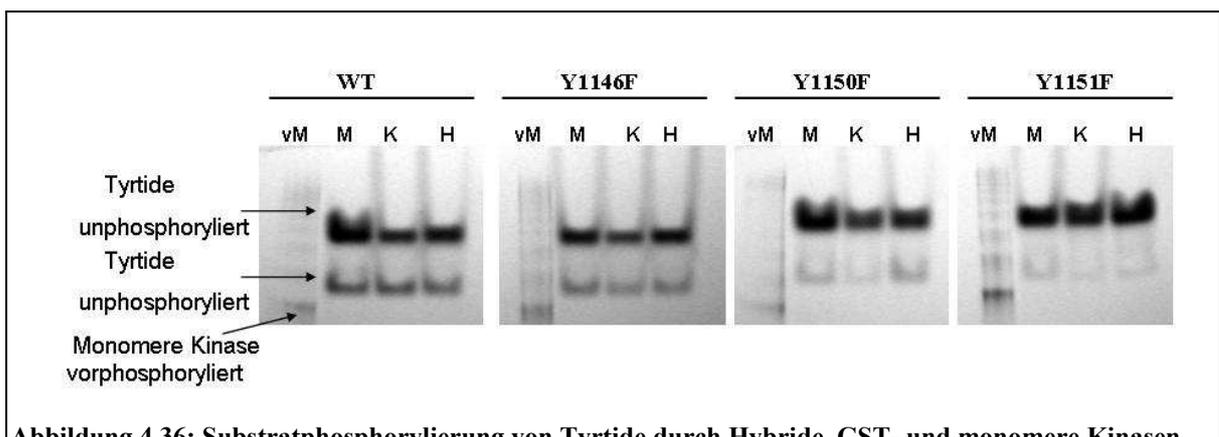


Abbildung 4.36: Substratphosphorylierung von Tyrtide durch Hybride, GST- und monomere Kinasen.

Gezeigt sind native Gele.

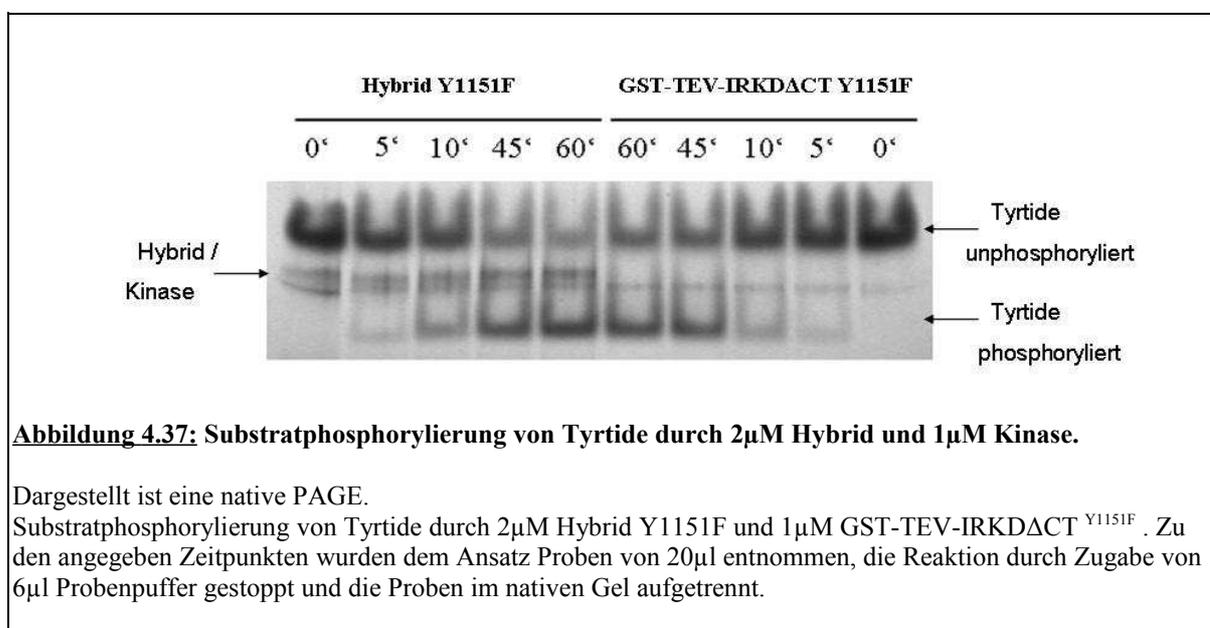
Substratphosphorylierung von Tyrtide, durchgeführt für 15 min, durch Hybride, GST- und voraktivierte monomere Kinasen.

vM=vorphosphorylierte monomere Kinase, M=Tyrtidephosphorylierung durch vorphosphoryliertes Monomer, K=Tyrtidephosphorylierung durch die GST-Kinase, H=Tyrtidephosphorylierung durch Hybride.

In der Abbildung 4.36 sind die nativen Gele der Substratphosphorylierung dargestellt. Eine Übereinstimmung in der Aktivität der Hybride mit den jeweiligen Referenzkinasen und den Monomeren konnte beobachtet werden. Obwohl alle Hybride katalytische Aktivität in der Autophosphorylierung gezeigt haben, konnte für die Hybride Y1150F und Y1151F keine nennenswerte katalytische Aktivität in der Substratphosphorylierung von Tyrtide nachgewiesen werden. Das Hybrid Y1146F zeigt eine etwas abgeschwächte katalytische Aktivität in der Substratphosphorylierung von Tyrtide verglichen mit dem Hybrid WT.

Da alle Hybride in der Autophosphorylierung Fähigkeit zu *trans*-Phosphorylierung zeigten, was für Hybride Y1150 und Y1151 in der Substratphosphorylierung nicht nachgewiesen werden konnte, sollten diese Hybride höher konzentriert und für längere Zeit in einer Substratphosphorylierungsreaktion von Tyrtide eingesetzt werden. Hierzu wurde 50nM Tyrtide unter Startbedingungen durch je 2 μ M Hybride phosphoryliert. Die Reaktionszeit betrug 60 Minuten. Zu festgelegten Zeitpunkten wurden den Reaktionansätzen Proben entnommen, die Reaktionen in Propobenpuffer terminiert und über native Gele aufgetrennt.

Als Referenz diente die GST-TEV-IRKDACT^{Y1151F}.



Die Abbildung 4.37 zeigt exemplarisch die native PAGE der zeitabhängigen Substratphosphorylierung von Tyrtide durch HybridY1151F und die zugehörige

Referenzkinase. Hierbei ist deutlich ist eine Phosphorylierung von Tyrtide erkennbar. Nach 45 Minuten erreichte das Hybrid Y1151F eine ähnliche Umsetzung des Substrates wie des Hybrid WT (nach bereits 15 Minuten) und mit einer zwanzigfach geringeren Konzentration (100 nM). Dies kann ebenfalls für GST-TEV-IRKDACT^{Y1151F} bestätigt werden.

Eine mögliche Erklärung für die verringerte Aktivität der Hybrid-Mutanten Y1150F und Y1151F gegenüber dem Hybrid WT könnte eine Inhibition der Autophosphorylierung durch das Substrat Tyrtide sein. Um dies auszuschließen wurden exemplarisch die Hybride WT und Y1151F zunächst mit 10 mM ATP unter Standardbedingungen in einer Autophosphorylierungsreaktion für 30 min vorphosphoryliert, und anschließend für eine zeitabhängige Substratphosphorylierung von 50 μ M Tyrtide eingesetzt.

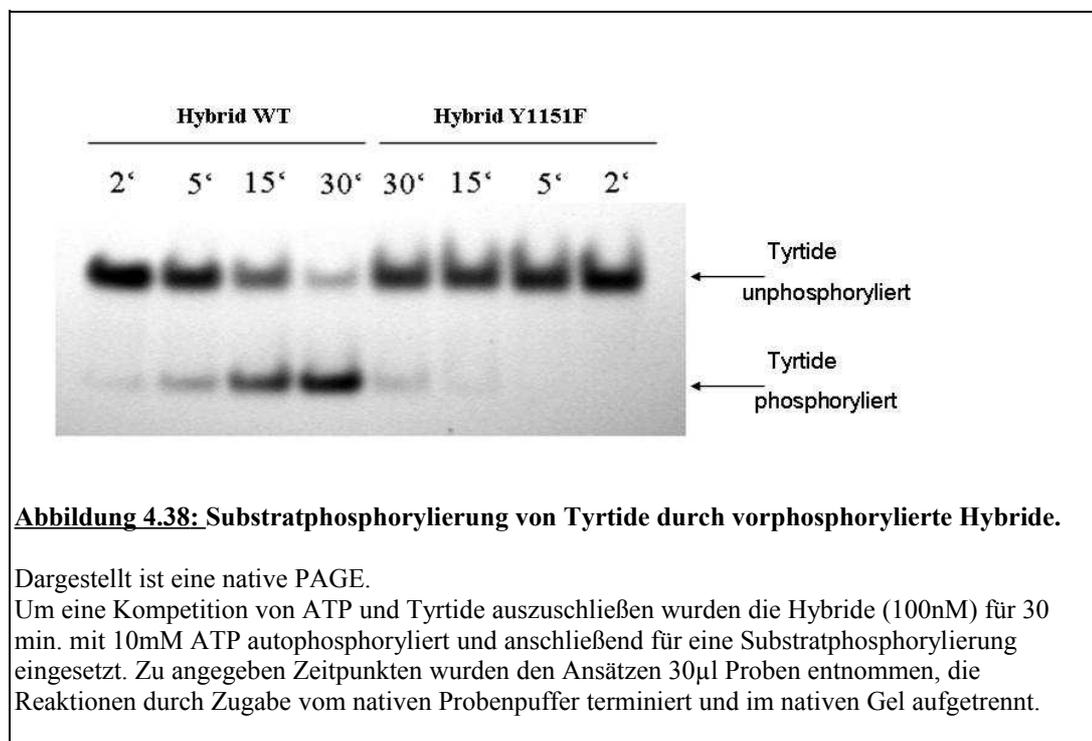


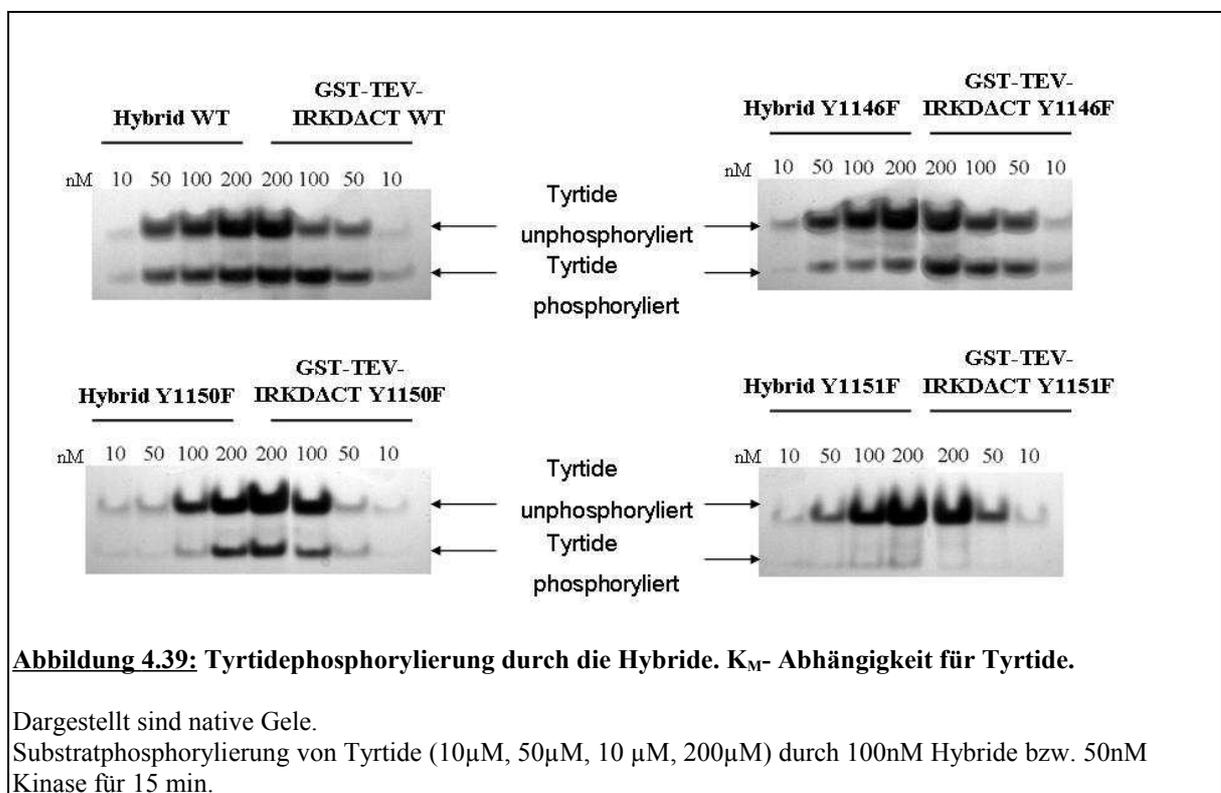
Abbildung 4.38: Substratphosphorylierung von Tyrtide durch vorphosphorylierte Hybride.

Dargestellt ist eine native PAGE.

Um eine Kompetition von ATP und Tyrtide auszuschließen wurden die Hybride (100nM) für 30 min. mit 10mM ATP autophosphoryliert und anschließend für eine Substratphosphorylierung eingesetzt. Zu angegeben Zeitpunkten wurden den Ansätzen 30 μ l Proben entnommen, die Reaktionen durch Zugabe vom nativen Probenpuffer terminiert und im nativen Gel aufgetrennt.

Für das Hybrid WT ist keine sichtbare Änderung der katalytischen Aktivität durch die Vorphosphorylierung erkennbar (Abbildung 4.38). Für das Hybrid Y1151F konnte nach 30 min. Substratphosphorylierung eine vergleichbare Aktivität wie für das Hybrid WT bereits nach 5 min. detektiert werden. Dies bedeutet eine 6-fache Verringerung der katalytischen Aktivität des Hybrids Y1151F in der Substratphosphorylierung verglichen mit dem Hybrid WT.

Die Diskrepanz der katalytischen Aktivität der Hybride könnte durch eine Erhöhung des K_m -Wertes für Tyrtide hervorgerufen werden. Um dies zu klären wurde erneut eine Substratphosphorylierung bei konstanten Hybridkonzentrationen (100 nM) und steigenden Tyrtidekonzentrationen (10 μ M, 50 μ M, 100 μ M und 200 μ M) durchgeführt. Bei einer Verschlechterung des K_m -Wertes ist eine Zunahme der Phosphorylierung von Tyrtide zu erwarten. Die Substratphosphorylierung wurde mit 100 nM Hybrid bzw. 50 nM Referenzkinase unter Standardbedingungen durchgeführt. Nach 15 Minuten erfolgte die Termination der Reaktion durch Zugabe von nativen Probenpuffer.

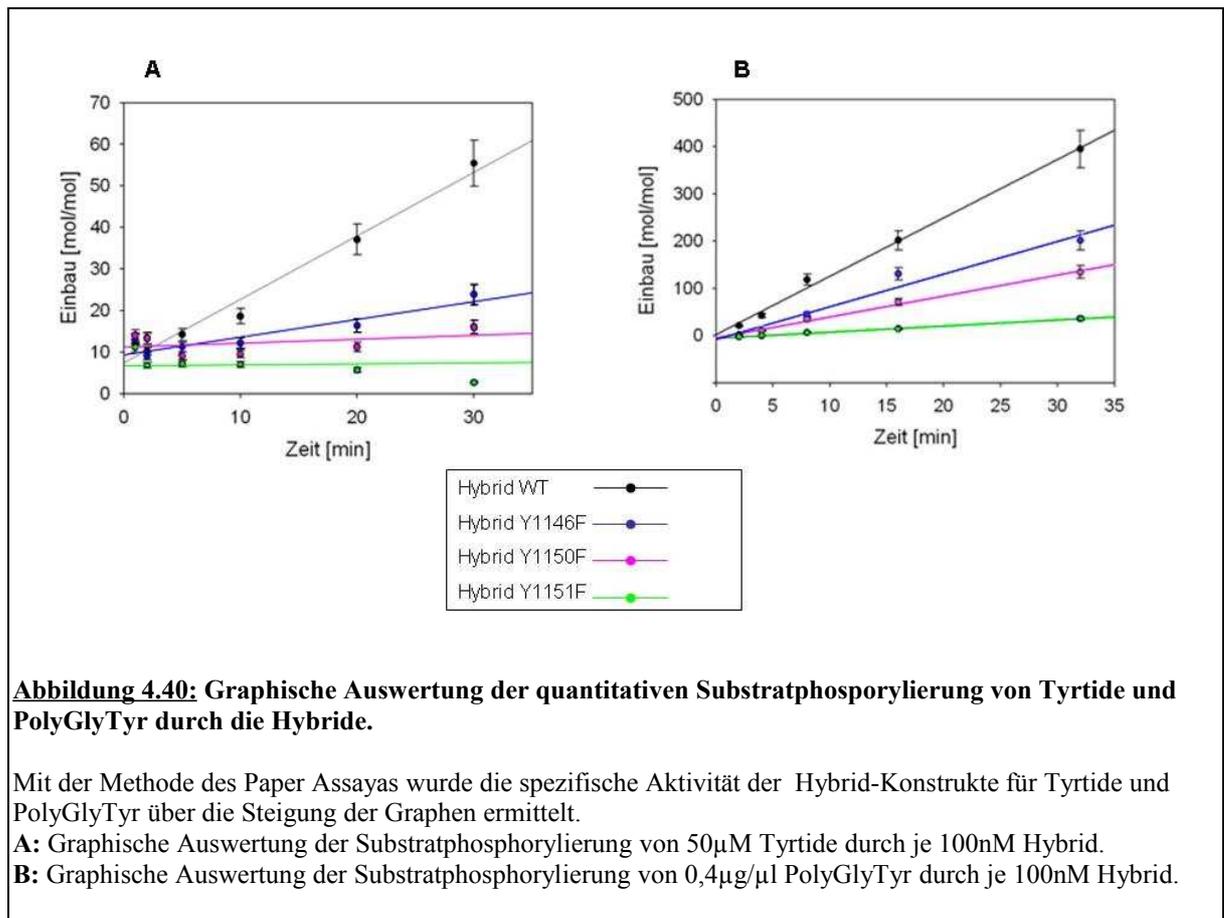


Wie in der Abbildung 4.39 dargestellt, zeigen sowohl die Hybride als auch die Kinasen eine Zunahme der Phosphorylierung von Tyrtide mit zunehmender Substratkonzentration. Die relativen Unterschiede zwischen den einzelnen Konstrukten, bezüglich ihrer katalytischen Aktivität, bleiben jedoch weiterhin bestehen. Wiederum zeigen das Hybrid und Kinase WT den größten Umsatz von Tyrtide, gefolgt von den Y1146F Mutanten. Das Hybrid Y1150F und das Homodimer zeigen eine deutlich verringerte Aktivität im Bezug auf die

Substratphosphorylierung. Jedoch kann sowohl bei dem Hybrid Y1151F als auch bei dem zugehörigen Homodimer erneut keine nennenswerte katalytische Aktivität nachgewiesen werden.

Nach der densitometrischen Auswertung der Substratphosphorylierung der Hybride sollte hier die Quantifizierung der katalytische Aktivität der Hybride bezüglich der Substratphosphorylierung untersucht werden. Hierzu wurde die Methode des Paper-Assays verwendet (6.2.9). Als Substrate wurden Tyrtide und PolyGlyTyr ausgewählt.

Um die katalytische Aktivität der Hybrid-Mutanten quantitativ erfassen zu können wurde der Phosphateinbau in das Substrat Tyrtide bzw. PolyGlyTyr mit radioaktiv markiertem γ [P³²]-ATP gemessen. Zu diesem Zweck wurde eine zeitabhängige Substratphosphorylierung von 50 μ M Tyrtide bzw. 0,4g/ μ l PolyGlyTyr unter Standardbedingungen (30 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7,5) mit 100 nM je Hybrid und 1 mM γ [P³²]-ATP (150 cpm/pmol ATP) durchgeführt. Die Reaktion wurde zu den festgelegten Zeiten (2', 4', 8', 16', 32') durch Zugabe von 6 μ l 0,5M EDTA je 10 μ l Probe gestoppt. In einer Doppelbestimmung wurden die Proben auf Phosphozellulose-Papier getropft, nach mehreren aufeinander folgenden Waschschritten die Radioaktivität mittels Cerenkov-Zählung bestimmt und die spezifische Aktivität [(pmol übertragenes Phosphat/pmol aktive Untereinheit)/min] ermittelt. Die Auswertung der Assays für Tyrtide ergab ein übereinstimmendes Ergebnis im Vergleich zu der Substratphosphorylierung in der nativen PAGE (vgl. Abbildung 4.36 und Abbildung 4.40A). Erneut zeigt das Hybrid WT die höchste katalytische Aktivität. Im Vergleich dazu erreicht das Hybrid Y1146F nur 27% der Aktivität. Die Hybride Y1150F und Y1151F sind mit 7% bzw. 2% der Aktivität in Relation zum Hybrid WT quasi inaktiv (Tabelle 4.15).



	Spez. Aktivität für Tyrtide (%)	Spez. Aktivität für PolyGlyTyr (%)
Hybrid WT	100	100
Hybrid y1146F	27	56
Hybrid Y1150F	7	35
Hybrid Y1151F	2	10

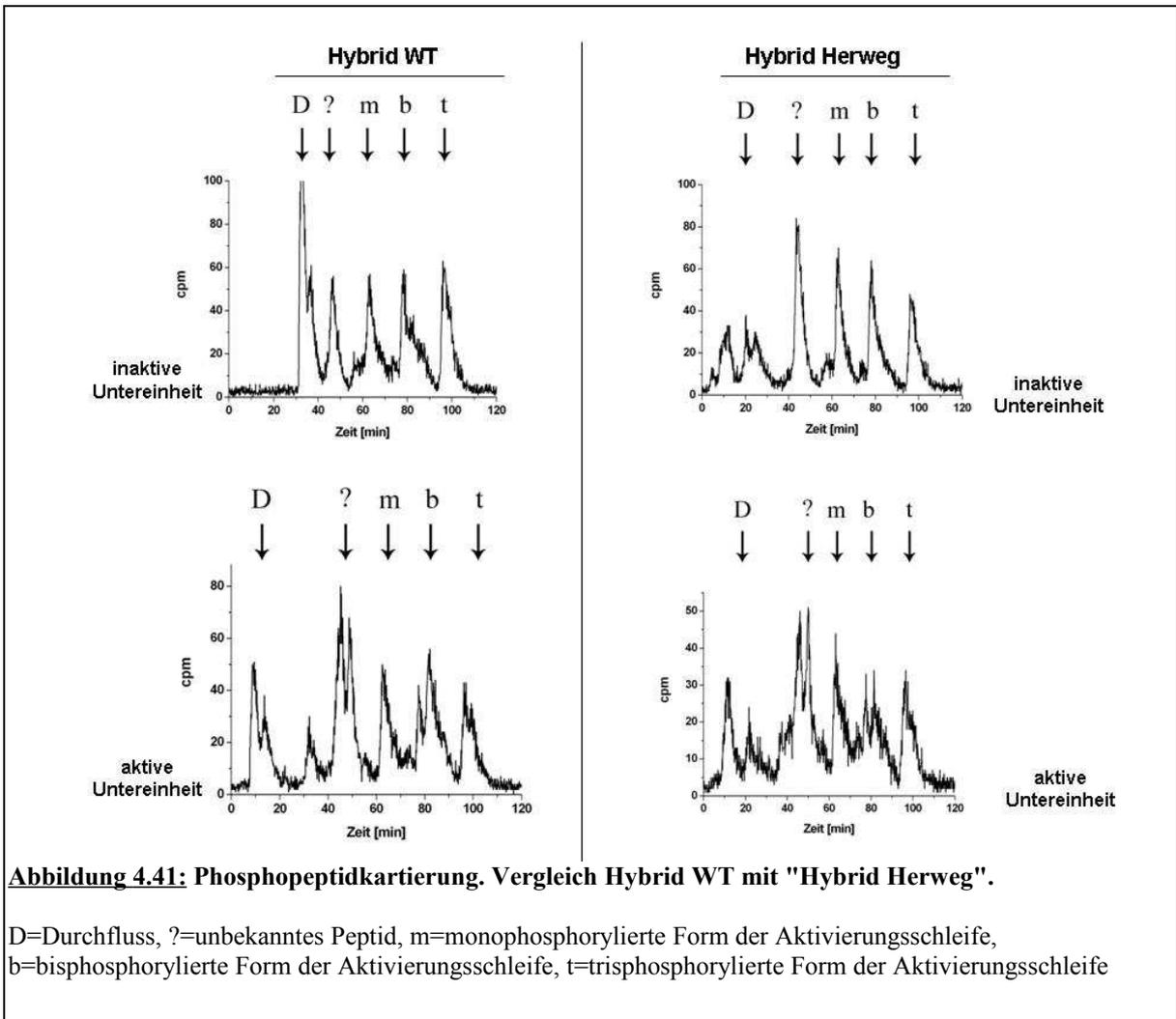
Tabelle 4.15: Spezifische Aktivitäten der Hybride in der Substratphosphorylierung von Tyrtide und PolyGlyTyr.

Beim Betrachten der Auswertung der Assays für PolyGlyTyr fällt erneut auf, dass das Hybrid WT die höchste spezifische Aktivität aufweist (Abbildung 4.40B). Das Hybrid Y1146F zeigt hingegen nur 56% Aktivität, gefolgt vom Hybrid Y1150F mit 35% und vom Hybrid Y1151F mit 10% Aktivität. Im Verhältnis zueinander decken sich die relativen spezifischen Aktivitäten der Hybride in der Substratphosphorylierung von Tyrtide und PolyGlyTyr.

4.4.4 Identifizierung der Phosphorylierungsstellen der Hybride durch Phosphopeptidkartierung (Peptide Map)

Ergänzend zu den bereits beschriebenen Phosphopeptidkartierungen der GST-TEV-IRK Δ CT-Kinasekonstrukten (4.2.8) sollte im weiteren die Phosphopeptidkartierung der Hybride durchgeführt werden. Analog zu den Kinasen wurden 1 μ M der Hybride einer Autophosphorylierungsreaktion über 5 und 15 Minuten unter Standardbedingungen (1 mM γ [P³²]-ATP, 500 cpm/pmol ATP, 30 mM MgCl₂, pH 7,5) unterzogen. Dem Ansatz wurden Proben von 20 μ l entnommen, mit je 6 μ l SDS-Probenpuffer denaturiert und über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die radioaktiven Banden mittels Autoradiographie detektiert und ausgeschnitten. Über Nacht erfolgte der tryptische Verdau der Proteinbanden und Elution der Peptide aus den SDS-Gelfragmenten. Die eluierten, radioaktiven Peptide wurden im Anschluss über HPLC-Anionenaustausch-Chromatographie aufgetrennt (6.2.10.2). Nachfolgend werden nur Chromogramme für die Zeitwerte von 15 Minuten gezeigt. Die Chromotogramme für den Zeitwert 5 Minuten sind im Anhang zu finden.

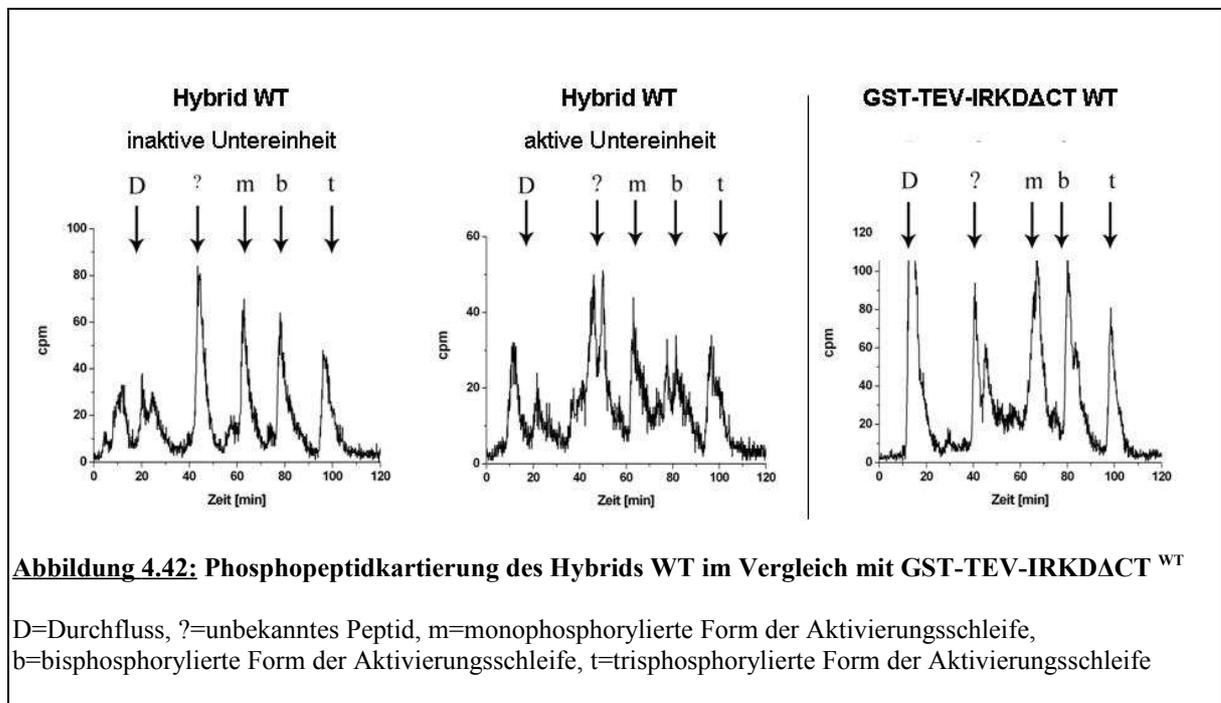
Vorab sollte das Hybrid WT mit dem „Hybrid Herweg“ verglichen werden. Bei der Autophosphorylierung beider Hybride konnte ein ähnlicher Gesamtphosphateinbau festgestellt werden, die Besetzung der Untereinheiten zeigte jedoch Unterschiede. Mittels Phosphopeptidkartierung sollen diese Unterschiede näher untersucht werden.



Bei einem direkten Vergleich der Chromatogramme der Hybriduntereinheiten (Abbildung 4.41) zeigt sich erneut der unterschiedliche Einbau in die Untereinheiten. Während bei der aktiven Untereinheit des „Hybrids Herweg“ eine annähernd gleichmäßige Verteilung aller drei Phosphorylierungsstufen erreicht wird, zeigt das Hybrid WT eine stärkere Ausprägung der mono- und bisphosphorylierten Formen der Aktivierungsschleife. Dies korrespondiert mit dem höheren Einbau des Hybrid WT in die aktive Untereinheit.

Das Chromatogramm der katalytisch defizienten Untereinheit des „Hybrids Herweg“ zeigt eine nahezu gleichmäßige Verteilung der Phosphorylierungsstufen, die inaktive Untereinheit des Hybrid WT dagegen eine stärkere Ausprägung der monophosphorylierten Form.

Des weiteren sollen hier einzelne Hybride mit den zugehörigen Referenzkinasen in einem direkten Vergleich betrachtet werden.

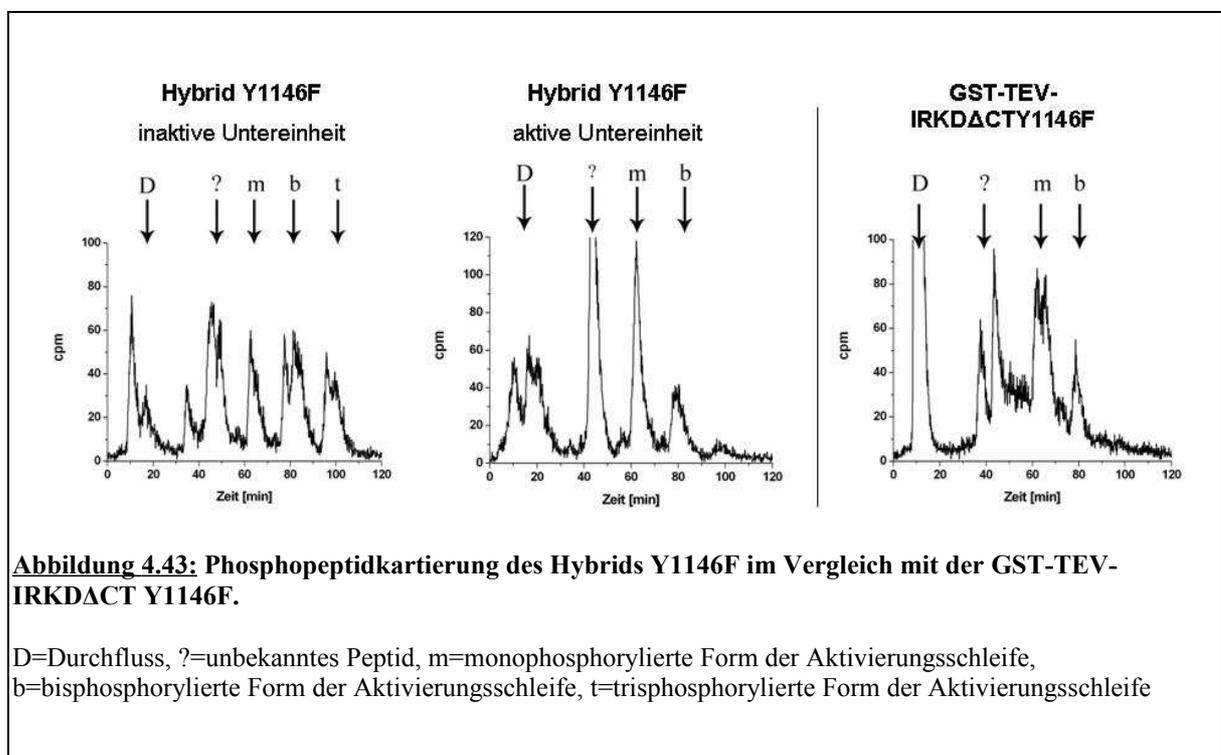


Die Phosphopeptidkartierung der GST-TEV-IRKDACT^{WT} (Abbildung 4.42) zeigt nach 15 min Autophosphorylierung alle drei Phosphorylierungsstufen, wobei die mono- und bisphosphorylierte Form der Aktivierungsschleife etwas stärker ausgeprägt sind. Der Vergleich mit der Phosphopeptidkartierung der aktiven Untereinheit des Hybrid WT zeigt die gleiche Verteilung der Phosphorylierungsstufen, bei der ebenfalls die Mono- und Bisphosphorylierungen verstärkt auftreten. Beide aktiven Untereinheiten, sowohl im Hybrid als auch in der Referenzkinase, zeigen das gleiche Besetzungsmuster.

Die Unterschiede sind erst bei näherer Betrachtung zu erkennen. Während das Chromatogramm der aktiven Untereinheit der GST-TEV-IRKDACT^{WT} beim bis-Peak eine Schulter erkennen lässt, tritt diese beim Hybrid WT nicht in Erscheinung. Das Chromatogramm der inaktiven Untereinheit des Hybrid WT zeigt diffuse Peaks, die stark zur Ausbildung von Schultern und Doublets neigen. Es bleibt jedoch zu bedenken, dass es sich bei der inaktiven Untereinheit um eine Volllängenkinase handelt, die im Unterschied zur aktiven Untereinheit einen C-Terminus besitzt. Alle drei Phosphorylierungsstellen der

Aktivierungsschleife werden besetzt, wobei die monophosphorylierte Form häufiger auftritt. Die bis- und trisphosphorylierten Formen sind im etwa gleichen Verhältnis vertreten. Auffällig ist die starke Aufspaltung des bis-Peaks zum Doublet.

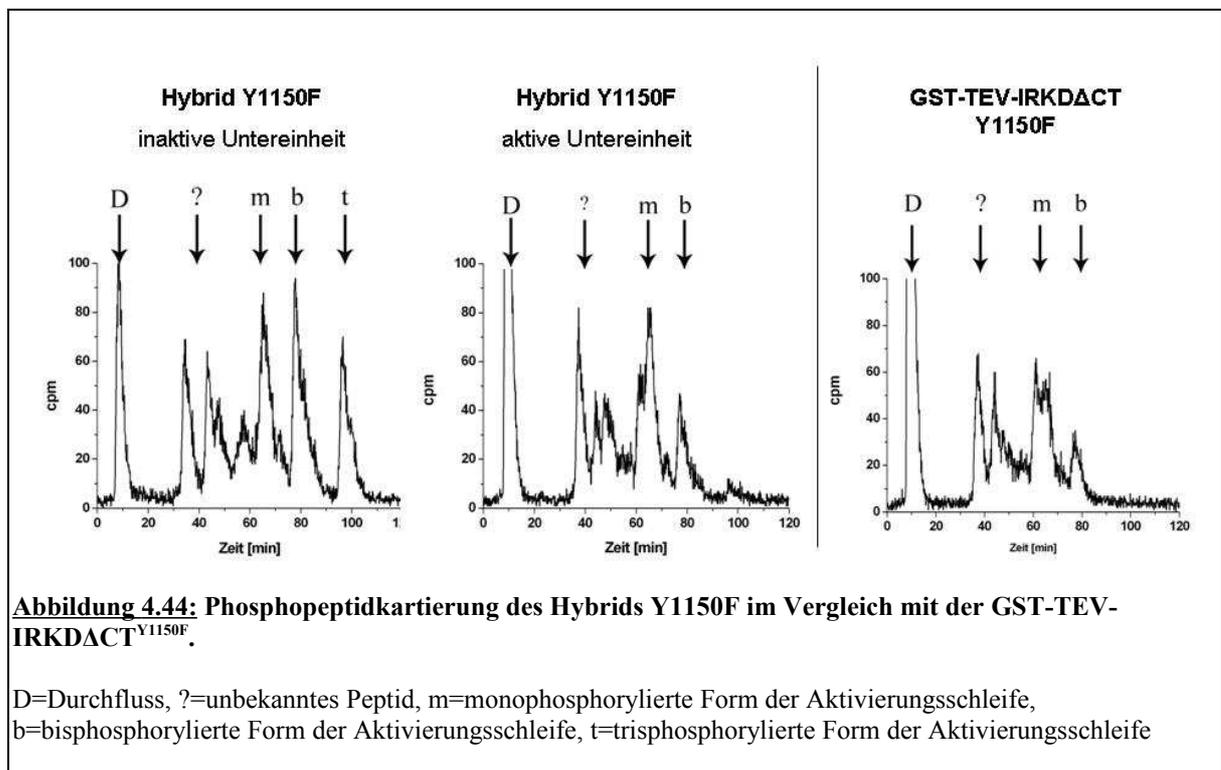
In der Autophosphorylierungsreaktion wurde nur zwischen Hybrid Y1146F und der zugehörigen Referenzkinase eine Diskrepanz werden. Dieser Unterschied konnte auch in der Phosphopeptidkartierung nachgewiesen werden (Abbildung 4.43).



Die GST-TEV-IRKΔCT^{Y1146F} weist vorwiegend monophosphorylierte Form auf, die sich in einem stark aufgespaltenem mono-Peak und einer etwa halb so starke Bisphosphorylierung zeigt. Auch bei der aktiven Untereinheit des Hybrids Y1146F ist hauptsächlich die Ausbildung der monophosphorylierten Form zu beobachten, jedoch ist die Besetzung der Aktivierungsschleife mit zwei Phosphaten nur sehr gering ausgeprägt. Zusätzlich kann bei einer Retentionszeit von 100 min ein kleiner Peak beobachtet werden, der keinem Peptid eindeutig zugeordnet werden kann, da eine Trisphosphorylierung der Aktivierungsschleife

durch die Mutation nicht mehr gegeben ist. Die inaktive Untereinheit des Hybrid Y1146F zeigt ein ähnliches Besetzungsmuster wie die inaktive Untereinheit des Hybrid WT. Auch hier liegt eine gleichmäßige Ausprägung aller Phosphorylierungsstufen und eine starke Aufspaltung der Peaks vor.

Die Phosphopeptidkartierung der GST-TEV-IRK Δ CT^{Y1150F} (Abbildung 4.44) zeigt vorwiegend die monophosphorylierte Form der Aktivierungsschleife. Dieser Peak fällt durch eine starke Aufspaltung zum Doublet auf. Die Bisphosphorylierung wird im Verhältnis zur Monophosphorylierung nur halb so oft erreicht.



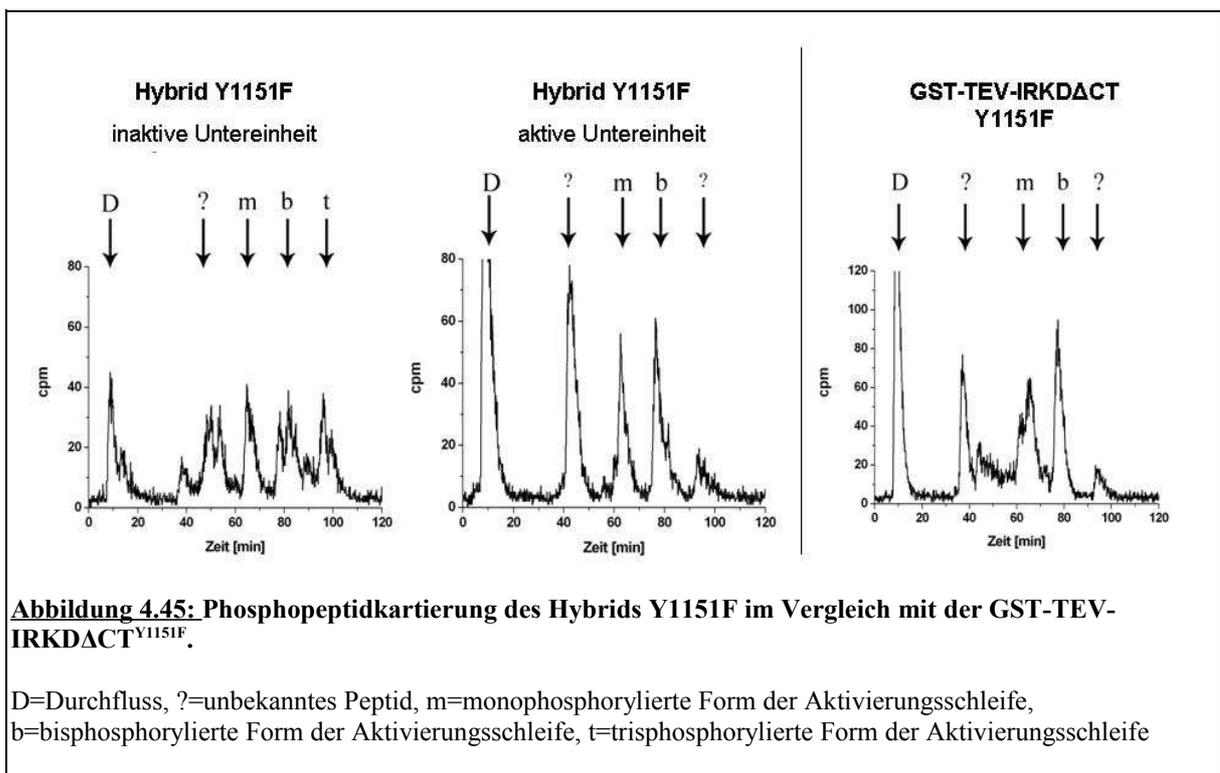
Das Hybrid Y1150F zeigt in der radioaktiven Autophosphorylierung einen vergleichbaren Phosphateinbau wie das Hybrid Y1146F. Dies kann durch die Ergebnisse der Phosphopeptidkartierung erhärtet werden. Die aktive Untereinheit des Hybrids Y1150F weist ebenfalls vorwiegend monophosphorylierte Form auf. Der zugehörige Peak zeigt eine

Schulter bei einer früheren Retentionszeit als der Hauptpeak. Die bisphosphorylierte Form ist in etwa halb so stark vertreten wie die Monophosphorylierung.

Bei der katalytisch, defizienten Untereinheit des Hybrid Y1150F kann erneut eine annähernd gleichmäßige Verteilung aller Phosphorylierungsstufen beobachtet werden.

Sowohl das Hybrid Y1151F als auch seine Referenzkinase zeigen in der radioaktiven Autophosphorylierung eine mit dem Wildtyp vergleichbare Aktivität. Dies soll in der Phosphopeptidkartierung näher untersucht werden.

Tatsächlich zeichnet sich die $\text{GST-TEV-IRKDACT}^{\text{Y1151F}}$ vorwiegend durch die höchst mögliche Besetzung der Aktivierungsschleife aus (Abbildung 4.45). Die Bisphosphorylierung tritt in etwa doppelt so stark auf wie die monophosphorylierte Form. Zudem weist der Peak der Monophosphorylierung eine starke Doublet-Aufspaltung auf. Erneut kann das Auftreten eines Peaks bei ca. 100 min verzeichnet werden.



Die aktive Untereinheit des Hybrid Y1151F lässt hingegen eine Gleichverteilung der mono- und bisphosphorylierten Formen erkennen, wobei die bisphosphorylierte Form eine Schulter

bei späterer Retentionszeit aufweist. Wieder ist der Peak bei einer Retentionszeit von ca. 100 min zu beobachten.

Die inaktive Untereinheit des Hybrids Y1151F weist ein ausgewogenes Auftreten aller drei Phosphorylierungsstufen auf, die zugehörigen Peaks zeigen zudem eine starke Aufspaltung.

Zusammenfassend bestätigen die Phosphopeptidkartierungen die Ergebnisse der radioaktiven Autophosphorylierung (4.4.2). Die aktive Untereinheit der Hybride zeigt das gleiche Besetzungsmuster wie das zugehörige Referenzkinase auf. Zudem kann der unterschiedliche Phosphateinbau sowohl der Homodimer- als auch der Hybrid-Mutanten auf eine unterschiedliche Besetzung der Aktivierungsschleife der aktiven Untereinheit zurückgeführt werden. Interessanterweise ist bei der Besetzung der Aktivierungsschleife der katalytisch defizienten Untereinheiten ein einheitliches Muster für alle Hybrid-Mutanten zu erkennen. Die Phosphorylierung der inaktiven Hybriduntereinheiten umfasst die Besetzung aller Phosphorylierungsstufen.

5 Diskussion

In dieser Arbeit sollte die Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen (RTKs), im Besonderen die Aktivierung des Insulinrezeptors (IR) untersucht werden. Neben der Untersuchung von unterschiedlichen dimeren und monomeren Kinasekonstrukten, die eine Mutation in der Aktivierungsschleife tragen, sollte die Aktivierung von Hybridkinasen, bestehend aus einer aktiven und einer katalytisch defizienten Untereinheiten, im Vordergrund dieser Arbeit stehen. Die in unserer Arbeitsgruppe etablierten GST-Kinasen stellen ein Modell für den hormonaktivierten Holorezeptor dar. Durch GST-vermittelte Dimerisierung erfolgt eine Konformationsänderung, durch die die Aktivierungsschleife der löslichen Kinasedomäne für eine Phosphorylierung zugänglich wird (offene Konformation) (Baer *et al.*, 2001). Somit imitieren GST-Kinasen aktive Rezeptoren. GST ermöglicht außerdem die Dimerisierung von unterschiedlichen Kinaseuntereinheiten. So ist auch die Dimerisierung einer katalytisch defizienten (Pseudokinase) mit einer katalytisch aktiven Untereinheit möglich. Auf diesem Weg kann der Einfluss der Dimerisierung auf die Aktivierung getrennt von der Autophosphorylierung untersucht werden. Insbesondere kann zwischen einer intra (*cis*-) und intermolekularen (*trans*-) Autophosphorylierung unterschieden werden. Da die katalytisch inaktive Untereinheit über keine Phosphoryltransferaseaktivität verfügt, kann sich die aktive Untereinheit entweder selbst phosphorylieren (in *cis*) oder von einer aktiven Untereinheit eines benachbarten Hybrids phosphoryliert (in *trans*) werden. Von besonderem Interesse ist die sowohl die Autophosphorylierung der Kinasekonstrukte als auch der Hybrid-Mutanten, da hierbei Rückschlüsse auf die Rolle und möglicherweise Reihenfolge der Besetzung der Phosphorylierungsstellen in der Aktivierungsschleife gezogen werden können. Darüber hinaus kann die Untersuchung des Einflusses der inaktiver Kinasen auf die Rezeptoraktivierung mögliche Einblicke in die Funktion von Pseudokinasen in Zellen liefern.

5.1 Generierung, Expression und Reinigung von Homo - und Heterodimeren - Kinasekonstrukte

5.1.1 Darstellung der Kinasekonstrukte

Die für die Arbeit benötigten Rezeptorkinasen und ihre Mutanten wurden nach dem, in der Arbeitsgruppe standardisiertem, Protokoll mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystems exprimiert und aufgereinigt (Al Hasani *et al.*, 1997, Nölle *et al.*, 2001) (Abbildung 4.1., Abbildung 4.2) In die GST-TEV-IRKD-Konstrukte wurde als eine Besonderheit eine Schnittstelle für die TEV-Protease eingefügt, um nach erfolgreichen Expression, Aufreinigung und nach proteolytischer Spaltung leichter monomere Kinasen zu erhalten (Abbildung 4.3, Abbildung 4.4). Dieses Verfahren stellt sich als wesentlich einfacher und reproduzierbarer dar, sowohl die Ausbeute als auch was die Reinheit des Proteins betreffend, als das von Nolle *et al.* (2001), dessen Protokoll der Aufreinigung auf hydrophoben und ionischen Interaktionen beruhte.

Ein weiterer neuer Gesichtspunkt in der Generierung und Reinigung von Heterodimeren Kinasehybriden war, dass die „Doppel-Tag-Strategie“ angewandt wurde. Denn diese ermöglicht es gezielt Hybride aus einer aktiven und einer inaktiven Kinaseuntereinheit zu selektionieren (Abbildung 4.23). Die GST-verbrückten Hybride sind unter nicht denaturierenden Bedingungen stabil und neigen nicht zur Monomerisierung oder zum Kinaseaustausch, da ein GST-Dimer erst bei Behandlung mit 6M Harnstoff in seine Untereinheiten zerfällt (Lim *et al.*, 1994)). Andere Verfahren in unserem Labor, die nicht die „Strategie des Doppeltag“ zur Hybridseparation nutzten, führten zu weit geringeren Ausbeuten und einer in Frage zustellender Homogenität (Launinger, 2006, Fische 2005).

5.1.2 Untersuchungen zur Vorphosphorylierung der Kinasekonstrukte

Die GST-Kinasen gelten als Vertreter der aktiven Kinasen (Baer *et al.*, 2001), wenn Dimerisierung zur Aktivierung benötigt wird (Baer *et al.*, 2005). Deshalb ist zu erwarten, dass in *Sf9*-Insektenzellen überexprimierte GST-Kinasen teilweise vorphosphoryliert sind. Dies gilt für alle hier beschriebenen Kinasekonstrukte. Bei allen dimeren monosubstituierten Kinasekonstrukten, bei den C-terminal trunkierten Varianten der Kinasen, und, bis auf eine Ausnahme, auch bei den heterodimeren Hybriden, die aus zwei Untereinheiten bestehen, wurde eine Vorphosphorylierung nachgewiesen (vgl. Abbildung 4.18 und Abbildung 4.26). Der Nachweis der Vorphosphorylierung erfolgte ausschließlich mit α -Phosphotyrosinantikörpern.

Als Grund hierfür könnten bei den Hybriden zwei Möglichkeiten in Betracht kommen: zum einen könnte das gleichzeitig exprimierte aktive Homodimer die Hybride als Substrat phosphorylieren, zum anderen könnte der aktive Teil der Hybridkinase sich selber phosphorylieren und anschließend Phosphate auf die inaktive Komponente transferieren.

Bei den monomeren Kinasen kann die bestehende Vorphosphorylierung nicht nur mittels Antikörper nachgewiesen werden, sondern ist auch im nativen Gel an der zusätzlich auftretenden Bande deutlich zu erkennen (Abbildung 4.12).

Weder die Dephosphorylierung mittels ADP-Zugaben, als auch die enzymatische Dephosphorylierung durch die alkalischen Phosphatase (Argetsinger und Shafer 1992), führten zum gewünschten Ergebnis. Die Hybride und die GST-Kinasen lagen weiterhin phosphoryliert vor.

Dieses Ergebnis führen zu der Vermutung, dass sich der vorphosphorylierte Rest in einem Bereich der Kinase befindet, der einer starken Abschirmung unterliegt und nicht von der Phosphatase erreicht werden kann. Es ist aber auch nicht nachgewiesen, dass sich die Vorphosphorylierung in der Aktivierungsschleife befindet, wo sie zu einer Voraktivierung führen würde. Jedoch lässt der Vergleich des nicht vorphosphorylierten Hybrids Y1146F mit seiner phosphorylierten Referenzkinase den Schluss zu, dass der Vorphosphorylierung eine aktivierende Rolle zugeschrieben werden kann. Das nicht vorphosphorylierte Hybrid Y1146F zeigt einen deutlich langsameren und auch geringeren Phosphateinbau als das zugehörige

Homodimer Y1146F. Dieses Ergebnis konnte in mehreren unabhängigen Versuchen für die unterschiedliche Enzymchargen reproduziert werden.

Für die Bestimmung der Initialgeschwindigkeit der Autophosphorylierung ergibt sich daraus jedoch folgendes Problem: Aufgrund der Vorphosphorylierung entspricht die ermittelte Initialgeschwindigkeit nicht genau der Geschwindigkeit für den Einbau des ersten Phosphates. Wahrscheinlich handelt es sich bei der hier ermittelten Geschwindigkeit um eine Mischung aus der Initialgeschwindigkeit für die Besetzung des ersten und des zweiten Phosphatakzeptors. Es handelt sich also nicht mehr um den ersten Schritt, der für die Aktivierung der Kinase notwendig ist.

5.2 Auswirkungen der Substitutionen

Nach Schlessinger (1988) ist die Dimerisierung für die Aktivierung von Rezeptorkinasen notwendig, wie er am Beispiel des EGFR zeigen konnte. Im bisher vorherrschenden Modell der Aktivierung von Rezeptoren ist neben der Dimerisierung die *trans*-Phosphorylierung unabdingbar mit der katalytischen Aktivität gekoppelt. Einen Sonderfall stellen die Rezeptoren der IR-Familie dar, da sie als konstitutive Dimere vorliegen. Wie bereits an der extrazellulären Domäne des Epo- und des ErbB2/ Neu-Rezeptor gezeigt wurde, liegen auch diese monomeren Rezeptoren ohne gebundenen Liganden bereits als Dimere vor. Jedoch bedarf es zur Aktivierung von RTK's erst der Bildung eines produktiven Dimers durch Liganden induzierte Konformationsänderungen (Hunter, 1999).

Das in unserer Arbeitsgruppe etablierte GST-Modell der löslichen IRKD stellt ein Modell für den aktivierten Holorezeptor dar. Als Grund wird angenommen, dass die über GST-vermittelte Dimersierung die Aktivierungsschleife der löslichen Kinasedomäne in eine offene Konformation bringt (Baer *et al.*, 2001). Mit Hilfe dieses Modells sollen Proteinwechselwirkungen untersucht werden, die notwendig sind für die Aktivierung von RTK's. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit GST-Dimere generiert, bei denen in der Kinasedomäne drei Tyrosine jeweils gegen Phenylalanin substituiert wurden, und die

rekombinanten monosubstituierten Proteine anschließend charakterisiert. Durch Verwendung unterschiedlicher Kinasekonstrukte wurde deren Beitrag zum Aktivierungsprozess analysiert.

Die Bedeutung des C-Terminus der Insulinrezeptorkinase wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Ungeklärt ist, zu welchem Zeitpunkt der C-Terminus Zugang zur Aktivierungsschleife hat. Dies ist um so bedeutender, da diese Domäne, ebenso wie ATP, die Konformation des katalytischen Zentrums ändern kann (Tylor *et al.*, 1995). Möglicherweise bindet der C-Terminus an das aktive Zentrum und dient als Autoinhibitor, vergleichbar mit der Serin/Threoninkinase Twitchin (Hu *et al.*, 1994). Allerdings führt die Abtrennung des C-Terminus der löslichen Insulinrezeptorkinase nicht zwingend zur Aktivierung (Hsuan *et al.*, 1989).

Mit Hilfe von hergestellten C-terminal trunkierten Insulinrezeptorkinasen konnte die Frage der Aktivierung und der Bedeutung der einzelnen Tyrosinpositionen der Aktivierungsschleife näher untersucht werden.

Es ist nicht geklärt, ob im GST-Dimer beide Kinaseuntereinheiten als aktive Enzyme vorliegen müssen, oder ob die beobachtete Konformationsänderung in der Aktivierungsschleife auch durch eine inaktive Komponente hervorgerufen werden kann (Baer *et al.*, 2001). Mit Hilfe der generierten Hybrid-Konstrukte ist es möglich, eine Aktivierung mittels Dimerisierung von einer, die durch Phosphorylierung induziert wird, zu unterscheiden, da eine *trans*-Phosphorylierung im Hybrid ausgeschlossen werden kann. Insbesondere steht der in der Literatur vorherrschende *trans*-Phosphorylierungsmechanismus zur Diskussion. Diese Untersuchungen sollten helfen, die Rolle natürlich vorkommender Pseudokinasen zu verstehen.

In Autophosphorylierungsreaktionen wiesen alle monomeren, homo- und heterodimeren Konstrukte katalytische Aktivität auf. Keine der Mutationen in den potentiellen Phosphorylierungsstellen führte demnach zu einer Knockout-Mutante. Somit kann keinem der drei Tyrosine alleine die regulierende Rolle in der Autophosphorylierung zugewiesen werden und offensichtlich ist, dass keiner der drei Tyrosine für die Phosphorylierung der anderen notwendig ist. (Zhang *et al.*, 1991; Tavaré und Dickens, 1991; Dickens und Tavaré, 1992a; Wilden *et al.*, 1992.) .

Bei der Untersuchung der Phosphoaminosäurezusammensetzung der Kinasekonstrukte konnte eine verminderte Serinphosphorylierung bei allen Konstrukten mit den Mutationen Y1150F und Y1151F detektiert werden.

Es zeigte sich eine deutliche Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Auto- und Substratphosphorylierung. Die Aktivität bei der Substratphosphorylierung nahm in der Reihenfolge WT \geq Y1146F>Y1150F>Y1151F ab. Vergleichbare Ergebnisse wurden bereits von Zhang für die Substratphosphorylierung von PolyGluTyr vorgestellt (Zhang *et al.*, 1991). Für die Autophosphorylierung hingegen wurde folgende Reihenfolge vorgefunden: WT=Y1151F=Y1146F>Y1150F. Ähnliche Ergebnisse wurden *in vivo* bereits beobachtet (Wilden *et al.*, 1992). Jedoch wurden die unterschiedlichen Aktivitäten in der Substrat- und Autophosphorylierung bisher nicht berichtet.

5.2.1 Charakterisierung der Kinasekonstrukte in der Autophosphorylierung

Ein Vergleich der generierten Konstrukte untereinander zeigt, dass alle untersuchten Kinasekonstrukte, sowohl die dimeren Vollängenkinasen, als auch die dimeren und monomeren C-terminal trunkierten Formen der IRKD sowie die heterodimeren Hybride, mit den identischen Mutation in der Aktivierungsschleife sich auch analog zueinander verhalten.

Bei der Analyse der verschiedenen Vollängenkinasekonstrukte zeigen sich deutliche Unterschiede sowohl im Phosphateinbau als auch in den Initialgeschwindigkeiten. So konnte für die GST-TEV-IRKD^{Y1146F} die höchste Initialgeschwindigkeit und Phosphatinkorporation festgestellt werden (Tabelle 4.4). Auch die WT-Kinase zeigte zwar den selben Phosphateinbau wie die GST-TEV-IRKD^{Y1146F}, die Initialgeschwindigkeit war aber um ca. 35% verringert. Vergleichbare Initialgeschwindigkeit konnte auch bei der GST-TEV-IRKD^{Y1150F} festgestellt werden, bei einer halb so hohen Phosphatinkorporation. Die GST-TEV-IRKD^{Y1151F} zeigt in der Autophosphorylierung eine hohe Initialgeschwindigkeit und Phosphateinbau.

Analog zu den Vollängenkinasekonstrukten konnte für alle GST-TEV-IRK Δ CT-Kinasekonstrukte eine katalytische Aktivität nachgewiesen werden. Beim Vergleich der Kinase-Mutanten untereinander heben sich die GST-TEV-IRK Δ CT^{WT}, Δ CT^{Y1146F} und die Δ CT^{Y1151F} deutlich von der Δ CT^{Y1150F}-Mutanten ab (Abbildung 4.9 und Tabelle 4.6). Bei der Betrachtung des maximalen Phosphateinbaus fällt auf, dass sich die Δ CT^{WT}, die Δ CT^{Y1146F} und die Δ CT^{Y1151F} sehr ähnlich verhalten. Die Δ CT^{Y1150F}-Kinase zeigt eine um ca. 45% verringerte Phosphatinkorporation verglichen mit den anderen Konstrukten.

Ergänzend zu den GST-dimeren Kinasekonstrukten wurden die hergestellten Monomere charakterisiert. Um einen messbaren Phosphateinbau zu erreichen wurden die monomeren Kinasen für die Autophosphorylierung mit 2 μ M eingesetzt, da diese, im Gegensatz zu GST-Dimeren, sich deutlich langsamer aktivieren, wenn sie in geringeren Konzentrationen vorliegen. Die Kinasen zeigten im Mittelwert einen ähnlichen maximalen Phosphateinbau, der zwischen 1,8 und 2,1 Phosphaten/Kinaseuntereinheit liegt (Abbildung 4.14 und Tabelle 4.8.) Die IRK Δ CT^{Y1150F} weist wiederholt einen geringeren Phosphateinbau, als die drei anderen Kinasen, auf. Eine weitere Methode zur Quantifizierung der Phosphatinkorporation stellte die native PAGE dar. Diese Methode ermöglichte eine optische Untersuchung der einzelnen Phosphorylierungsstufen der untersuchten Kinasen (Abbildung 4.12). Auffällig war dabei, dass bei allen Konstrukten zwei unterschiedlich stark ausgeprägte Banden für den 0' min Zeitwert detektiert wurden, ohne dass ATP zugegeben wurde. Die zweite Bande deutet die erste Phosphorylierungsstufe an, die bereits nach der Reinigung vorhanden ist. Dies steht in Übereinstimmung mit den durchgeführten Untersuchungen der Vorphosphorylierung der Dimere.

Durch densitometrische Auswertung der nativen PAGE konnten die Hauptphosphorylierungsstufen der Kinasen ermittelt werden. Die monomere WT-Kinase ist demnach am stärksten, mit durchschnittlich 5 Phosphaten pro Kinaseuntereinheit, phosphoryliert. Bei der IRK Δ CT^{Y1151F} lag die Hauptphosphorylierung durchschnittlich bei 4 Phosphaten, gefolgt von der IRK Δ CT^{Y1150F} mit 3,7 und IRK Δ CT^{Y1146F} mit 3,4 Phosphaten (Abbildung 4.13).

Des Weiteren wurden die generierten und erfolgreich aufgereinigten Hybrid-Mutanten hinsichtlich ihrer katalytischen Aktivität untersucht. Es wurde bereits von Herweg (2007) gezeigt, dass die Dimerisierung einer katalytisch aktiven Untereinheit mit einer inaktiven

Untereinheit zur Aktivierung führt, während die monomeren Untereinheiten in der gleichen Konzentration keine Aktivität zeigen. Zunächst wurden die Hybrid-Mutanten in der Autophosphorylierung untersucht und mit den zugehörigen Referenzkinasen verglichen. Auf Grund des Größenunterschiedes konnten die Untereinheiten der Hybride getrennt voneinander untersucht werden. In der Autophosphorylierung zeigen alle Hybride katalytische Aktivität. Die Mutation in der Aktivierungsschleife führt demnach zu keiner Knockout-Mutante. Keiner der potentiellen Phosphorylierungsstellen der Aktivierungsschleife kann also eine alleinige regulierende Funktion zugewiesen werden, sowie es bereits für die GST-Kinasen gezeigt wurde. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass bei den meisten Hybriden eine Vorphosphorylierung detektiert wurde und somit nicht ausgeschlossen werden kann, dass die entscheidende Aktivierung schon vorher erfolgte. Dies könnte schon bei der Coexpression in *Sf9*-Zellen durch das gleichzeitig exprimierte aktive GST-Homodimer erfolgt sein.

Alle Hybrid-Mutanten, außer dem Hybrid Y1146F, welches keine Vorphosphorylierung aufweist (Abbildung 4.26), sowie die zugehörigen Δ CT-Kinasekonstrukte zeigen eine vergleichbare Gesamtphosphatinkorporation. Das bedeutet, eine katalytisch aktive Untereinheit im Hybrid leistet den gleichen Phosphattransfer wie eine katalytisch aktive Untereinheit im Homodimer. Die aktive Untereinheit im Hybrid leistet einen Einbau in die katalytisch defiziente Untereinheit (*trans*-Phosphorylierung) und in sich selbst (*cis*-Phosphorylierung). Wohingegen beim GST-Homodimer nicht zwischen *cis*- und *trans*-Phosphorylierung unterschieden werden kann. Aufgrund dieser Daten ist nicht klar, ob vielleicht nur eine der beiden Untereinheiten des Dimers aktiv sein muss und die andere lediglich als Dimerisierungspartner dient (vgl. Donor-Akzeptor-Modell Zhang *et al.*, 2006). Die Ergebnisse lassen auf *cis*-Phosphorylierung als Mechanismus für den Phosphateinbau schließen. Diese These wird im Verlauf der Arbeit weiter untermauert.

Bei einer genaueren Betrachtung der Untereinheiten der Hybride konnte ein deutlicher Unterschied in der Kinetik der Besetzung beider Untereinheiten festgestellt werden. Der Einbau in die aktive Komponente erfolgte schneller und auch stärker als in die katalytisch defiziente Untereinheit.

Der Phosphateinbau in die aktive Untereinheit beträgt 60% des Gesamteinbaus an Phosphat in das Hybrid. Die relative Phosphatinkorporation in die inaktive Untereinheit beträgt folglich 40% des Gesamteinbaus. Auch die Verteilung der Initialgeschwindigkeiten folgt diesem

Muster. So trägt die Initialgeschwindigkeit für den Einbau in die aktive Untereinheit zu 60% zur Gesamtgeschwindigkeit bei. Die Initialgeschwindigkeit der inaktiven Untereinheit fließt zu ca. 40% in die Gesamtgeschwindigkeit ein (vgl. Tabelle 4.12).

Diese Ergebnisse korrelieren mit Experimenten, in denen gezeigt werden konnte, dass die inaktive Untereinheit des Hybrids über einen intramolekularen *trans*-Mechanismus phosphoryliert wird. In diesen Mischungsexperimenten mit aktiven und inaktiven GST-Kinasen (im Verhältnis 1:1) wurde das Hybrid imitiert, wobei die Phosphorylierung der inaktiven GST-IRKD^{D→A} über einen intermolekularen *trans*-Mechanismus erfolgen muss. Die Experimente zeigen, dass die intermolekulare *trans*-Phosphorylierung der inaktiven GST-Kinase als Substrat deutlich verlangsamt gegenüber der intermolekularen Autophosphorylierung im Hybrid auftritt (Abbildung 8.20). Des Weiteren konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Phosphorylierung der aktiven Untereinheit des Hybrids auf einem *cis*-Mechanismus beruht. Dazu wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Autophosphorylierung untersucht. Da die Autophosphorylierung unabhängig von der eingesetzten Hybridkonzentration ist, konnte auf eine Phosphorylierung in *cis* geschlossen werden. Bei einer intermolekularen *trans*-Phosphorylierung würde der gemessene Phosphateinbau mit steigender Hybridkonzentration zunehmen.

Somit wird für die Phosphorylierung der aktiven Untereinheit ein *cis*-Mechanismus und für die katalytisch defiziente Untereinheit des Hybrids ein intramolekularer *trans*-Mechanismus angenommen.

Bei dem Vergleich der Hybride untereinander können diese in zwei Gruppen eingeteilt werden. Das Hybrid Y1151F verhält sich bei einer Betrachtung des maximalen Phosphateinbaus dem Hybrid WT sehr ähnlich. Die Hybride Y1146F und Y1150F erreichen jedoch nur einen Phosphateinbau, der in etwa dem halben Einbau des Hybrid WT entspricht (vgl. Tabelle 4.12).

Für alle untersuchten Kinasetypen können aus den dargelegten Daten folgende Schlussfolgerungen über die Bedeutung der einzelnen Tyrosine der Aktivierungsschleife gezogen werden. Es ist wahrscheinlich, dass die Besetzung des Tyrosins 1151 und 1146 nicht zwingend erforderlich für eine volle Kinaseaktivierung erforderlich ist, da das Fehlen dieser Positionen bei keinem untersuchten Konstrukt eine Abschwächung der Autophosphorylierungsfähigkeit zur Folge hatte. Dies steht in Übereinstimmung mit der

Vermutung, dass das Tyrosin Y1151 im Regelfall nicht phosphoryliert wird. Die Besetzung des Tyrosins 1150 scheint hingegen eine bedeutende Rolle in der Kinaseaktivierung zu spielen, da das Fehlen dieser Position den maximalen Phosphateinbau im Vergleich zum Wildtyp halbiert. Das Fehlen dieser Phosphorylierungsposition und die Tatsache, dass das Tyrosin 1151 für die Aktivierung nicht notwendig zu sein scheint, spricht für die vorwiegende Besetzung von Y1146. Bei der Mutante Y1146F kann analog die vorwiegende Besetzung der Position Y1150F vermutet werden. Nach Kohanski (1993) wird bei der löslichen Insulinrezeptorkinase Tyrosin1146 als letzter Rest phosphoryliert. Demnach wird bei einer Substitution von Y1146 gegen Phenylalanin keine Abschwächung der Aktivierung zu erwarten sein. Keiner der Tyrosine ist demnach für die Phosphorylierung der anderen notwendig (Zhang *et al.*, 1991; Tavaré und Dickens, 1991; Dickens und Tavaré, 1992a; Wilden *et al.*, 1992.).

Diese Vermutungen wird durch die Methode der Phosphopeptidkartierung bestätigt.

5.2.2 Charakterisierung der Kinasekonstrukte in der Substratphosphorylierung

Im Gegensatz zur Autophosphorylierung werden bei der Transferaseaktivität der Kinasekonstrukte auf Substrate unterschiedliche Auswirkungen der Mutationen festgestellt.

Wie bereits in der Autophosphorylierung für alle in der Arbeit beschriebenen Kinasen beobachtet, haben die Kinasekonstrukte mit identischen Mutationen ein ähnliches Verhalten in der Substratphosphorylierung gezeigt.

Bei der Phosphorylierung von Tyrtide, eines 9,2 kDa großen Peptids aus dem Insulinrezeptorsubstrat (hIRS1), zeigen alle Mutanten der Vollängenkinase eine verringerte katalytische Aktivität (Abbildung 4.8). Wobei die GST-TEV-IRKD^{Y1146F} die höchste katalytische Aktivität, vergleichbar mit der GST-TEV-IRKD^{WT}, aufwies. Für die GST-TEV-IRKD^{Y1150F} und GST-TEV-IRKD^{Y1151F} konnte, unter Berücksichtigung der Färbemethode, keine nennenswerte katalytische Aktivität nachgewiesen werden. Bereits nach 15 Minuten konnte die WT-Kinase etwa die Hälfte des Substrates umsetzen. Die Y1146F- Mutante zeigt

eine etwas geringere Aktivität bei der Substratphosphorylierung. Für die GST-TEV-IRKD^{Y1150F} und Y1151F konnte dies nicht detektiert werden.

Ein ähnliches Verhalten zeigen auch die C-terminal verkürzten Kinasekonstrukte sowie die Hybride. Besonders fällt dabei auf, dass sowohl bei den Hybriden Y1150F und Y1151F, als auch bei den Δ C-Kinasevarianten mit den Deletionen Y1150F und Y1151F kaum noch umgesetztes Substrat beobachtet wird (Abbildung 4.36, Abbildung 4.16).

Die Auswertung des radioaktiven Paper Assays ergab ein ähnliches Bild für alle untersuchten Konstrukte (vgl. Abbildung 4.17 und Tabelle 4.9, vgl. Abbildung 4.40 und Tabelle 4.15).

Durch Erhöhung der Kinasekonzentration und der Reaktionszeit konnte auch für die Konstrukte mit den Mutationen Y1150F und Y1151F eine katalytische Aktivität in der Substratphosphorylierung von Tyrtide nachgewiesen werden (Abbildung 4.37). Prinzipiell ist die Umsetzung von Substraten für die Kinasen und Hybride mit der Deletion Y1150F und Y1151F also möglich, wenn auch stark verlangsamt. Scheinbar liegt die verringerte Aktivität dieser Mutanten in der Umsetzung des Substrates an der mangelnden Voraktivierung. Um dies auszuschließen, wurde exemplarisch das Hybrid Y1151F und Mutante Δ CT^{Y1151F} vorphosphoryliert. Dadurch wurde sichergestellt, dass sich sowohl das Hybrid wie auch die Kinase vollständig aktiviert haben, bevor die Substratphosphorylierung folgte. Als Referenz dienten das ebenfalls vorphosphorylierte Hybrid WT und die Wildtypekinase. Aber auch eine Voraktivierung der Konstrukte Y1151F führte nicht zur gesteigerten Substratphosphorylierung (Abbildung 8.12, Abbildung 4.38).

Die bisher dargelegten Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass bei einer Mutation der Aktivierungsschleife im Hybrid und auch in den Referenzkinasen die Substratspezifität verringert wird. Um dies zu untersuchen, wurde bei konstanter Hybrid- bzw. Kinasekonzentration eine zunehmende Substratmenge phosphoryliert (Abbildung 4.39). Der Versuch zeigte mit steigender Substratkonzentration eine zunehmende Substratphosphorylierung bei fast allen Hybriden und Kinasen. Dies Ergebnis deutet darauf hin, dass die Substratsättigung für die Mutanten in diesem Versuch nicht erreicht wurde. Die einzelnen Mutanten unterscheiden sich abermals in der katalytischen Aktivität (WT > Y1146 > Y1150F > Y1151F). Hieraus kann gefolgert werden, dass sich der K_M -Wert, der ein Merkmal für die Spezifität des Substrates ist, scheinbar durch die Mutationen der Aktivierungsschleife erhöht hat.

Die scheinbare Erhöhung des K_m -Wertes für die Konstrukte mit der Mutation Y1150F könnte auch auf den schlechteren Phosphateinbau bei der Autophosphorylierung zurückgeführt werden. Sowohl die radioaktive Autophosphorylierung, als auch die Phosphopeptidkartierung zeigten für die beiden Mutationen überwiegend eine Monophosphorylierung. Sowohl für die monophosphorylierte IGF (Insulin-like-Growth-Factor-Receptor) als auch für die monophosphorylierte IRKD konnte in der Literatur gezeigt werden, dass der Substrat- K_m von der Phosphorylierungsstufe abhängt (Ablooglu und Kohanski 2001; Favellyukis *et al.*, 2001). Dagegen zeigte sich zwischen den K_m -Werten der bis- und trisphosphorylierten Kinasen kein Unterschied mehr. Die geringere katalytische Aktivität der Mutanten Y1150F bei der Substratphosphorylierung könnte demnach auf die Monophosphorylierung zurückzuführen sein. Für die GST-TEV-IRK Δ CT^{Y1151F} kann die abgeschwächte Substratphosphorylierung nicht mit dem Einfluss des K_m -Wertes in Verbindung gebracht werden, da diese Kinase überwiegend bisphosphoryliert vorliegt.

Tyrtide wird von der Insulinrezeptorkinase aufgrund eines optimalen Sequenzmotivs phosphoryliert. Um auszuschließen, dass diese Enzym-Substrat-Wechselwirkung die Unterschiede in der katalytischen Aktivität hervorruft, wurde auf ein artifizielles Substrat PolyGluTyr zurückgegriffen. Sollten die Unterschiede innerhalb der katalytischen Aktivität der Mutanten auf schlecht ausgebildete Enzym-Substrat-Wechselwirkungen zurückzuführen sein, sollte dieser Effekt durch Verwendung von PolyGluTyr nivelliert werden. Jedoch stellte sich heraus, dass die katalytische Aktivität der Mutanten im Vergleich zur Phosphorylierung von Tyrtide unverändert blieb. Wiederum zeigten nur die Kinasen und Hybride WT und Y1146F im radioaktiven Paper Assay (Abbildung 4.17 und Tabelle 4.9, Abbildung 4.40 und Tabelle 4.15) katalytische Aktivität.

Dennoch sind alle Hybride prinzipiell zur Transphosphorylierung auf ein Substrat fähig, dies wurde bereits durch die Phosphorylierung der katalytisch defizienten Untereinheit der Hybride deutlich. Alle Hybride zeigten den gleichen relativen Phosphateinbau in ihre inaktive Untereinheit.

In der Literatur wird für die Phosphorylierung der Aktivierungsschleife der Kinasen CHK2, DAPK, SLK und LOK ein Mechanismus diskutiert, der sich von der Phosphorylierung des Substrates unterscheidet (Oliver *et al.*, 2007; Pike *et al.*, 2008). Bei dem so genannten *activation segment exchange* erfolgt intramolekulare Transphosphorylierung der

Aktivierungsschleife innerhalb eines Dimers durch Dimerisierung der katalytischen Zentren. Dem scheint ein anderer Mechanismus als bei der Substratphosphorylierung zugrunde zu liegen, da die aktive, dimerisierte Kinase die Aktivierungsschleife eines Monomers als Substrat nicht phosphoryliert. Bei den untersuchten Hybriden könnte ein ähnlicher Mechanismus vorliegen.

Der Unterschied zwischen den Substraten Tyrtide und PolyGluTyr auf der einen und der inaktiven Hybriduntereinheit der Kinase auf der anderen Seite, deuten auf unterschiedliche Wechselwirkungen mit dem aktiven Zentrum hin. Während Tyrtide und PolyGluTyr nur für den Zeitpunkt der Umsetzung assoziiert mit der Kinase verbunden werden, ist die inaktive Untereinheit kovalent mit dieser verbunden. Durch die Bindung erhöht im Falle der inaktiven Untereinheit des Hybrids die apparente Konzentration wodurch eine niedrigere Substrataffinität, entsprechend einem hohen K_m -Wert, kompensiert wird.

Es könnte jedoch sein, dass durch die Mutation der Aktivierungsschleife eine Deformation der aktiven Spalte vorliegt. Diese ist somit entweder schwerer zugänglich geworden oder so aufgeweitet, dass nur noch große Peptide, wie die inaktive Untereinheit des Hybrids, umgesetzt werden können.

Diese Annahme wird durch Untersuchungen der dualen Aktivität der GST-Kinasekonstrukte gestützt. Die Insulinrezeptorkinase ist nicht nur in der Lage ihre Substrate und sich selbst an Tyrosinen zu phosphorylieren, vielmehr konnte auch Serinphosphorylierung nachgewiesen werden (Al Hasani *et al.*, 1997; Parvaresh *et al.*, 2002; Tennagels *et al.*, 2001).

Die Untersuchungen der dualen Aktivität haben gezeigt, dass diese im gleichen Maße wie die Fähigkeit zur Substratphosphorylierung abnimmt.

Die IRKD autophosphoryliert sich an den Serinresten 1275 und 1309 (Al Hasani *et al.*, 1997). Darüber hinaus kann ein weitere Serin im N-Terminus, bei den es sich um ein Klonierungsartefakt handelt, phosphoryliert werden. Für die GST-TEV-IRKD^{Y1150F} und die GST-TEV-IRKD^{Y1151F} konnte eine starke Verringerung dieser Fähigkeit verzeichnet werden (Tabelle 4.5). Während die WT und Y1146F-Kinasen 30% Serinphosphorylierung nach 30 Minuten Autophosphorylierung aufweisen, konnte bei den Mutanten Y1150F und Y1151F nur marginale Serinphosphorylierung von 3 bzw. 8% detektiert werden. In der Literatur

wurde bereits gezeigt, dass die Mutation von Y1150 *in vivo* und *in vitro* eine reduzierte Serinphosphorylierung und eine vollständige Inhibition der Threoninphosphorylierung des Insulinrezeptors zur Folge hat (Tavarê und Dickens, 1991). Feener *et al.* (1993) und Teenagels (1998) beobachteten eine verlangsamte Serinphosphorylierung des C-Terminus bei einer Y1151F-Mutante.

Verwunderlich erscheint die Tatsache, dass bei der GST-TEV-IRKD Δ CT^{WT} auch 20% Autoserinphosphorylierung detektiert wurden, da bei dieser Kinase die Serinphosphorylierungsstellen 1275 und 1309 fehlen. Bei der Serinposition, die hierbei phosphoryliert werden könnte, handelt es sich um ein N-terminales Serin, das als ein Klonierungsartefakt entstanden ist. Von Pautsch *et al.* (2001) wurde bereits die Phosphorylierung eines solchen Serins in einem Linker des IGF-1-Rezeptor beobachtet. Jedoch reduzierten die Mutationen der Aktivierungsschleife die Fähigkeit zur Autoserinphosphorylierung. Die Homodimere Y1146F und Y1150F zeigen eine auf 15% bzw. 11% verringerte duale Aktivität, die bei dem Homodimer Y1151F noch stärker minimiert war (Tabelle 4.7). Bei den Hybriden wurde dieselbe absteigende Tendenz in der Fähigkeit zur Serinphosphorylierung verzeichnet. Die verringerte Serinphosphorylierung wurde dabei sowohl in der aktiven als auch in der inaktiven Untereinheit der Hybride Y1150F und Y1151F detektiert.

Dies könnte mit einer Deformation der aktiven Spalte zusammenhängen. Bei einer Aufweitung der aktiven Spalte (Y1151F>Y1150F>Y1146F>WT) könnte das größere Tyrosin noch phosphoryliert werden, jedoch das kleinere Serin nicht mehr. Das würde mit der verringerten Substratspezifität korrelieren. Je weiter die aktive Spalte ist, desto schlechter ist die Spezifität für ein Substrat, das nicht fest an die Kinase gebunden ist. Eine feste Bindung des Substrates bewirkt eine massive Erhöhung der lokalen Konzentration, wodurch eine schlechte Spezifität umgangen werden kann (vgl. Phosphorylierung der inaktiven Untereinheit im Hybrid).

In der Arbeitsgruppe konnte mit dem Substrat PTB jedoch gezeigt werden, dass eine große räumliche Nähe und hohe lokale Konzentration des Substrates nicht zwingend zur Umsetzung führt. Bei PTB handelt es sich um die phosphotyrosinbindende Domäne des IRS-1 Substrates (Aminosäure PI58 - N270). Nach der N-terminalen Autophosphorylierung der Insulinrezeptorkinase an Tyrosin Y960 erfolgt eine Bindung über ionische

Wechselwirkungen, so dass die PTB als Substrat fest an die Kinase gebunden ist. PTB wird von der Insulinrezeptorkinase hauptsächlich an Serin phosphoryliert.

Versuche mit den GST-Kinase-Mutanten und PTB als Substrat ergaben, dass die Homodimere WT, Y1146F und Y1150F zu einer Phosphorylierung der PTB an Serin im gleichen Maße fähig waren (Homodimer WT 69%; Homodimer Y1146F 73%; Homodimer Y1150F 62% Serinphosphorylierung). Jedoch zeigte das Homodimer Y1151F trotz großer Nähe und hoher lokaler Konzentration des Substrates keine nennenswerte katalytische Aktivität. Diese könnte zum einen daran liegen, dass das Y960 nicht phosphoryliert ist, PTB somit nicht an die Kinase binden kann und nicht umgesetzt wird. Zum anderen könnte eine verminderte duale Aktivität des Homodimer Y1151F vorliegen, die möglicherweise durch eine Konformationsänderung in der aktiven Spalte hervorgerufen werden könnte. Die Untersuchung des Phosphateinbaus und die verminderte Autophosphorylierung an Serin der Homodimere Y1151F lassen jedoch auf eine Deformation der aktiven Spalte schießen.

Tatsächlich zeigt die von Hubbard vorgestellte Kristallstruktur, in der die trisphosphorylierte IRKD mit einem Peptid und ATP-Analogen kokristallisiert wurde (Hubbard 1997), dass die Substratbindung über eine Faltblatt-Faltblatt-Wechselwirkung am Ende der Aktivierungsschleife erfolgt. Die Mutation des Tyrosin Y1151F, welches sich ebenfalls am Ende der Aktivierungsschleife befindet, könnte demnach eine Veränderung der Position der Aktivierungsschleife hervorrufen und somit eine Substratbindung und Umsetzung verhindern. Schon der Austausch der benachbarten Phosphorylierungsstelle Y1150F scheint sich auf die Position der Aktivierungsschleife nachteilig auszuwirken, da auch die Y1150F Mutanten eine eingeschränkte Aktivität in der Substratphosphorylierung aufweisen.

5.2.3 Identifizierung der Phosphorylierungsstellen der GST-Kinasen und Hybride

Eine Voraussetzung für die Aktivierung der Insulinrezeptorkinase ist eine Phosphorylierung der drei Tyrosine in der Aktivierungsschleife. Von Wei (1995) wurde dafür ausschließlich Transphosphorylierung postuliert. In der Literatur ist lediglich eine *cis*-Phosphorylierung der

IRKD für den N-Terminus (Y960) beschrieben (Cann und Kohanski 1997; Kohanski 1993). Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Hybriden kann die Aktivierung jedoch nur in *cis* erfolgen, da sie nur eine Untereinheit mit katalytischer Aktivität besitzen. Eine Transphosphorylierung durch ein benachbartes Hybrid konnte durch vorangegangene Versuche unter den verwendeten Bedingungen weitgehend ausgeschlossen werden (Herweg, 2008). Zur Untersuchung des Phosphateinbaus in die Aktivierungsschleife der Mutanten wurde die Methode der Phosphopeptidkartierung genutzt. Diese Methode sollte eine Erklärung für die Diskrepanz im Phosphateinbau der Mutanten bei der Autophosphorylierung liefern.

Die Phosphopeptidkartierung ermöglicht es die zeitliche Besetzung der Autophosphorylierungsstellen, speziell im Falle der Aktivierungsschleife, zu bestimmen. Etabliert wurde die Methode für die monomere IRKD von Al-Hasani (1995). Nach tryptischer Spaltung der radioaktiv autophosphorylierten IRKD konnten 29 Peptide mit potentiellen Phosphorylierungsstellen (Tyr, Ser, Thr) mittels Edman-Sequenzierung identifiziert werden. Dies ermöglichte eine genaue Zuordnung der Phosphorylierungsstellen der IRKD. Auf Grund dieser Arbeit ist bei der Auftrennung des zu untersuchenden Phosphopeptidgemisches durch HPLC-Anionenaustausch-Chromatographie anhand der Retentionszeiten eine Zuordnung der Phosphorylierungsstellen möglich.

Bei einer Autophosphorylierung über 15 Minuten kann davon ausgegangen werden, dass die endgültige Besetzung der Phosphorylierungsstellen bereits erfolgt ist. Dabei traten hauptsächlich die mono- und bisphosphorylierte Form der Aktivierungsschleife auf, während die trisphosphorylierte Form schwächer vorgefunden wurde. Auffällig war die starke Aufspaltung des bis-Peak in ein Doublet. Vorangegangene Mutationsanalysen der Aktivierungsschleife zeigen, dass es sich hierbei um zwei bisphosphorylierte Formen handelt, bei denen unterschiedliche Tyrosine besetzt sind (Nölle 1998). Bei der zu früheren Retentionszeiten auftretenden Form werden Y1146 und entweder Y1150 oder Y1151 phosphoryliert. Wohingegen bei dem zur späteren Retentionszeit verschobenen bis-Peak die Besetzung von Y1150 und Y1151 vorgefunden wurde. Demnach überwiegt nach 15 min Autophosphorylierung die Besetzung von Y1146 und entweder Y1150 oder Y1151.

Im Folgenden galt es dies mittels Phosphopeptidkartierungen auch für die Homodimere- und Heteromer-Mutanten zu bestätigen. Dazu wurde zunächst untersucht, ob die aktiven

Untereinheiten in den GST-Kinasen und im Hybrid das gleiche Besetzungsmuster aufwiesen. In der Tat zeigten alle aktiven Untereinheiten die gleiche Verteilung der Phosphorylierungsstellen, unabhängig ob sich die aktive Untereinheit im Homodimer oder im Hybrid befand. Die weitere Diskussion wird sich deshalb hauptsächlich auf Hybride beziehen.

Die Chromatogramme der katalytisch defizienten Untereinheiten der Hybrid-Mutanten ähnelten sich sehr stark. Bei allen werden drei Phosphorylierungsstufen im annähernd gleichen Verhältnis erreicht. Zudem sind die Chromatogramme sehr diffus. Dies kann jedoch nicht allein mit dem geringeren radioaktiven Einbau zu begründen sein, da die Chromatogramme der aktiven Untereinheiten mit ähnlichen cpm-Werten klare Peaks aufwiesen. Dies könnte als ein Hinweis auf eine mangelnde Präferenz in der Reihenfolge der Phosphorylierung der Aktivierungsschleife gedeutet werden. Es könnte sein, dass die postulierte Reihenfolge der Besetzung der Phosphorylierungsstellen (Dickens und Tavare 1992; Wei et al. 1995) bei einer *trans*-Phosphorylierung nicht in dieser strengen Form gilt.

Die Ergebnisse der Phosphopeptidkartierungen korrelierten mit den Daten der radioaktiven Autophosphorylierung. Die aktive Untereinheit der Hybride zeigte einen vergleichbaren Phosphateinbau wie eine aktive Untereinheit der GST-Kinasen. Außerdem zeigten alle Hybrid-Mutanten einen vergleichbaren relativen Phosphateinbau in die katalytisch defiziente Untereinheit.

Durch die Phosphopeptidkartierungen konnten auch die unterschiedlichen Phosphateinbauten der Hybrid-Mutanten erklärt werden. Die Hybride WT und Y1151F zeigt einen vergleichbaren katalytische Phosphateinbau. Dies lässt auf eine ähnliche Besetzung der Phosphorylierungsstellen in der Aktivierungsschleife schließen. Die Phosphopeptidkartierungen der aktiven Untereinheiten ergeben tatsächlich für das Hybrid WT vorwiegend mono- und bis-Phosphorylierung der Aktivierungsschleife. Die tris-Phosphorylierung trat nur in geringerem Maße auf. Das Hybrid Y1151F zeigt ebenfalls eine starke mono- und bis-Phosphorylierung, während tris-Phosphorylierung dieses Hybrids auf Grund der Mutation der Aktivierungsschleife nicht möglich ist. Dennoch konnte bei einer Retentionszeit von ca. 100 min ein kleiner Peak beobachtet werden. Dieser Peak wird einem nicht weiter identifizierbaren Peptid zugeordnet, das möglicherweise nicht vollständig verdaut worden ist und auf Grund der größeren Ladung länger auf der Säule retardiert.

Sowohl das Hybrid WT, als auch das Hybrid Y1151F, als auch die zugehörigen Referenzkinasen zeigen in der aktiven Untereinheiten die gleiche Besetzung der Phosphorylierungsstellen. Auch zeigten beide Hybride und Kinasen einen ähnlichen Phosphateinbau in der Autophosphorylierung. Dies lässt den Schluss zu, dass für die Aktivierung der IRKD die Phosphorylierungsstelle Y1151 wahrscheinlich nicht besetzt werden muss. Auch fand sich in beiden aktiven Untereinheiten eine stärkere Ausprägung des frühen bis-Peaks. Dies ist gleichbedeutend mit einer wahrscheinlichen Besetzung der Phosphorylierungsstellen Y1146 und Y1150, nachdem die Phosphorylierung der Position Y1151 vermutlich eine untergeordnete Rolle spielt.

Die Hybride Y1146F und Y1150F zeigen im Vergleich zum Hybrid WT in der Autophosphorylierung nur den halben Phosphateinbau, wobei auch dies mit Hilfe der Maps erhärtet werden konnte. Die Chromatogramme der aktiven Untereinheiten der Hybride Y1146 und Y1150 wiesen nach 15 min Autophosphorylierung einen stark ausgeprägten Peak für die mono-Phosphorylierung auf. Der bis-Peak war eher schwach ausgebildet. Beide Hybride erreichen demnach nicht den für sie möglichen maximalen Phosphateinbau. Wahrscheinlich wird in beiden Hybriden, ähnlich dem Hybrid WT, die Position Y1151 kaum phosphoryliert, weshalb nur der halbe Phosphateinbau erreicht wird. Für die Phosphorylierung der Aminosäure Y1151 scheint demnach die Phosphorylierung von Y1146 und/oder Y1150 notwendig zu sein. Es konnte jedoch keine Präferenz für Y1146 oder Y1150 gefunden werden, da beide Hybride einen vergleichbaren Phosphateinbau zeigen und auch die Phosphopeptidkartierung keinen gravierenden Unterschied aufwies.

Der genauere Vergleich der Chromatogramme der Hybride Y1146F und Y1150F ergibt zwei unterschiedliche bis-Peaks mit unterschiedlichen Retentionszeiten, das Hybrid Y1146F zeigt einen späten bis-Peak, der einer Besetzung von Y1150 und Y1151 zuzuordnen ist, das Hybrid Y1150F einen frühen bis-Peak auf, entsprechenden einer Phosphorylierung von Y1146F und Y1151F.

Zusammenfassend ergibt sich die folgende Reihenfolge für die Phosphorylierung der Aktivierungsschleife:

Zunächst erfolgt mit gleicher Präferenz eine Phosphorylierung entweder an Y1146 oder Y1150, gefolgt von einer bis-Phosphorylierung an diesen beiden Positionen. Erst dann findet

eine Phosphorylierung an Y1151 statt. Diese scheint jedoch zur vollen Kinaseaktivität der IRKD im Bezug auf die Autophosphorylierung nicht erforderlich zu sein.

5.3 Zusammenfassung und Ausblick

Die Charakterisierung der generierten Konstrukte, sowohl der GST-Kinasen als auch der Hybride, zeigt überraschende Unterschiede in der katalytischen Aktivität, die Auto- und Substratphosphorylierung betreffend.

Alle dimeren Kinasehybride sind in der Lage sich selbst sowohl in der aktiven (*cis*-Phosphorylierung) als in die inaktive Kinaseuntereinheit (*trans*-Phosphorylierung) zu phosphorylieren. Der Phosphateinbau ist in der aktiven Komponente mit 60% höher als in der inaktiven. Die wirft ein neues Licht auf den Aktivierungsmechanismus von Kinasen durch Dimerisierung. Bislang galt es als unwidersprochen, dass infolge der Dimerisierung es zu *trans*-Phosphorylierung kommt (Schlessinger, 1988).

Des Weiteren wurde für jede Hybrid Mutante, im Vergleich mit den dimeren Kinasen, die eine identische Mutation tragen, eine ähnliche katalytische Aktivität sowohl in der Auto- als auch in der Substratphosphorylierung gefunden.

Eine aktive Untereinheit im Hybrid zeigt demnach die gleiche katalytische Aktivität wie eine aktive Untereinheit im GST-Homodimer. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass im preformierten Dimer des IR nur eine der beiden katalytischen Untereinheiten aktiv sein muss. Ein solcher Ansatz könnte eine mögliche Erklärung für das Funktion von Pseudokinasen in Zellen liefern. Die katalytisch inaktiven Pseudokinasen könnten als reiner Dimerisierungspartner die aktive Kinaseuntereinheit aktivieren, so dass vollständige Kinaseaktivität erreicht werden kann.

Keine Mutation in der Aktivierungsschleife führt also, die Autophosphorylierung betreffend, zu einer Knockout-Mutation, wie es im Fall der Proteinkinase A bereits beschrieben wurde (Adams *et al.*, 1995). Überraschen besitzen alle Mutanten vergleichbare Phosphorylierung wie der Wildtyp, bis auf die Y1150F Mutanten.

Für die Substratphosphorylierung ergibt sich ein verändertes Bild. Hier konnten die Kinasekonstrukte mit den Mutationen Y1150F und Y1151F das Substrat, aufgrund der geringen Substrataffinität, nicht phosphorylieren. Die Aktivität in der Substratphosphorylierung nahm in der Reihenfolge $WT \geq Y1146F > Y1150F > Y1151F$ ab. Vergleichbare Ergebnisse wurden bereits von Zhang für die Substratphosphorylierung von PolyGluTyr vorgestellt (Zhang *et al.*, 1991). Für die Autophosphorylierung hingegen wurde folgende Reihenfolge vorgefunden: $WT = Y1151F = Y1146F > Y1150F$. Ähnliche Ergebnisse wurden *in vivo* bereits beobachtet (Wilden *et al.*, 1992). Jedoch wurde über die unterschiedlichen Aktivitäten in der Substrat- und Autophosphorylierung bisher nicht berichtet.

Durch die Mutationsanalyse der Aktivierungsschleife konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung an Position Y1151 für die uneingeschränkte Autophosphorylierungsaktivität nicht notwendig ist. Laut Literatur findet die Besetzung dieser Position zuletzt statt (Dickens & Tavare 1992; Wei *et al.*, 1995). Hier konnte allerdings keine weitere Aussage zu der Reihenfolge der Phosphorylierung der Aktivierungsschleife getroffen werden, da keine Präferenz zwischen der Besetzung der Position Y1146 und Y1150 gefunden werden konnte.

Die Tatsache, dass alle Kinasekonstrukte mit dem Austausch Y1150F und Y1151F nur zu einer geringen Substratphosphorylierung der Lage sind, könnte auf der Labilisierung der Aktivierungsschleife beruhen die nicht in der Lage ist, das Substrat im aktiven Zentrum zu stabilisieren. Im Einklang mit einer möglichen Aufweitung des aktiven Zentrums steht die Feststellung, dass die Mutante Y1150F eine stark verringerte duale Aktivität zeigt und die Mutanten Y1151F diese Fähigkeit nahezu vollständig verloren haben, sogar selbst dann, wenn das Substrat (PTB) nur eine geringe Neigung zur Dissoziation zeigt.

Mögliche Hinweise auf die Bedeutung der Positionen Y1150 und Y1151 bei der Substratphosphorylierung liefert die Kristallstruktur einer aktiven IRKD von Hubbard (Hubbard 1997). Die Kristallstruktur zeigt die Bindung eines kokristallisierten Peptids an einem β -Faltblatt am Ende der Aktivierungsschleife. Der Austausch der Phosphorylierungsstellen Y1150 und Y1151, die sich beide am Ende der Aktivierungsschleife befinden, könnte zu einer Konformationsänderung der Aktivierungsschleife führen, die mit einer Umpositionierung des β -Faltblattes einhergeht.

Die Lösung für dieses, weitgehend auf Hypothesen basierte, Verhalten der Mutanten Y1150F und Y1151F, bezüglich fehlender dualer Aktivierung und verringerter Substratphosphorylierung, kann erfolgreich nur gelöst werden, wenn es gelingt diese Kinasemutanten, möglichst mit Substrat (PTB oder Peptidsubstrat), zu kristallisieren, und der Röntgenstrukturanalyse zu zuführen.

6 Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 Bakterienstämme, Viren, Kulturmedien und – Zusätze

<i>Autographa californica</i> Nuclear Polyhedrosis Virus	Pharmingen, San Diego, CA, USA
<i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf9) Zellen	Dr. S. Stabel, Max-Delbrück-Laboratorien, Köln
<i>Escherichia coli</i> DH5α	Dr. S. Stabel, Max-Delbrück-Laboratorien, Köln
Amphotericin B (Fungizone®)	Life Technologies, Eggenstein
Ampicillin, Natriumsalz	Fluka, Buchs, CH
Fötales Kälberserum (FKS)	Life Technologies, Eggenstein
Gentamycinsulfat (G418)	Life Technologies, Eggenstein
Grace's Insektenzellenmedium	Life Technologies, Eggenstein
LB-Broth Base Medium	Life Technologies, Eggenstein
LB-Agar	Life Technologies, Eggenstein
Neutralrot (3-Amino-7-dimethylamino-2-Methylphenazin-Hydrochlorid)	Sigma, Taufkirchen
Trypanblau (1,2-bis(-Amidino-2-benzofuranyl)-ethylen)	Sigma, Taufkirchen

6.1.2 Chemikalien

A

Aceton	Roth, Karlsruhe
Acetonitril, <i>gradient grade</i>	Merck, Darmstadt
Acrylamid, p.a.	Serva, Heidelberg
Adenosin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
[γ - ³² P]-Adenosin-5'-Triphosphat, > 5000 Ci/mmol	NEN, Zantentem, Belgien
Agarose, <i>electrophoresis grade</i>	Seakem, Hameln
Ameisensäure 98-100%	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumcarbonat	Merck, Darmstadt
Ammoniumhydroxid-Lösung, 25 %	Fluka, Buchs, Schweiz
Ammoniumper(oxodi)sulfat	Serva, Heidelberg
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt

B

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

C

Complete Inhibitor Tablets	Roche, Mannheim
Complete Inhibitor Tablets EDTA-free	Roche, Mannheim

D

Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
------------------------	------------------

Dimethylsulfoxid (DMSO)
Dithiothreitol (DTT)

Merck, Darmstadt

Sigma, Taufkirchen

E

Essigsäure, >97%, p.a.
Ethanol, absolut, p.a.
Ethidiumbromid (2,7-Diamino-10-ethyl-9-phenyl-phenanthridiumbromid)

Roth, Karlsruhe
Merck, Darmstadt

AppliChem, Darmstadt

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)

Merck, Darmstadt

G

Glutathion-L, reduziert
Glycerin
Glycin, *electrophoresis grade*

Boehringer, Mannheim
Serva, Heidelberg
ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA

H

Harnstoff

Biomol, Hamburg

I

Imidazol
Isopropanol, p.a.
Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG)

Merck, Darmstadt
Merck, Darmstadt
Biomol, Hamburg

K

Kaliumchlorid-hexahydrat, p.a.
Kaliumhydrogenphosphat, p.a.
di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, p.a.
Kaliumhydroxid

Merck, Darmstadt
Merck, Darmstadt
Merck, Darmstadt
Merck, Darmstadt

L

Leupeptin

Sigma, Taufkirchen

M

Magnesiumchlorid-Hexahydrat, p.a.
Mangan(II)chlorid-Tetrahydrat, p.a.
Methanol, p.a.
N,N'-Methylenbisacrylamid, *research grade*

Merck, Darmstadt
Merck, Darmstadt
Roth, Karlsruhe
Serva, Heidelberg

N

Natriumacetat, wasserfrei, p.a.
Natriumazid, reinst
Natriumchlorid p.a.
Natriumcarbonat
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat, p.a.
Natriumdodecylsulfat (SDS)
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat
Natriumhydroxid
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)
Ninhydrin

Merck, Darmstadt
Merck, Darmstadt
Roth, Karlsruhe
Merck, Darmstadt
Merck, Darmstadt
Serva, Heidelberg
Merck, Darmstadt
Merck, Darmstadt
Sigma, Taufkirchen
Merck, Darmstadt

Natrium Orthovanadat

Sigma, Taufkirchen

P

Perchlorsäure, 70%

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)

Phosphorsäure

Polyethylenglykol 35000 (PEG-35000)

Ponceau S

i-Propanol, p.a.

Merck, Darmstadt
Sigma, Taufkirchen
Fluka, Buchs, CH
Serva, Heidelberg
Merck, Darmstadt
Merck, Darmstadt

S

Sucrose Ultra Pure

Salzsäure, 25 %

Schwefelsäure, 98 %

Serva Blue G

Serva Blue R

MP Biomedicals LLC, Illkirch, F
AppliChem, Darmstadt
Merck, Darmstadt
Serva, Heidelberg
Serva, Heidelberg

T

Trichloressigsäure (TCA)

N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (TEMED)

Triton-X-100®, p.a.

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)

Trypanblau (1,2-bis-Amidino-2-benzofuranylethylen
(0,5 % (w/v) Trypanblau in 0,9 % (w/v) NaCl))

Tween-20 (Polyoxyethylensorbitmonolaureat)

AppliChem, Darmstadt
MP Biomedicals LLC, Illkirch, F
Boehringer, Mannheim
Sigma, Taufkirchen

Serva, Heidelberg
BioRad, München

X

Xylen Cyanole FF (XC)

Sigma, Taufkirchen

6.1.3 Chromatographiematerial

Matrixmaterial:

Glutathion-Sepharose-4B

Nickel-NTA Agarose

Pharmacia, Freiburg
Qiagen, Hilden

Fertigsäule:

Nucleogel SAX10000-8/46 (50 x 4,6)

Machery & Nagel, Düren

6.1.4 Kit-Systeme

BaculoGold™-Transfection Kit

GenElute™ Plasmid Miniprep Kit

my-Budget Double Pure Kit

Nucleobond® AX 100 Plasmid Kit

QIAquick™ PCR Purification Kit

PharminGen, San Diego, CA, USA
Sigma, Steinheim
Bio-Budget Technologies GmbH,
Krefeld
Machery & Nagel, Düren
Qiagen, Hilden

6.1.5 Laborgeräte

A

Autoklaven:

Tischautoklav Tuttnauer 2540 EL
Varioklav Dampfsterilisator

Tuttnauer, Jerusalem, Israel
H+P Labortechnik, München

B

BioLogic Workstation
(inkl. Molecular Analyst Software)
Blockthermostat BT1301

BioRad, München
Sel Laboratory Products, England

E

Elektrophorese-Apparaturen:

Mighty Small SE245 „Dual Gel Caster“
Novex EI 9001-XCELL 2 Mini-Cell
Electroporator 2510

Hoefler, San Francisco, CA, USA
Novex, San Diego, CA, USA
Eppendorf, Hamburg

G

Geltrockner:

Model 543
Phero-Temp

BioRad, München
Biotec Fischer, Reiskirchen

H

Heizblock HB-130
HetoVac VR1 + HetoTrap CT110
Homogenisator

Unitek, Böblingen
Heto, Birkerød, Dänemark
Braun, Melsungen

I

Inkubatoren:

EB 28WTB Binder, Tuttlingen
FD 53WTB Binder, Tuttlingen
Inkubator Shaker innova 4000

New Brunswick Sci., Edison, NJ,
USA

L

Leuchttisch
UV-Leuchttisch N90 MW 312nm

Nonius, Delft, NL
Konrad Bend, Wiesloch

M

Microplate Reader Model 550
Mikroskop Wilovert S
Molecular Imager System GS 363
Molecular Imaging Screen-C
Molecular Imaging Screen-BI
Eraser GS 505
Sample Exposure Platform GS 505

BioRad, München
Hund, Wetzlar

BioRad, München

P

PCR-Gerät:

Mastercycler 5330 (inkl. Heizdeckel 5330plus)

Eppendorf, Hamburg

Pipetten:

Pipetboy (P20, P100, P2000)
Eppendorf Research (0,5-10 µl; 2-20µl;
100-1000 µl)
Hamilton Microliter™ Spritze
Peristaltikpumpe M312
Photometer DU 7400

Gibson, Bad Camberg

Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Gilson, Arnouville Les Gonesse, F
Beckman, München

R

Rühr- Schüttel- und Mischgeräte:

Ikamag Magnetrührer mit Heizplatte
Ikamag Magnetrührer Reverstir Model RS 8
IKA-Vibrax-VXR
Rollschüttler RM-5
Inkubator Shaker innova 4000

Janke&Kunkel, Staufen
Toyo Kagaku Sangyo Co., Japan
Janke&Kunkel, Staufen
Braun, Melsungen
New Brunswick Sci., Edison, NJ,
USA

Rotoren:

HFA 12.500, HFA 22.50
70Ti und 45Ti

Heraeus, Düsseldorf
Beckman, Fullerton, CA, USA

S

Spannungsgeber:

EPS 3500
3000Xi
PowerPac 3000
SpeedVac SC110 + Refrigerated Vapor Trap RVT4104
Sterilbank LB-48-C Lamin Air □

Pharmacia, Feiburg
BioRad, München
BioRad, München
Savant, Farmingdale, NY, USA
Heraeus, Düsseldorf

T

Thermomixer 5436

Eppendorf, Hamburg

U

Ultraschallprozessor UP 200H

Dr. Hielscher GmbH, Teltow

V

Vakuumpumpe

Vakuubrand, Wertheim

W

Waagen:

BA4100
MC1 Sartorius, Göttingen

Sartorius, Göttingen

Wasserbäder:

Julabo 12B
Julabo 13A
Julabo F10
Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q Plus

Julabo, Seelbach
Julabo, Seelbach
Julabo, Seelbach
Millipore, Bedford, PA, USA

Western Blot-Apparatur:

LKB Multiphor II

Pharmacia, Freiburg

Z

Zentrifugen:

Centrifuge 5415 C (Tischzentrifuge)
 Centrifuge 5810 R
 EBA 12 R
 Mikrozentrifuge Hf-120 Capsule
 Variofuge 20 RS, 3.0 RS
 XL-70 Ultrazentrifuge
 Zählkammer nach Neubauer, improved

Eppendorf, Hamburg
 Eppendorf, Hamburg
 Hettich, Tuttingen
 Qualitron, Korea
 Heraeus, Düsseldorf
 Beckmann, Fullerton, CA, USA
 Brand GmbH, Wertheim

6.1.6 Molekulargewichts- und Längenstandards

GeneRuler™ DNA Ladder Mix #SM0331
 MassRuler™ DNA Ladder Mix #SM0403
 Prestained Protein Molecular Weight Marker #SM0441
 Unstained Protein Molecular Weight Marker #SM0431

MBI Fermentas, Wilna, Litauen
 MBI Fermentas, Wilna, Litauen
 MBI Fermentas, Wilna, Litauen
 MBI Fermentas, Wilna, Litauen

6.1.7 Nukleinsäuren

6.1.7.1 Plasmidvektoren

pAcG2T-TEV-His
 pAcG2T
 pAcSG2
 pET21(a)+

PharminGen, San Diego, USA
 PharminGen, San Diego, USA
 PharminGen, San Diego, USA
 MERCK (Norwegen), Bad Soden

6.1.7.2 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonucleotide wurden von Sigma-Genosys (Steinheim) bezogen.

6.1.7.3 Mutageneseprimer zur Generierung der GST-TEV-IRKD-Konstrukte

Primer pUC LIRK -5'(BamHI):

5' - TCCTATAAATGGATCCAAGAGGCAGCCAGA -3'

Primer pUC LIRK -3'(EcoRI):

5' - TAGGAATTCTTAGGAAGGATTGG -3'

6.1.7.4 Mutageneseprimer zur Generierung der GST-TEV-IRKDΔC-Konstrukte

Primer für pAc-G2T-GST-TEV-IRKD-Konstrukte

5' - AGCGAGGAGAACAAGTAACTCTAGAGTGAG -3'

3' - CCTCTTGTTTCATTGAGATCTCACTCCTCGA -5'

6.1.7.5 Sequenzierungsprimer

Sequenzierungsprimer pGEX 5 (#1):

5' - GGGCTGGCAAGCCACGTTTG -3'

Sequenzierprimer 3'-pAc-G2T-neu:

5' - CAACAACGCACAGAATCTAGCG -3'

Sequenzierungsprimer 1290:

5' - GGAGTGGTGTCAAGGGCCAGC -3'

6.1.8 Proteine

6.1.8.1 Antikörper

α-Rabbit IgG-Alkalische Phosphatase (AP) (1:3000)

Boehringer, Mannheim

α-GST-Exon 20 Rabbit (1:1000)

Lehr (1995)

α-pY Mouse (1:2000)

Santa Cruz, Santa Cruz, California

α-Mouse IgG-Alkalische Phosphatase (AP) (1:3000)

Santa Cruz, Santa Cruz, California

6.1.8.2 DNA-modifizierende Enzyme und zugehörige Puffer

Antarctic Phosphatase

NEB, Beverly, MA, USA

Antarctic Phosphatase Puffer

NEB, Beverly, MA, USA

Alkaline Phosphatase

NEB, Beverly, MA, USA

Alkaline Phosphatase Puffer

NEB, Beverly, MA, USA

Dpn I

NEB, Beverly, MA, USA

T4-DNA-Ligase

MBI Fermentas, Wilna, Litauen

T4-DNA-Ligase-Puffer

MBI Fermentas, Wilna, Litauen

Pfu-DNA-Polymerase

MBI Fermentas, Wilna, Litauen

10x *Pfu* Buffer mit MgCl₂

MBI Fermentas, Wilna, Litauen

dNTP-Mix

Roche, Basel, CH

6.1.9 Restriktionsenzyme und zugehörige Puffer

BamHI

Roche, Basel, CH

EcoRI

Roche, Basel, CH

EcoR V

NEB, Beverly, MA, USA

Nde I

NEB, Beverly, MA, USA

Xba I

NEB, Beverly, MA, USA

Xho I

NEB, Beverly, MA, USA

Puffer A

Roche, Basel, CH

Puffer B

Roche, Basel, CH

Puffer D

Roche, Basel, CH

Puffer 2

NEB, Beverly, MA, USA

Puffer 4

NEB, Beverly, MA, USA

6.1.10 Proteasen

Trypsin

Boehringer, Mannheim

6.1.11 Puffer und Lösungen

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

Ampicillin (1000x)

50 mg/ml Ampicillin, steril filtriert über 0,22 µm Spritzenfilter

ATP-Stocklösung (0,1 M)

100 mM ATP in 50 mM Tris / HCl pH 7,5

Blockierungspuffer für Western Blots

1% (w/v) BSA in PBS oder TBS, 0,02% NaN₃

Bradford-Färbereagenz

a) für 1-10 µg Protein:

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

b) für 0,1-2 µg Protein:

85% (v/v) Phosphorsäure, 5% (v/v) Ethanol, 0,004% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250

Destain Lösung

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 (Manniatis *et al.*, 1975) oder mit TE-Puffer angesetzt werden.

EDTA-Lösung

0,5 M EDTA / NaOH pH 7,5

Elutionspuffer für Glutathion-Sepharose Affinitätsreinigung

Der Elutionspuffer muss frisch angesetzt werden, da das reduzierte Glutathion sonst oxidiert.

10 mM red. L-Glutathion, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0

Ethidiumbromid-Lösung

5,25 mg/ml Ethidiumbromid

Kolloidale Peptid-Färbelösung (1 l)

0,8 g Serva Blue G in 400 ml MQ unter Rühren lösen, 400 ml 1 M H₂SO₄ zugeben, 3 h rühren, über Faltenfilter filtrieren, 88 ml 10 M KOH zugeben, 124 ml 100% (w/v) TCA hinzufügen

Kulturmedium

Grace's Insektenmedium, 10% (v/v) FCS

Fungizone (Endkonzentration: 2,5 µg/ml)

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

Grace's Insektenmedium phosphatfrei

Leupeptin-Stammlösung (1000x)

10 mg/ml Leupeptin

Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren

250 mM Saccharose, 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 Complete Tablette auf 50 ml Lysispuffer (für Separierung über Ni-NTA-Matrix, EDTA-free Tabletten verwenden)

Nativer Laufpuffer

384 mM Glycin, 50 mM Tris-HCl

Nativer Probenpuffer (4x)

250 mM EDTA, 0,1 M DTT, 16% (v/v) Saccharose, 375 mM, 3 M Tris / HCl (pH 8,8), 0,5% (w/v) Bromphenolblau

Natriumacetat-Lösung

3 M NaOAc / HAc, pH 5,2

Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie-Puffer

Lysis Puffer

50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 15mM Imidazol, pH 8,0

Puffer A (Waschpuffer)

50 mM Tris / HCl, 150 mM NaCl, 25 mM Imidazol, pH 8,0

Elutionspuffer

50 mM Tris / HCl, 150 mM NaCl, 45 mM Imidazol, pH 8,

50 mM Tris / HCl, 150 mM NaCl, 50 mM Imidazol, pH 8,0

50 mM Tris / HCl, 150 mM NaCl, 60 mM Imidazol, pH 8,0

50 mM Tris / HCl, 150 mM NaCl, 70 mM Imidazol, pH 8,0

50 mM Tris / HCl, 150 mM NaCl, 110 mM Imidazol, pH 8,0

50 mM Tris / HCl, 150 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0

Dialyse-Puffer

50 mM Tris / HCl, 100 mM NaCl, 100 mM Sacharose, pH 7,8

Ponceau-Rot Peptidfärbelösung

0,25% (w/v) PonceauS, 1% (v/v) HAc, mit MQ auf gewünschtes Volumen bringen

PBS-Puffer

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

Phosphorylierungs-Puffer (10x), Standardbedingungen

300 mM MgCl₂, 10 mM ATP, 10 mM DTT, 50 mM Tris / HCl pH 7,5

PMSF-Stammlösung (100x)

0,1 M PMSF in 100% (v/v) Isopropanol oder Ethanol

Puffer für DNA-Midipräparation

Puffer S1

50 mM Tris / HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNase A (zunächst in 1 ml Puffer lösen)

Puffer S2

200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS

Puffer S3

2,8 M KAc pH 5,1

Puffer N2

100 mM Tris, 900 mM KCl, 15% (v/v) Ethanol, pH 6,3 mit H₃PO₄ einstellen, 0,15% (v/v) Triton-X100

Puffer N3

100 mM Tris, 1150 mM KCl, 15% (v/v) Ethanol, pH 6,3 mit H₃PO₄ einstellen

Puffer N5

100 mM Tris, 1000 mM KCl, 15% (v/v) Ethanol, pH 8,5 mit H₃PO₄ einstellen

Regenerationspuffer 1 für Glutathion-Sepharose Affinitätsreinigung

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

Regenerationspuffer 2 für Glutathion-Sepharose Affinitätsreinigung

0,5 M NaCl, 0,1 M NaOAc-HOAc, pH 4,5

SDS-Laufpuffer (1x)

0,1% (w/v) SDS, 384 mM Glycin, 50 mM Tris / HCl

SDS-Probenpuffer (10x)

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

Spot-Test-Färbelösung

0,25% (w/v) Serva Blue G, 10% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure

Spot-Test-Entfärbelösung

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

TBE-Puffer (10x)

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

TBS-Puffer

150 mM NaCl, 100 mM Tris / HCl, pH 7,5

TBS/Tween

0,1% Tween-20 in TBS, immer frisch ansetzen

TE-Puffer

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

TEV-Spaltungspuffer (10x)

5 mM EDTA, 0,5 M Tris / HCl, pH 8,0

TNES-Puffer

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

TE-RNase-Puffer

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

Tris-Puffer (1)

50 mM Tris / HCl, pH 7,5

Tris-Puffer (2, Sammelgel)

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

Tris-Puffer (3, Trenngel)

3 M Tris-HCl, pH 8,8

Tryphanblau

0,5% (w/v) Trypanblau in 0,9% (w/v) NaCl

TSS-Lösung

85% LB-Medium, 10% (w/v) PEG 8000, 5% (v/v) DMSO, 50 mM MgCl₂, pH 6,5, sterilfiltrieren

Western Blot Blot-Puffer

50 mM Tris, 40 mM Glycin, pH 9,1

Western Blot Entwicklungspuffer

100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM Tris / HCl, pH 9,5

vor Gebrauch auf 10 ml Entwicklungspuffer 33 µl BCIP (20 mg/ml) und 66 µl NBT (50 mg/ml) geben

Wet Blot Puffer

192mMGlycin, 25mM Tris-HCL, 20% Methanol, 0,02% (v/v) SDS

6.1.12 Verbrauchsmaterial

A

Amicon® Ultra Centrifugal Filter Devices (4ml, 30 kDa)
Amicon® Ultra Centrifugal Filter Devices (15 ml, 30 kDa)
Autoklavierkontrollband

Millipore, Billerica, MA, USA
Millipore, Billerica, MA, USA
KMF Laborchemie, St. Augustin

C

Cassettes 1.5 mm, 25/PK (LOT NO. 80421-N)

Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

D

25 DC-Plastikfolien 20x20 cm Cellulose (für PASA)

Merck, Darmstadt

E

Einmach-Folie (Art.Nr. 5050)

Deti, Meckesheim

F

Filtermaterial

0,2 µm Dyngard ME Sterilfilter
0,22 µm Type GS (Ø 4,9 cm)
0,45 µm Type GS (Ø 4,9 cm)
Membranfilter ME 24 (0,2 µm , Ø 47 mm)

Microgon, CA, USA
Millipore, Bedford, PA, USA
Millipore, Bedford, PA, USA
Schleicher und Schuell GmbH, Dassel

Filterpapier

Faltenfilter (Ø 125 und 270 mm)
Munktell Grade 1F
Whatman 3T

Schleicger und Schuell GmbH, Dassel
LKB, Pharmacia, Freiburg
Whatman, Maidstone, GB

Filme

Kodak X-Omat LS film

Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

K

Küvetten

Quarzküvetten
(Typ 105.200-QS, Schichtdicke 10 mm, Zentrum 8,5 mm)
Halbmikro Einmalküvetten (Nr. 2712010)

Hellma, Mannheim
Ratiolab, Dreieich-Buchsschlag

P

Sarstedt Serological Pipette (1-25 ml, steril)
PVDF-Membran Immobilon P

Sarstedt, Nümbrecht
Millipore, Bedford, PA, USA

R

Reaktionsgefäße

Falcon BLUE MAX™ (aus Polypropylen, 15 und 50 ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
PCR-Tubes (0,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäß Safety Cap (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

6.1.13 EDV und Software

6.1.13.1 Datenerfassung

Adobe Photoshop CS1 (Version 8.0); Adobe Systems Inc.
 Adobe Photoshop CS3 (Version 10.0); Adobe Systems Inc.
 Bio-Rad Imaging System Software Molecular Analyst; Version: 1.5 (1996); Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA
 CanonScan D1250 U2F; Canon Deutschland GmbH, Krefeld
 CanonScan 4400F; Canon Deutschland GmbH, Krefeld
 Epson Perfection™ 2480 Photo; EPSON Deutschland GmbH, Meerbusch
 Microsoft Excel 2003
 Microsoft Word 2003
 Open Office. Org 2.4

6.1.14 Molekularbiologische Standardanwendungen

GENTle; Version 1.9.4 (2004); Autor: Magnus Manske,; Universität zu Köln Institut für Biochemie; Quelle: <http://gentle.magnusmanske.de>
 ImageJ; Version 1.39u (2007); Autor: Wayne Rasband, National Institute of Health, USA; Quelle: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>
 Sigma Plot 10.0 (2006); Systat Software, Inc

6.2 Methoden

6.2.1 Molekularbiologische Methoden

6.2.1.1 Bakterienkulturen

6.2.1.1.1 Bakterienkulturen zur Plasmidpräparation

Für alle molekularbiologischen Schritte, mit dem Ziel der Anlegung von Plasmid-Stammlösungen, wurde der rekombinations-defiziente *E.coli*-Stamm *DH5 α* verwendet. Dieser Stamm eignet sich zur Anlegung von Plasmid-Stammlösungen und Restriktionsspaltungen, da er kein Weiteres als das zu untersuchende (transformierte) Plasmid enthält.

Durch Transformation (6.1.1.4) der Bakterien mit den Vektor pAcG2T erwerben die Bakterien eine Antibiotikaresistenz für Ampicillin, aufgrund derer sie, nach Zugabe von Ampicillin (50 μ g/ml) zum LB-Medium, selektiert werden können.

Isolierte Klone wurden nach der Transformation (6.1.1.4) in 6 ml Übernachtskulturen (ÜNK) und bei 37°C unter Schütteln (180 rpm) vermehrt. Kulturen und Agarplatten sind bei 4°C vier Wochen haltbar und vermehrungsfähig.

6.2.1.1.2 Anlegen von Glycerolstocks

Zur langfristigen Aufbewahrung von Bakterien eignen sich Glycerolstocks, welche aus 85% (v/v) Bakterienkulturen (Absorption $A_{600\text{nm}} = 0,5$) und 15% (v/v) Glycerin (steril) bestehen.

6.2.1.1.3 Herstellung elektrokompenter Bakterien

Für die Transformation von Bakterien durch Elektroporation (6.1.1.4) muss die Bakteriensuspension einen niedrigen Salzgehalt haben, um ein zu schnelles Abfallen der angelegten Spannung, und damit eine ineffiziente Transformation, zu vermeiden.

1. 500 ml LB-Amp-Medium mit 5 ml einer ÜNK animpfen und bei 37°C / 180 rpm inkubieren, bis eine Absorption $A_{600\text{ nm}}$ von 0,5 erreicht ist
2. Inkubation der Bakteriensuspension für 20 min auf Eis
3. Zentrifugation der Bakteriensuspension für 30 min bei 4°C / 2506 x g (= 3500 rpm)
4. Bakteriensediment in 500 ml gekühltem, sterilem Wasser resuspendieren, kurz mischen
5. Zentrifugation der Bakteriensuspension für 30 min bei 4°C / 2506 x g
6. Bakteriensediment in 250 ml gekühltem, sterilem Wasser resuspendieren, kurz mischen
7. Zentrifugation der Bakteriensuspension für 30 min bei 4°C / 2506 x g
8. Bakteriensediment in 10 ml sterilem 10 % (v/v) Glycerin resuspendieren, kurz mischen
9. Zentrifugation der Bakteriensuspension für 30 min bei 4°C / 2506 x g
10. Bakteriensediment in 1,5 ml sterilem 10 % (v/v) Glycerin resuspendieren, kurz mischen
11. Aliquots (60 µl) der kompetenten Bakterien nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C aufbewahren, diese bleiben 2 Monate transformierbar (normalerweise kann man sie aber auch nach mehr als 6 Monaten verwenden)

6.2.1.1.4 Transformation elektrokompenter Bakterien durch Elektroporation

Die Elektroporation ist ein alternativer Weg, um Makromoleküle wie DNA in Bakterien (oder Hefestämme) einzubringen. Dabei handelt es sich um die Anwendung von kurzen Hochspannungsimpulsen, die temporäre Poren in der Zellmembran verursachen. Diese Poren sind in der Regel groß genug, dass Makromoleküle in die Zelle diffundieren können. Nach dem Entfernen des elektrischen Feldes und einer Zeit der Erholung schließen sich die Poren wieder. Die DNA kann innerhalb der Zelle transkribiert und repliziert werden. Die in den Transformationsansatz eingehende Flüssigkeit muss möglichst salzfrei sein. Dazu kann der Ligationsansatz für ca. 30 Minuten über einen Nitrozellulosefilter gegen eine 10%ige Glycerollösung dialysiert werden.

1. 1 µl (dialysiert bis zu 5 µl) der zu transformierenden DNA-Lösung (1-10 ng/µl) wird zu 50 µl sterilem MQ gegeben. Die verdünnte DNA-Lösung wird in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt.
2. Ein 30 µl Aliquot elektrokompenter Bakterien wird auf Eis aufgetaut und zu der DNA-Lösung in der Elektroporationsküvette gegeben.
3. Die von außen völlig trockene Elektroporationsküvette wird in den Elektroporator gestellt; die Elektroporation erfolgt durch Entladung der an dem Kondensator der Elektroporationsküvette angelegten Spannung (1700V).

4. Schnelle Zugabe von 1 ml 37°C warmen SOC- oder LB-Medium. Die Bakteriensuspension wird in ein geeignetes Gefäß (Falconröhrchen 15 ml) umgefüllt und 1 h bei 37°C/ 220 rpm inkubiert.
5. Aliquots von 50-400 µl werden in 100 mm Ø Petrischalen auf LB-Amp⁺-Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Zusätzlich wird eine Kontrolle mit nicht transformierten Bakterien ausplattiert. Die Transformationsrate liegt, für elektrokompetente Bakterien und einem Standardplasmid, bei mehr als 10⁹ Kolonien pro µg DNA.

6.2.1.2 DNA-Reinigung, Konzentrationsbestimmung und Anreicherung

6.2.1.2.1 Plasmid-Minipräparation nach Zhou

Diese Methode zur schnellen Reinigung von Plasmid-DNA basiert auf dem Verfahren der alkalischen Lyse nach Zhou et al. (1990). Die Bakterien werden in alkalischem Medium lysiert, Proteine und chromosomale DNA mit einer Natriumacetatlösung gefällt und die Plasmid-DNA mit Ethanol präzipitiert.

- 1,5 ml Aliquot einer Übernachtskultur in ein Reaktionsgefäß überführen
- Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei max. Drehzahl (14.000 rpm) für 30 sec
- Überstand verwerfen (bis auf ca. 50 µl), das Pellet resuspendieren
- Zugabe von 300 µl frisch angesetztem TNES-Puffer, 5x invertieren
- Zugabe von 150 µl 3M NaOAc (pH 5,8; kalt), erneut 5x invertieren
- Zentrifugation der Suspension für 20 min bei max. Drehzahl, Überstand in neues Reaktionsgefäß transferieren, Pellet verwerfen
- Zum Überstand 900 µl 100 % (v/v) EtOH (-20°C) hinzugeben
- Zentrifugation für 20 min bei max. Drehzahl
- Überstand verwerfen
- Zugabe von 750 µl 70 % (v/v) EtOH (4°C)
- Zentrifugation für 5 min bei max. Drehzahl
- Überstand verwerfen und Pellet in 30 µl Puffer S1 mit RNase aufnehmen

Die so gereinigte Plasmid-DNA kann bei -20°C gelagert werden; die Ausbeute an Plasmid-DNA kann über ein Agarosegel anhand eines Massenstandard-Markers abgeschätzt werden. Die mit dieser Methode gewonnene DNA wurde nur zur Restriktionskontrolle verwendet, der Reinheitsgrad ist deutlich schlechter als über die in der Arbeit vorgestellten Kit-Systeme.

6.2.1.2.2 Plasmid-Minipräparation

Die Reinigung von Plasmiden aus *E.coli*-Bakterienkulturen erfolgt mit dem kommerziell erhältlichen *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit*. Hierbei werden Bakterien mithilfe von Enzymen und einer alkalischen SDS-Lösung lysiert. Die DNA bindet an eine Silicamembran und Verunreinigungen werden mithilfe eines salzhaltigen Puffers und Zentrifugation entfernt, bevor die gebundene DNA mit einem Tris-HCl-EDTA-Puffergemisch eluiert wird. Das *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit* wird gemäß den Herstellervorgaben eingesetzt.

Die so gereinigte Plasmid-DNA kann bei -20°C gelagert werden; die Ausbeute an Plasmid-DNA kann entweder über photometrische Messung bestimmt oder über ein Agarosegel anhand eines Massenstandard-Markers abgeschätzt werden.

6.2.1.2.3 Reinigung großer Plasmidmengen (Nucleobond® Plasmid Kit AX 100)

Die Reinigung großer Plasmidmengen aus *E.coli*-Bakterienkulturen erfolgt mit dem kommerziell erhältlichen *Nucleobond® Plasmid Kit* von Macherey-Nagel. Nach alkalischer Lyse der Bakterien und grober Entfernung der Proteine, des SDS und der chromosomalen DNA mit einer Kaliumacetatlösung wird die Plasmid-DNA mit der *Nucleobond®*-Säule AX 100 von restlichen Proteinen und RNA gereinigt. Die Säule basiert auf einer modifizierten Silicagelmatrix nach dem Verfahren eines Anionenaustauschers. Verunreinigungen werden mit einem salzhaltigen Puffer entfernt, bei dessen Konzentration die Plasmid-DNA noch nicht eluiert. Durch Erhöhung der Ionenstärke wird die DNA von der Säule gewaschen und anschließend mit Isopropanol entsalzt und präzipitiert. Das *Nucleobond® Plasmid Kit* wird gemäß den Herstellervorgaben eingesetzt.

6.2.1.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wird durch eine Absorptionsmessung verdünnter Aliquots bei 260 nm bestimmt. Eine Absorptionseinheit bei 260 nm entspricht ca. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml einzelsträngiger DNA oder RNA bzw. 33 µg/ml Oligonukleotiden.

Die Konzentration der zu untersuchenden DNA-Lösung ergibt sich durch:

$$c(DNA)[\mu g / \mu l] = \frac{\text{Verdünnungsfaktor} \cdot A_{260nm} \cdot 50 \mu g}{1000 \mu l}$$

Um die Reinheit der DNA zu überprüfen, wird das Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm zu 280 nm (aromatische Gruppen der Proteine) bestimmt. Eine DNA ohne Proteinverunreinigung weist ein Verhältnis von 1,8-2 auf.

Die Menge an DNA kann auch im Vergleich zu bekannten Standards aus einer Agarose-Gelelektrophorese abgeschätzt werden.

6.2.1.2.5 Reinigung von PCR-Produkten mit dem QIAquick™ PCR Purification Kit

Das QIAquick™ PCR Purification Kit wird zur Darstellung von PCR-Produkten aus dem Amplifikationsansatz eingesetzt. 90-95 % der zu reinigenden DNA (100 bp – 10 kbp, maximal 10 µg) können angereichert und von restlichen Oligonukleotiden, Nukleotiden, Salzen und der Polymerase befreit werden. Die Entfernung der Kontaminationen ist Voraussetzung für eine effiziente Restriktion und Ligation der PCR-Produkte. Das QIAquick™ PCR Purification Kit wird gemäß den Herstellervorgaben eingesetzt.

6.2.1.2.6 Extraktion von DNA aus Agarosegelen: QIAquick Gel Extraction Kit

- Die DNA wird aus einem Agarosegel mit einem Skalpell herausgeschnitten
- Das herausgeschnittene Stück wird gewogen

- Zugabe von 3 Volumen Puffer QG auf 1 Volumen Gel
- 10 Minuten bei 50°C inkubieren, dabei jede zweite Minute kurz vortexen
- Das Gel löst sich auf
- Wenn die Farbe orange oder violett wird, dann soll man das pH mit 3M NaAcetat einstellen
- Bei gelber Farbe ist eine pH Einstellung nicht notwendig
- Zugabe von 1 Volumen Isopropanol
- Die Lösung in QIAquick Säule geben
- 1 Minute zentrifugieren
- Zugabe von 500 µl Puffer QG und 1 Minute zentrifugieren
- Mit 750 µl Puffer PE zwei Minuten inkubieren und anschließend zentrifugieren
- Weitere Minute zentrifugieren, um Ethanol wegzuwaschen
- Eluieren mit 50 µl 5 mM Tris pH 8,0

6.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der schnellen Vervielfältigung kleinster Mengen DNA. Das Prinzip basiert auf der enzymatischen Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind. Voraussetzung ist demnach die Kenntnis der, den zu amplifizierenden DNA-Abschnittes flankierenden, Nukleotidsequenzen. Die Oligonukleotidprimer werden im Überschuss zu einer DNA-Präparation gegeben. Nach thermischer Denaturierung der doppelsträngigen Ausgangs-DNA (96°C), paaren unter Hybridisierungsbedingungen (68-72°C) die Primer an die komplementären Sequenzen. Die DNA-Polymerase heftet Nukleotide an die 3'-OH-Primer-Enden und synthetisiert die restliche komplementäre Sequenz. Die entstandenen PCR-Synthese-Produkte werden bei 96°C denaturiert. Dann folgt eine neue Runde mit der Hybridisierung von Oligonukleotidprimern und DNA-Strang-Synthesen. Die Amplifikation der Zielsequenz gehorcht folgendem Zusammenhang:

$$N_K = (2^n - 2n) \times x$$

NK = Anzahl der Kopienzahl nach n Vervielfältigungszyklen

n = Anzahl der Vervielfältigungszyklen

2n = Anzahl der Produkte des ersten und zweiten Vermehrungszyklus, deren Länge nicht definiert ist

x = Anzahl der Kopien der ursprünglichen DNA-Matrize

Die Anzahl der Kopien der Zielsequenz wird ab dem zweiten Zyklus exponentiell vermehrt.

Die Anzahl der Zyklen – Denaturierung, Hybridisierung, Synthese – beträgt in der Regel 20-30(50), und wird der erwarteten Genauigkeit der Amplifikation angepasst.

Es handelt sich um eine Kettenreaktion, bei der winzige Mengen DNA um das Millionenfache amplifiziert werden.

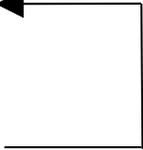
Ansatz für Amplifikations-PCR und Site-directed-mutagenesis-PCR:

100 ng	Template-DNA
125 ng	Primer 5'
125 ng	Primer 3'
1 µl	Pfu-Polymerase
5 µl	10xPfu-Puffer
1 µl	dNTP-Mix
ad 50 µl	mit MQ

Es wurde die Methode der HotStart PCR gewählt, bei der die Polymerase erst nach der initialen Denaturierung bei 96°C für 60 s dazugegeben wird.

6.2.1.3.1 Zyklen bei der Amplifikations-PCR

Amplifikationsprogramm für:

96 °C	50 sec	
96 °C	45 sec	
57 °C	45 sec	
72 °C	X Min*	
72 °C	10 Min	
4 °C	∞	

- Für puc-LIRKY-Y1150F wurde die Elongationszeit auf 2,5 min gesetzt.

6.2.1.3.2 Site-directed-mutagenesis-PCR

Bei der Mutagenese-PCR (*engl.: Site-directed-mutagenesis-PCR*) handelt es sich um eine Variation der PCR. Mithilfe der Primer wird nicht ein DNA-Fragment bestimmter Größe aus einem Template amplifiziert, sondern Modifikationen im Vektor selbst vorgenommen. Hierdurch lassen sich stille Mutationen einfügen, die Schnittstellen für bestimmte Restriktionsenzyme entfernen oder generieren. Ein weiterer Aspekt liegt in der Möglichkeit auf DNA-Ebene einzelne Aminosäuren beliebig zu ersetzen. Das PCR-Produkt unterscheidet sich vom Template nur durch die Mutation an dieser Position und durch den Methylierungsgrad. Im Gegensatz zu den aus Bakterien isolierten Templates weisen die PCR-Produkte keine Methylierung auf. Das Fehlen von Methylierung wird ausgenutzt, um die parentale DNA sowie Heterodimere aus PCR-Produkt und parentaler-DNA durch die Restriktionsendonuklease *DpnI* abzubauen, die spezifisch methylierte DNA schneidet.

Amplifikationsprogramm zur Einfügung eines Stopcodons in pAcG2T-GST-TEV-IRKD-Mutanten zur Herstellung von GST-TEV-IRKDAC-Mutanten:

96 °C	50 sec	
96 °C	45 sec	
58 °C	45 sec	
72 °C	19 Min 50 s	
72 °C	10 Min	
4 °C	∞	

6.2.1.3.3 Sequenzierung

Die Proben wurden durch die Firma GENTERprise sequenziert. Die Sequenzierung erfolgt auf einem ABI PRISM 3730 DNA Analyzer der Firma Applied Biosystems nach der *cycle sequencing* Methode. Die verwendeten Sequenzierungsprimer sind unter 5.7.2.5 aufgeführt. Die DNA- und Primerkonzentrationen entsprachen den Vorgaben von GENTERprise.

6.2.1.4 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die von einem Bakterium aufgenommene artfremde DNA abbauen, indem sie zumeist palindromische Nukleotidsequenzen erkennen, und dort den DNA-Strang schneiden. Die Restriktion eigener DNA wird vermieden, indem diese an den entsprechenden Erkennungssequenzen methyliert wird. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit benutzten Restriktionsenzyme sind in 5.8.3 zusammengefasst; diese Endonukleasen liefern am 5'-Ende überstehende Restriktionsprodukte (*sticky ends*). Die Restriktion wurde zur Überprüfung der PCR-Reaktion und der Kontrolle, der durch Mini/Midi-Präparation gewonnenen DNA benutzt.

Die Restriktionsansätze werden nach Herstellerangaben inkubiert. Das Ergebnis der Restriktion wird mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

6.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Mittels Agarose-Gelelektrophorese können Gemische von DNA-Molekülen in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. DNA-Moleküle bewegen sich aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatreste in Richtung der Anode. Die elektrophoretische Mobilität eines DNA-Moleküls bei gegebener Feldstärke, Geldichte und Laufpufferzusammensetzung ist abhängig von seiner Länge, die proportional zu seiner Ladung ist, und bei Plasmiden zudem vom Grad der Superspiralisierung. Durch Zugabe von Ethidiumbromid oder GelRed, das zwischen die Basenpaare der DNA interkaliert, kann die DNA unter UV-Licht durch die Fluoreszenzstrahlung (590 nm) des Ethidiumbromid-DNA-Komplexes identifiziert werden. Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 10 ng DNA pro Bande. Durch Variieren der Konzentration der Agarosegele werden DNA-Moleküle verschiedener Größenbereiche wie folgt aufgetrennt (Tab.):

Agarose [% (w/v)]	Trennbereich [bp]
0,3	5.000 – 60.000
0,6	1.000 – 20.000
0,7	800 – 10.000
0,9	500 – 7.000
1,2	400 – 6.000
1,5	200 – 3.000
2,0	100 – 2.000

Tabelle 6.1: Trennbereich von Agarosegelen in Abhängigkeit von ihrer Konzentration

Herstellung von Agarosegelen

Zunächst wird die gewünschte Menge an Agarose durch Kochen in 0,5x TBE-Puffer in Lösung gebracht. Der auf etwa 60°C abgekühlten Lösung werden 0,3 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die Lösung wird anschließend in eine Gelgießkammer gegossen. Ein Kamm wird zur Herstellung der Taschen zum Probenauftrag bis zum Erstarren des Gels eingesetzt.

Elektrophoretische Auftrennung von Proben im Agarosegel

Das erstarrte Gel wird in eine mit 0,5x TBE Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt und mit den Proben, welche mit 10x DNA-Probenpuffer versetzt sind, beladen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 50 oder 100 V, bis der Laufmittelfrontmarker Bromphenolblau das Gelende fast erreicht hatte.

6.2.1.6 Ligation

Unter Ligation versteht man die kovalente Verknüpfung von zwei oder mehreren lineare DNA-Molekülen. Diese kann durch die T4-DNA-Ligase katalysiert werden, welche unter ATP-Verbrauch die freien 3'-OH- mit 5'-Phosphat-Enden zweier DNA-Stränge verbindet. Die durch die T4-DNA-Ligase katalysierte Ligation kann sowohl bei überlappenden (*sticky ends*) als auch bei stumpfen (*blunt ends*) Enden der DNA-Moleküle erfolgen. Im letzten Fall allerdings weniger effizient, sodass hohe Konzentrationen an Enzym und DNA eingesetzt werden müssen.

6.2.1.6.1 Ligation der PCR-Produkte

Die Ligationsansätze wurden für 1 h gegen 10 % Glycerol dialysiert. Die Ligation selbst wurde bei 16°C über Nacht durchgeführt. Durch das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen Restriktions-Schnittstellen konnte das PCR-Produkte bzw. Linker nur in definierter Orientierung in den Vektor ligiert werden. Um Religationen zwischen dem Vektor und linearisierten Vektor zu verhindern, wurde der Vektor im Anschluss an die Restriktion mit der Antarctic Phosphatase dephosphoryliert, so dass keine nucleophilen Angriffe auf das Phosphat und somit keine Religationen möglich waren.

Ligationsansatz: n fmol Vektor, n fmol Insert bzw. Linker, 1 µl T4-Ligase, 2 µl 10x T4-Ligase Puffer, ad 20 µl MQ (zusätzlich zu Verbesserung der Ligation wurde 1 mM ATP dazugegeben)

Das Verhältnis von Vektor zu Insert/Linker wurde so gewählt dass keiner der Reaktionspartner unter 15 fmol lag (siehe Ergebnisteil).

6.2.2 Biochemische Methoden

6.2.2.1 Das Baculovirusexpressionssystem

6.2.2.1.1 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 stabförmigen 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). 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 infectionem (p.I) repliziert und transkribiert. In der frühen Phase (bis 10 h p.I.) verlassen vornehmlich die stäbchenförmigen Partikel durch Knospung die Zelle und infizieren Zellen in ihrer Umgebung. Die ersten Einschlusskörper sind nach 48 Stunden p.I. detektierbar. Die Lyse der Zellen setzt nach 72 Stunden ein.

Das Polyhedrin ist im Lebenszyklus für das Virus ein sehr wichtiges Protein und steht unter Kontrolle des sehr starken Polyhedrinpromotors, 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 exprimiert und gereinigt werden. (1 g pro 10^9 Zellen). Ein weiterer Vorteil dieses Expressionssystems ist sein eukaryotischer Ursprung. Viele für die Funktionalität von Säugerproteinen benötigte posttranslationale Modifikationen wie Faltung, Disulfidbrücken und Glykolysierungen werden von den Insektenzellen korrekt ausgeführt, so dass die gereinigten Proteine 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 (z. B. pAc-G2T) mit linearisierter AcNPV-DNA. Isolierte Viren werden dann sukzessive vermehrt und für die Infektion großer Insektenkulturen verwendet. Die Reinigung des exprimierten Proteins erfolgt nach der Lyse der Zellen mit chromatographischen Verfahren ().

6.2.2.1.2 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 Adhäsionskultur-Kultur in Gewebeschalen gehalten werden. Als Kulturmedium wird Grace's Insect Medium verwendet. Diesem werden fötales Kälberserum, das ein Gemisch von Wachstumsfaktoren liefert, welches die Differenzierung der Zellen verhindert und antiapoptotisch wirkt, sowie Gentamycin und Fungizone mit antibakterieller und antifungizider Wirkung zugesetzt. Die optimale Zelldichte beträgt 0,5 - 2 x 10^6 Zellen pro Milliliter Medium. Die Vitalität der Zellen (Lebendzellzahl) wird durch Anfärbung der Zellen mit Trypanblau bestimmt, das tote Zellen blau anfärbt und sie so mikroskopisch klar detektierbar macht. Zelldichte und Vitalität wurden durch mikroskopische Zählung einer Probe in einer Zählkammer nach Neubauer (*improved*) bestimmt.

Mit Viren infizierte Zellen unterscheiden sich generell in ihrer Größe, dem stark vergrößerten Zellkern und einer granulären Struktur im Cytosol. Daneben ist ihre Generationsdauer stark eingeschränkt und ihre Adsorptionsfähigkeit an das Kulturgefäß nicht mehr gegeben. Als Kontrolle werden parallel zum eigentlichen Versuch immer Negativansätze mit nicht infizierten Zellen bei allen Infektionen, Transfektionen und Plaque Assays angesetzt. Das Baculovirus-Sf9 Expressionssystem wurde in der vorliegenden Arbeit zur Herstellung aller Kinase-Konstrukte genutzt.

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

Die zu exprimierende DNA wird unter der Kontrolle des Polyhedrin-Promotors in einen sog. Transfervektor kloniert. Dieser kann aufgrund seiner Ampilicinresistenz 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 Kulturflasche werden 1 x 10⁶ Zellen in 3 ml Medium vorgelegt und für 15 Minuten zur Adsorption stehen gelassen. Während dieser Zeit pipettiert man 1 µg, der mittels Midi-Präp 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 4h bei 27°C inkubiert. Danach wird das Transfektionsgemisch abgesaugt und durch 2,5 ml frisches Kulturmedium ersetzt.

Nach fünf Tagen wird der Überstand 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 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Ebenso wird der Überstand (P3*) zwei Tage später behandelt. Rekombinante Viren werden anschließend durch einen Plaque Assay (6.2.4) isoliert und durch immunologischen Nachweis des exprimierten Proteins identifiziert (6.6.7).

6.2.2.1.4 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. Jeder Plaque repräsentiert ein einzelnes Virus. Nichtinfizierte Zellen erscheinen durchsichtig.

Durch Auszählen der Plaques bestimmter Verdünnungsreihen kann der Virus-Titer bestimmt 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 Reaktionsgefäß mit 1 ml Kulturmedium überführt. Von dieser Suspension wird eine 25cm² Kulturflasche mit 1 x 10⁶ 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.

6.2.2.1.5 Infektion von Insektenzellen: Expression und Co-Expression

Eine optimale Expression des gewünschten Proteins wird durch die richtige Virusmenge erreicht. Die Menge an zugegebenem Virusüberstand richtet sich nach der MOI („multiplicity of infection“), der zu infizierenden Zellzahl und dem Titer der einzusetzenden Viruslösung.

Die *MOI* beschreibt die Anzahl infektiöser Partikel (*engl.: plaque forming units, pfu*) pro Zelle. Ein „Low-Titer Stock“, der zur Infektion einer Spinnerkultur für eine Virusamplifikation dient, darf nur mit einer *MOI* von höchstens eins infiziert werden. Der Grund dafür liegt darin, dass jede Zelle höchstens von einem Virus infiziert wird, um die Möglichkeit einer Rekombination so gering wie möglich zu halten. Ein „Low-Titer Stock“ kann aus dem, im Plaque Assay gewonnenen Virusüberstand oder aus Virusüberstand P1* erhalten werden. Dazu infiziert man 1×10^6 Zellen in einer Kulturflasche mit 1 ml Überstand. Der hieraus gewonnene Überstand hat eine Titer von mindestens 10^7 pfu/ml.

Mit der Hilfe der Formel:

$$\text{Inoculum [ml]} = \frac{\text{MOI [pfu/Zelle]} \times \text{Zellzahl}}{\text{Virustiter [pfu/ml]}}$$

ergibt sich die einzusetzende Menge dieses Virusüberstandes für die Infektion einer Spinnerkultur in Milliliter. Der erzeugte Stock hat einen Titer von mindestens 10^9 bis 10^{10} pfu/ml. Zur Expression und anschließender Reinigung des Proteins sollte, um eine maximale Infektion der Zellen zu erreichen, ein Spinner oder eine Kulturflasche mit einer *MOI* von 5 - 10 infiziert werden.

Infektion von Kulturflaschen

In einer Kulturflasche werden 2-3 ml Medium vorgelegt und $1,5-3 \times 10^6$ Zellen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase ($1,5-2 \times 10^6$ Zellen/ml, >98 % Vitalität) befinden, dazu gegeben. Nach Adsorption der Zellen an das Kulturgefäß wird das Medium abgenommen. Die Infektion erfolgt durch Zugabe von Virusüberstand. Ist der Titer bekannt, wird mit einer *MOI* (*engl.: multiplicity of infection*; siehe oben) von 7,5 infiziert. Die Suspensionslösung wird für eine Stunde bei 27°C inkubiert und alle 15 min geschwenkt. Anschließend wird mit frischem Medium auf das gewünschte Volumen aufgefüllt und 48 h bei 27°C inkubiert.

Infektion im Spinner

Im Falle der Suspensionskultur werden die Zellen einer sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen Kultur aus der Spinnerflasche in Reaktionsgefäße überführt und bei 1800 rpm für 10 min pelletiert. Die Pellets werden mit Virusüberstand (*MOI* 5) resuspendiert; bei einer Coexpression von zwei Proteinen werden die Virenüberstände zunächst gemischt. Die resuspendierten Zellen gibt man zurück in die Spinnerflasche und inkubiert diese Suspensionslösung bei 27°C für eine Stunde, wobei die Suspensionslösung alle 15 min geschwenkt wird. Anschließend wird mit frischem Medium auf das gewünschte Kulturvolumen aufgefüllt und für 48 h bei 27°C inkubiert.

Sollen zwei Proteine in der *Sf9*-Zellkultur gleichzeitig exprimiert werden, erfolgt die Infektion mit zwei verschiedenen Virusüberständen gleichzeitig.

6.2.2.1.6 Ernte von *Sf9*-Zellen

Die Ernte von infizierten *Sf9*-Zellen aus der Kulturflasche erfolgt durch dreimaliges Schlagen gegen jede Seitenwand, wodurch sich die Zellen vom Boden ablösen. Sie werden, genauso wie die Zellen einer Spinnerkultur, mit dem Medium in Falcons überführt und pelletiert (2300 rpm, 10 min, RT). Die Medienüberstände werden verworfen. Die Zellpellets werden durch Resuspension in etwa 10-fachen Pelletvolumen mit eiskaltem PBS gewaschen und erneut pelletiert (2300 rpm, 10 min, 4°C). Das Pellet wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren und kann bei -80°C gelagert werden. Ab diesem Zeitpunkt erfolgen sämtliche weiteren Reinigungs- und Zentrifugationsschritte bei 4°C.

6.2.2.1.7 Herstellung von Solubilisaten aus *Sf9*-Zellen

Bevor die exprimierten Proteine affinitätschromatographisch gereinigt werden können, müssen diese zunächst aus den Wirtszellen in Lösung gebracht werden.

Zum Zellaufschluss werden die Pellets in 10 ml Lysepuffer (5.9) pro 10^8 Zellen resuspendiert, je 10x gepottert und bei 70 W für 4x 5 sec auf Eis sonifiziert (Intervall 0,5, 80 %). Die Zelltrümmer werden durch Zentrifugation für 12 min bei $10.000\times g$ sedimentiert. Um weitere unlöslichen Bestandteilen zu entfernen, folgt im Anschluss eine Ultrazentrifugation bei 40.000 rpm für 45 min. Die Überstände der Ultrazentrifugation sollten ausschließlich lösliche Zellbestandteile enthalten und werden aus diesem Grund als Solubilisate bezeichnet.

6.2.3 *Escherichia coli* als Expressionssystem

6.2.3.1 Allgemeines

Eines der ältesten und am besten charakterisierten Systeme zur Expression rekombinanter Proteine nutzt das menschliche Darmbakterium *Escherichia coli*. Das gängigste System nutzt dabei rekombinante Plasmide, in die unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors (z. B. des Lac-Promotors) das gewünschte Gen eingebracht werden kann. Um stabile Zelllinien zu erhalten und das Überleben von Zellen zu verhindern, die kein rekombinantes Plasmid enthalten, vermitteln die am häufigsten benutzten Plasmidvektoren Antibiotikaresistenzen, den Erhalt einer stabilen Zelllinie durch permanente Selektion ermöglichen.

Im Laufe der Zeit wurden verschiedene *E. coli* Stämme etabliert, die verschiedenste genetische Veränderungen aufweisen. Besonders hervorzuheben ist der Stamm BL21^{RIPL}, der zur Expression der TEV-Protease genutzt wurde. Zur Expression dieses Proteins ist der Stamm BL21^{RIPL} besonders gut geeignet. Der Stamm BL21 ist proteasedefizient und ermöglicht so eine Expression mit minimierter gleichzeitiger Proteolyse.

Außerdem können Bakterien bestimmte eukaryotische Codons der vier Aminosäuren Arginin (R), Isoleucin (I), Prolin (P) und Leucin (L) nur schlecht ablesen, da die zugehörigen tRNAs unterrepräsentiert sind. Insbesondere handelt es sich hier um die Arg Codons AGA, AGG, CGG, CGA, das Ile Codon AUA, das Leu Codon CUA, das Gly Codon GGA und Pro Codon CCC. Die Eigenschaft „RIPL“ steht für die künstliche Addition dieser tRNAs auf einem zusätzlichen Plasmid, das außerdem noch eine Chlormaphenicolresistenz trägt.

6.2.3.1.1 Proteinexpression in *E. coli* BL21(DE)^{RIPL}

- 100 ml Bakterienkultur in 900 ml LB Medium mit 50 mg/l Ampicillin geben, im Schüttler bei 37°C und 180 rpm inkubieren, halbstündlich Probe im Photometer überprüfen, bis die OD600 zwischen 0,5 und 0,6 liegt
- Induktion der Expression durch Zugabe von 0,1 mM IPTG
- Weitere 3 h im Schüttler bei 37°C und 180 rpm inkubiert
- Zentrifugieren bei 3500 rpm, 15 min, 4°C
- Überstand verwerfen, Pellets in je 10 ml PBS resuspendieren
- Zentrifugieren bei 3500 rpm, 30 min, 4°C
- Bakterienpellets in flüssigem Stickstoff schockgefrieren oder direkte Herstellung von Solubilisaten

6.2.3.1.2 Herstellung von Solubilisaten nach Proteinexpression in *E. coli*

Alle Reinigungsschritte erfolgen bei 4°C.

1. Pellets je in 10 ml PBS resuspendieren

2. Zellsuspension mit 1 mM PMSF, 10 µg/µl Leupeptin, 0,5 % Triton und 1 mM DTT versetzen
3. 5 × 5 Sekunden bei 70 W auf Eis sonifizieren (Intervall 0,5, 80 %)
4. Bei 10.000x g für 15 min bei 4°C zentrifugieren
5. Zelltrümmer und unlösliche Bestandteile im Pellet verwerfen und das Solubilisat über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie (6.4.2) aufreinigen.

6.2.4 Chromatographische Reinigung

6.2.4.1 Glutathion-Sepharose Affinitätschromatographie

Bei der Affinitätschromatographie, basierend auf dem Prinzip von Smith und Johnson (1988) wird ein Ligand, an den das Zielprotein mit hoher Affinität bindet, auf einer Matrix immobilisiert.

Glutathion-S-Transferase (GST) ist ein 26 kDa großes Protein aus dem Helminthen *Schistosoma japonicum*. GST bindet hochaffin an Glutathion (γ-Glu-Cys-Gly). Stellt man Fusionsproteine aus GST und dem zu reinigenden Zielprotein her, so kann das Fusionsprotein über Affinitätschromatographie gereinigt werden. Dabei wird an Sepharose immobilisiertes Glutathion als Affinitätsmatrix verwendet. Das zu reinigende Fusionsprotein kann anschließend durch Konkurrenz mit Glutathion im Elutionspuffer von der immobilisierten Glutathionmatrix eluiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses System zur Reinigung aller benutzter Kinasen verwendet.

Herstellung der Affinitätssäule

- Leere Säule (geeignet: benutzte NucleoBond-Säule) und Teflon-Einlage mit MQ und Ethanol spülen
- Doppeltes Zielvolumen in die Säule einfüllen
- Mit 20-fachem Säulenvolumen PBS spülen
- Auslauf schließen, Säule mit etwas PBS stehen lassen (Matrix darf nie trocken laufen)

Proteinreinigung bei 4°C

- Säule mit 10-fachem Säulenvolumen PBS äquilibrieren
- Solubilisate auf die Säule geben, Flussrate 0,5-1 ml/min; je 40 µl von Überstand und Durchlauf zur Dokumentation in Reaktionsgefäßen auffangen
- Säule mit 3x mit 10-fachem Säulenvolumen PBS waschen, Flussrate 2 ml/min; 40 µl Durchlauf zur Dokumentation in Reaktionsgefäßen auffangen
- Säule mit 1-fachem Säulenvolumen 1 M NaCl 50 mM Tris / HCl pH 7,5 waschen, Flussrate 2 ml/min; 40 µl Durchlauf zur Dokumentation in Reaktionsgefäß auffangen
- Säule mit 10-fachem Säulenvolumen PBS waschen (alternativ 50 mM Tris / HCl pH 7,5), Flussrate 2 ml/min; 40 µl Durchlauf zur Dokumentation in Reaktionsgefäß auffangen
- Säule 5x mit 1 ml Elutionspuffer eluieren (umrühren, für 1 min stoppen), und mit SPOT-Test die Proteinkonzentration bestimmen, die Fraktionen mit höchster Konzentration vereinigen
- Säule 3x abwechselnd mit je 15 ml Regenerationspuffer 1 und Regenerationspuffer 2 regenerieren
- Säule in 20 % Ethanol lagern (alternativ 50 mM Tris / HCl pH 7,5)

Die vereinigten Eluate werden durch Ultrafiltration (6.5) von Glutathion frei gewaschen (c[Glutathion] < 1 mM) und durch Anpassung des Volumens auf die gewünschte

Proteinkonzentration eingestellt. Abschließend wird die Proteinkonzentration über Spot-Test (6.6.1) bestimmt und SDS-PAGE (6.6.3) zur Kontrolle durchgeführt.

Eingeengtes Protein in flüssigem Stickstoff schockgefrieren (in je. 20-1000 µl Fraktionen) und bei -80°C lagern.

6.2.4.2 Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie

Fusionsproteine mit poly-Histidin-Resten lassen sich mit Hilfe der Ni-NTA-Affinitätschromatographie reinigen. Die Histidinreste können mit zweiwertigen Kationen wie Ni^{2+} , Fe^{2+} und Cu^{2+} komplexieren. In der Ni-NTA-Chromatographie sind zweiwertige Ni-Ionen über vier ihrer sechs Bindungsstellen an NTA (Nitrilotriessigsäure), einem vierzähligen Liganden, der an der Agarose-Matrix gekoppelt ist, gebunden. Histidinreste der rekombinanten Proteine können über ihre Imidazolringe an die beiden verbleibenden Bindungsstellen des Ni-Ions 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 durch Konkurrenz mit Histidin verwendet werden. Bei Imidazolkonzentrationen von 100-250 mM dissoziieren 6xHis-Proteine, da sie nicht länger mit Imidazol konkurrieren 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 ein positives Ammoniumion entsteht, das vom positiv geladenen Ni-Ion abgestoßen wird. Zur Verminderung der Bindung nicht getagter histidinhaltiger Backgroundproteine im Zelllysat ist eine geringe Zugabe von Salzen (z. B. 150 mM NaCl) oder Imidazol (10-50 mM) bereits für die Adsorption und Waschprozeduren empfehlenswert. Ebenso kann bei den Waschschritten der pH-Wert bis auf pH 6,0 reduziert werden.

Herstellung der Affinitätssäule

- Leere Säule (geeignet: benutzte NucleoBond-Säule) und Teflon-Einlage mit MQ und Ethanol spülen
- Doppeltes Zielvolumen Ni-NTA-Matrix in die Säule einfüllen
- Säule mit 10-fachem Säulenvolumen His-Lysispuffer äquilibrieren

Proteinreinigung

- Solubilisat auf die Säule geben, Flussrate 0,5 ml/min; je 40 µl von Überstand und Durchlauf zur Dokumentation in Reaktionsgefäßen auffangen
- Säule mit 10-fachem Säulenvolumen mit His-Waschpuffer B waschen; je 40 µl von Durchlauf zur Dokumentation in Reaktionsgefäß auffangen
- Säule 5x mit 1 ml Elutionspuffer eluieren (umrühren, für 1 min stoppen), und mit SPOT-Test die Proteinkonzentration bestimmen, die Fraktionen mit höchster Konzentration vereinigen
- Säule mit abwechselnd 25 ml Puffer C und A regenerieren
- Säule in 20 % Ethanol lagern

Im Fall der Hybridreinigung wurde die Elution in Stufen mit steigender Imidazolkonzentration durchgeführt.

6.2.4.3 Konzentrierung der gereinigten Proteine mittels Ultrafiltration

Konzentrierung von GST-Kinasen

- Konzentrationsbestimmung mittels Spot-Test zur Bestimmung der Ausgangskonzentration
- Amicon®Ultra 15 Mikrokonzentration (30 kDa) mit 50 mM Tris / HCl füllen; Zentrifugation bei 2500-3000 rpm und 4°C für ca. 10 min
- Vereinigte Eluate zugeben und Zentrifugation bei 2700-3000 rpm bei 4°C
- Mit Puffer auffüllen und dabei die verbliebene Proteinlösung vorsichtig über die Membranen auf und ab pipettieren, um Proteine vom Filter vollständig abzulösen. Erneut zentrifugieren; diesen Waschvorgang wiederholen bis die gewünschte Verdünnung von Glutathion von unter 1 mM erreicht ist

Das Zielvolumen bestimmt sich nach der gewünschten Proteinkonzentration. Diese sollte nicht unter 1 µg/ µl liegen, da stark verdünnte Proteine leicht instabil werden können

- Spot-Test zur Bestimmung der Proteinkonzentration durchführen
- Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefrieren und bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung lagern

Konzentrierung von monomeren Kinasen aus TEV-Proteolyse

- Konzentrationsbestimmung mittels Spot-Test zur Bestimmung der Ausgangskonzentration
- Amicon®Ultra 4 Mikrokonzentration (30 kDa) mit 50 mM Tris / HCl füllen; Zentrifugation bei 3200 rpm und 4°C für ca. 10 min
- Vereinigte Eluate zugeben und Zentrifugation bei 3200 rpm bei 4°C bis auf 400-600 µl
- Aliquots bei -22°C lagern

6.2.5 Charakterisierung von Proteinkonzentration und –Identität

6.2.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Minamide und Bamburg (1990)

1 µl der Proteinlösung, deren Konzentration zu bestimmen ist, sowie jeweils 1 µl von BSA-Lösungen einer Eichreihe (0,1-5 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 und anschließend in *Destain* entfärbt, so dass keine unspezifische Hintergrundfärbung sichtbar bleibt. Höhere Konzentration der zu untersuchenden Proteinlösung führen zu einer intensiveren Blaufärbung an dem entsprechenden Auftragsort. Die Konzentration wird durch Vergleich mit den Farbintensitäten der Eichreihe abgeschätzt.

6.2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976)

Die Proteinkonzentration wird bei dieser Methode photometrisch bei einer Analysenwellenlänge von $\lambda=595$ nm gemessen, wobei als Referenzwellenlänge zusätzlich bei

470 oder 650 nm nochmals gemessen wird. Dazu werden 100 µl der Proteinlösung unbekannter Konzentration und jeweils 100 µl von BSA-Eichlösungen (10^{-3} bis $5 \cdot 10^{-2}$ µg/µl) mit jeweils 100 µl Bradford-Färbereagenz in einer Mikrotiterplatte für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wird in einem „*Microplate Reader*“ die Absorption des Komplexes aus Protein und Färbereagenz bestimmt. Mithilfe der BSA-Eichgrade kann die Konzentration der zu analysierenden Proteinprobe ermittelt werden.

6.2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; Laemmli, 1970)

Lösungen von Proteinen können mittels SDS-PAGE aufgetrennt werden. Dazu werden die Proteine zunächst nach Zugabe des anionischen amphiphilen Detergens SDS und DTT, zur Reduktion inter-molekularer Disulfidbrücken, bei 95°C für 5 min denaturiert. SDS lagert sich stöchiometrisch an die Proteine an (1,4 g SDS/ 1 g Protein, d. h. 1 Molekül SDS/ 2-3 Aminosäuren). Aminosäureanzahl und negative Ladung sind daher proportional. Anschließend werden die denaturierten Proteine durch Anlegen einer Spannung in einem Polyacrylamidgel 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. 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. Das führt dazu, dass mittels SDS-PAGE nur ein apparentes Molekulargewicht bestimmt werden kann.

Die Zusammensetzung der im Rahmen dieser Arbeit benutzten Gele für SDS-PAGE ist Tabelle 6.2 und 6.3 zu entnehmen. Der Trennbereich eines 12%-igen Trenngels erstreckt sich von 14-200 kDa. Die Polymerisation der Gellösungen erfolgt durch Zugabe von 12,5 µl 40 % (w/v) APS (Polymerisationsinitiator) und 10 µl TEMED (Radikalkettenstarter) zu je 10 ml Sammelgellösung, bzw. 10,4 µl 40% (w/v) APS und 4,4 µl TEMED zu 10 ml Trenngellösung.

Trenngel (10 ml)	10 % [ml]	12 % [ml]
40 % Acrylamid (100:2,7)	2,50	3,00
3 M Tris-HCl, pH 8,8	1,85	1,85
20 % SDS	0,05	0,05
60% D(+)-Saccharose	1,15	1,15
MQ	4,45	3,95

Tabelle 6.2: Zusammensetzung der verschiedenen Trenngele

Sammelgel (10 ml)	4 % [ml]	6 % [ml]
40 % Acrylamid (100:2,7)	1,00	1,50
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	2,50	2,50
20 % SDS	0,05	0,05
MQ	6,45	5,95

Tabelle 6.3: Zusammensetzung der verschiedenen Sammelgele

6.2.5.4 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE)

Die nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE) ermöglicht die Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Größe und Ladung. Durch negative Ladungen erhöht sich die Laufstrecke des Proteins im Gel. Da Phosphorylgruppen bei physiologischen pH-Werten negative Ladungen tragen, erlaubt diese Methode eine Trennung verschieden stark phosphorylierter Proteine. Die Phosphorylierungsansätze werden in 4x nativem Probenpuffer aufgenommen, wodurch die Phosphorylierungsreaktion abgestoppt wird. Die Durchführung erfolgt ähnlich wie die SDS-PAGE. Unterschiede bestehen im Fehlen eines Detergens wie SDS, zusätzlich wird die Elektrophorese im gekühlten System bei 4°C durchgeführt. Die Auftrennung erfolgt mit 150 mV (konstant) für ein Gel und genau so mit 150 mV für zwei Gele. Nach erfolgter Trennung wird das Gel durch Peptidfärbelösung angefärbt. Die Zusammensetzung der nativen PAGE ist Tabelle 6.4 zu entnehmen. Die Polymerisation der Gellösungen erfolgt durch Zugabe von 12,5 µl 40 % (w/v) APS (Polymerisationsinitiator) und 10 µl TEMED (Radikalkettenstarter) zu je 10 ml Sammelgellösung, bzw. 10,4 µl 40% (w/v) APS und 4,4 µl TEMED zu 10 ml Trenngellösung.

Substanz	Trenngel (8,5 %, 10 ml)	Sammelgel (5 %, 10 ml)
40 % Acrylamid (100:2,7)	2,1 ml	1,2 ml
3 M Tris-HCl, pH 8,8	1,95 ml	-
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	-	2,5 ml
60 % D(+)-Saccharose	1,15 ml	-
MQ	4,9 ml	6,3 ml

Tabelle 6.4: Zusammensetzung der Gele für die native PAGE

6.2.5.5 Färbung von Proteinen in SDS-PAGE-Gelen und nativen Gelen nach Blakesley und Boezi (1977)

Polyacrylamidgele (6.6.3-6.6.4) werden über Nacht in kolloidaler Peptid-Färbelösung (5.9) geschwenkt. So werden die enthaltenen Proteine durch Serva Blue G250 angefärbt. Durch Waschen des gefärbten Gels in Wasser wird unspezifisch in das Gel eingelagerter Farbstoff entfernt, so dass sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abheben. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei etwa 0,1 µg Protein pro Bande.

6.2.5.6 Reversible Färbung durch Western Blot immobilisierter Proteine (Ponceau-Färbung)

Zum Nachweis der erfolgreichen Immobilisierung von Proteinen nach *Western Blot* können die immobilisierten Proteine reversibel mit dem kolloidalen Farbstoff PonceauS angefärbt werden. Um einen immunologischen Nachweis anschließen zu können, ist die Reversibilität der Färbung essenziell und stellt den entscheidenden Vorteil gegenüber der Coomassie-Färbung (6.6.5) dar. Die Ponceau-Färbung ist allerdings empfindlich gegenüber Detergenzien wie SDS.

Vor Färbung der Membran muss diese daher gegebenenfalls von Detergenzien befreit werden. Dazu wird die Membran kurz in Methanol und in MQ geschwenkt und umgehend in PonceauS-Färbelösung überführt. Die angefärbten Banden werden erst während der Entfärbung der Membran in MQ sichtbar, da der Farbstoff von Proteinen langsamer

abgewaschen wird als der unspezifisch auf der Membran befindliche Farbstoff. Nach Entfärbung des Membranhintergrunds wurde die Membran zügig gescannt, da die abgefärbten Proteinbanden in MQ sonst ebenfalls wieder entfärbt würden.

6.2.6 Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Blot

Der *Western Blot* ist eine Methode um immobilisierte Proteine mit spezifischen Antikörpern nachweisen zu können. Die Proteine werden zunächst per PAGE (6.6.3-6.6.4) aufgetrennt und anschließend auf eine Membran transferiert, die mit einem Antikörper, der spezifisch an das gesuchte Protein bindet, inkubiert wird. Die Proteinbande wird sichtbar gemacht, indem die Membran mit einem sekundären Antikörper inkubiert wird, der spezifisch an ein Epitop des primären Antikörpers bindet. Der sekundäre Antikörper ist kovalent mit einem Enzym (hier: alkalische Phosphatase) konjugiert, das ein geeignetes Substrat (hier: BCIP, NBT) so umsetzt, dass ein schwer löslicher Farbstoff entsteht, der auf der Membran ausfällt und so die Position der Proteinbande sichtbar macht.

6.2.6.1 Elektroblot

- 1.1 Die PVDF-Membran wird auf die Größe des Gels zugeschnitten, kurz in Methanol aktiviert und anschließend gewässert, wodurch sie hydrophob wird, und in Blotpuffer getränkt
- 1.2 Auf die Anodenplatte des Blotapparates werden übereinander 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.
- 1.3 Blot mit ~2 mA pro cm² Gel für 20 min blotten
- 1.4 Es folgt die Entwicklung der Membran nach 6.6.9

6.2.6.2 Wet-Blot

Blot wird in der Vertikalen in Wet-Blottpuffer durchgeführt. Vorteil: Protein wird komplett auf die Membran übertragen. Aufbau des Schlittens (in Draufsicht):

- Schwamm (an Kathode)
- 2× Munktell-Filter

1. SDS-Gel
2. PVDF-Membran
3. 2× Munktell-Filter
4. Schwamm (an Anode)

Schlitten in die Wet-Blot-Kammer (BioRad) einsetzen. 30 mA, über Nacht, 4°C.

6.2.6.3 Entwicklung von Western Blots bei Verwendung der alkalischen Phosphatase

Alle verwendeten Antikörper wurden jeweils zu Arbeitslösungen mit einem Volumen von 10 ml in 1 % BSA in PBS verdünnt (Ausnahme α-Phosphotyrosin: 5 % BSA und 0,1 % Tween-20). Zur Verhinderung von Bakterienwachstum und zur Steigerung der Lagerfähigkeit

wurden 0,02 % (w/v) NaN_3 zugesetzt. Die Antikörperlösungen wurden bei 4°C gelagert und mehrfach verwendet.

Antikörper	Verdünnung
α -GST-Exon20 (rabbit)	1:1000
α -GST (rabbit)	1:2000
α Hexahistidin	1:1000
α -Phosphotyrosin (mouse)	1:2000
α -mouse-AP	1:3000
α -rabbit-AP	1:3000

Tabelle 6.5: Übersicht der verwendeten Antikörper

[Alle Antikörper wurden in PBS mit 1 % (w/v) BSA und 0,02 % (w/v) NaN_3 gelöst und mit der Membran für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert; der jeweilige Spenderorganismus der Antikörper ist in Klammern angegeben, AP: Alkalische Phosphatase]

1. Nach dem Blot wird das Gel in kolloidale Peptidfärbelösung eingelegt (6.6.5), um die Vollständigkeit der Proteinübertragung abschätzen zu können. Je nach Bedarf können die auf der Membran immobilisierten Proteine über eine reversible Proteinfärbung nachgewiesen werden. Die Membran wird anschließend in ein 50-ml-Reaktionsgefäß überführt (Proteinseite zur Lösung) und auf dem Rollschüttler für mindestens 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in 1 % BSA/PBS inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen für den primären Antikörper abzublocken.
2. Mehrfaches Waschen der Membran mit 1x TBS/Tween
3. Inkubation mit dem primären Antikörper für 1 h bei RT
4. Waschen der Membran mit TBS/Tween für 5x 5 min
5. Inkubation mit sekundärem Antikörper/Alkalische Phosphatase für 1 h bei RT
6. Waschen der Membran mit TBS/Tween für 5x 5 min
7. Für die Entwicklung in eine Schale 10 ml des Entwicklungspuffer mit 66 μl NBT und 33 μl BCIP geben und den Blot hineinlegen, bis Banden sichtbar werden
8. Die Färbereaktion wird in mit 2 % (v/v) Essigsäure versetztem Wasser abgestoppt
9. Der Blot ist lichtempfindlich und wird daher in Alufolie aufbewahrt

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

6.2.7 Trocknung von Polyacrylamidgelen

Je nach gewünschter Anwendung ist es nötig, Polyacrylamidgele nach der Elektrophorese zu trocknen. In der vorliegenden Arbeit war dies zur Durchführung von Autoradiographien oder zur anschließenden Phosphoaminosäureanalyse nötig.

Zunächst wurde ein der dreifachen Gelgröße entsprechendes Stück Einmachhaut kurz in MQ gewässert. Das Gel wurde anschließend beidseitig und ohne Lufteinschlüsse mit Einmachhaut bedeckt. Die eigentliche Trocknung erfolgte unter Vakuum für 40 min bei 80°C und anschließend für mindestens 20 min bei RT.

Zu Verhinderung von Rissen kann das Gel zuvor alternativ für 5-10 min in MQ mit ca. 0,5 % Glycerol gewässert werden.

6.2.8 Densitometrische Analyse von Proteinmengen in Polyacrylamidgelen

Als Densitometrie bezeichnet man die quantitative Messung der Farbdichte pro Flächeneinheit. Diese Technik wurde genutzt, um die Farbdichte von gefärbten Proteinbanden in Polyacrylamidgelen zu bestimmen. Die Proteine im zu untersuchenden Gel wurden jeweils über Nacht in kolloidaler Proteinfärbelösung geschwenkt und anschließend mit MQ gewässert, um nicht proteingebundenen Farbstoff aus dem Gel auszuwaschen. Die digitalen Bilder der Gele (BioRad Gel Camera) wurden densitometrisch ausgewertet.

6.2.9 Substratphosphorylierung

Als Substratphosphorylierung bezeichnet man im Gegensatz zur Autophosphorylierung den durch eine Kinase katalysierten Phosphattransfer auf ein Substrat. In der Vorliegenden Arbeit wurde die Substratphosphorylierung durch dimere und monomere Konstrukte der IRKD, der IRKDACT sowie die zugehörigen Lebend-Tot-Hybriden untersucht. Als Substrate dienten hierfür Tyrtide und PolyGlyTyr. Die Analyse der Substratphosphorylierung gab Hinweise über die Aktivität der jeweiligen Kinasen und Hybride.

Tyrtide ist ein 85 Aminosäuren langes Fragment des Insulinrezeptorsubstrats 1 (IRS-1), das als Fusionsprotein mit einem carboxyterminalem Hexahistidintag exprimiert wurde. Es verfügt über eine Phosphotyrosinbindedomäne (PTB) mit der Sequenz YMXM, die von Tyrosinkinase gut phosphoryliert wird. Das in diesem Motiv liegende Tyrosin ist die einzige Phosphorylierungsstelle dieses Substrats. Der Phosphoryltransfer auf tyrtide gibt Aufschluss über die Aktivität der jeweils untersuchten Kinase.

Bei PolyGlyTyr handelt es sich um ein artifizielles Substrat, das aus repetitiven Sequenzen von Glutaminsäure und Tyrosin im Verhältnis 4:1 besteht. Im Gegensatz zu Tyrtide weist PolyGlyTyr multiple Tyrosinphosphorylierungsstellen auf, die aufgrund der saueren Umgebung durch Tyrosinkinase gut phosphoryliert werden.

Die Substratphosphorylierung wurde zeitabhängig untersucht. Die Reaktionen fanden unter Standardbedingungen (1 mM ATP; 30 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 5 mM Tris-HCl, pH7,5) statt. Alle Reaktionen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Phosphorylierungsreaktion wurde durch den entsprechenden Probenpuffer terminiert. Dies wurde entweder durch darin enthaltenes EDTA zur Komplexbildung von zweiwertigen Kationen (native PAGE) oder durch Harnstoff (Harnstoff-PAGE) erreicht. Bis zur elektrophoretischen Analyse der Proben wurden diese auf Eis gelagert.

6.2.9.1 Bestimmung des Phosphateinbaus

Zur Bestimmung der inkorporierten Radioaktivität nach Substratphosphorylierungsreaktionen wurde die Radioaktivität des inkorporierten radioaktiven Phosphates durch Messung der Cherenkov-Strahlung im Tritium-(³H) Fenster des β -Szintillationszählers ermittelt und ins Verhältnis zur eingesetzten Stoffmenge an Protein gesetzt.

SDS-PAGE

Nach erfolgter Phosphorylierung wird die Reaktion mit SDS-Probenpuffer gestoppt, die Proben werden bei 95 °C für 5 min denaturiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

Anschließend wird das Gel mit Peptidfärbelösung gefärbt und in MQ gewässert, bevor es getrocknet wird. Mit dem so präparierten Gel wird eine Autoradiographie durchgeführt. Der entwickelte Film dient zur Identifizierung der Bereiche im Gel, in denen sich radioaktiv

markierte Proteine befinden. Die entsprechenden Bereiche werden ausgeschnitten und die Radioaktivität nach Cherenkov gemessen.

Autoradiographie

Die Methode der Autoradiographie beruht auf durch β -Strahlung hervorgerufene Bildung von Silberkeimen in einer photographischen 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 BIOMAX™ MS-Filmen in einer Röntgenkassette mit Verstärkerfolie für 1h bei -20°C . Die bestrahlten Filme werden in GBX-Developer bis zu 5 min entwickelt, kurz gewässert und für 1 min in GBX-Fixer fixiert (bis die Filmfolie klar wird). Nach kurzer Wässerung kann das Autoradiogramm bei RT getrocknet werden.

Phosphozellulose Paper-Assay

Nach erfolgter Phosphorylierung wird die Reaktion mit 50mM EDTA gestoppt und 2mal $6\mu\text{l}$ der Probe auf ein Phosphozellulose-Papier aufgetropft. Nach dem Eintrocknen der Proben wird das Papier 5 mal 5 Minuten mit 0,5% ortho-Phosphorsäure und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wird das Phosphozellulosepapier auf den Phosphoimager untersucht. Die Radioaktiven bereiche werden ausgeschnitten und die Radioaktivität nach Cherenkov bestimmt.

6.2.10 Phosphoaminosäure- und Nukleotidanalyse

6.2.10.1 Tryptische Spaltung von Proteinen im SDS-Gel

Mit Hilfe dieser Methode werden Proteine im SDS-Gel tryptisch verdaut und aus dem Gelstück eluiert (Rosenfeld *et al.* 1992; Al-Hasani, 1995). Die so eluierten Peptide können anschließend einer Phosphoaminosäurenanalyse (PASA) unterzogen werden.

1. Phosphorylierungsansatz elektrophoretisch auftrennen, Gel trocknen und Autoradiographie durchführen
2. Banden aus dem Gel ausschneiden, wobei der Autoradiografiefilm als Vorlage dient
3. Messung der Cherenkov-Strahlung
4. Gelstücke in $500\mu\text{l}$ MQ wässern, Folie entfernen
5. MQ durch $500\mu\text{l}$ Acetonitril ersetzen, 15 min einwirken lassen bis die Gelstücke eine milchig-trübe Färbung erlangen
6. Acetonitril abnehmen, Gelstücke an der Luft trocknen lassen
7. Zugabe von $10\mu\text{l}$ Trypsin-Lösung (1 mg Trypsin in 1 ml Ammoniumcarbonat-Lösung) und $50\mu\text{l}$ 50mM Ammoniumcarbonat-Lösung, 30 min bei 35°C schütteln
8. Zugabe von $5\mu\text{l}$ Trypsin-Lösung und $300\mu\text{l}$ Ammoniumcarbonat-Lösung,
9. Bei 35°C schütteln über Nacht
10. Zentrifugation in Tischzentrifuge, Überstand abnehmen und über Speed-Vac lyophilisieren

11. Messung der Cherenkov-Strahlung
12. 300µl MQ auf das Gelstück geben, 1h bei 42 °C schütteln
13. Abzentrifugieren, Überstand wieder abnehmen, zum ersteren dazugeben und lyophilisieren
14. Messung der Cherenkov-Strahlung des Lyophilisats (mindestens 85 % der 1. Messung des Gelstücks); Lagerung jetzt bei -20 °C möglich
15. Saure Hydrolyse mit Lyophilisat durchführen: Inkubation mit 200 µl (je nach Größe des Rückstandes) 6 N HCl bei 110 °C für 2 h
16. Proben zügig auf Eis abkühlen und über Speed-Vac trocknen
17. 2x mit 30 µl MQ waschen und ebenfalls trocknen
18. Messung der Cherenkov-Strahlung und Lagerung bei -20°C

6.2.10.2 HPLC-Analyse tryptischer Peptide (Phosphopeptidkartierung)

Durch tryptische Proteolyse lassen sich aus der cytoplasmatischen phosphorylierten Domäne der löslichen Insulinrezeptorkinase IRKD-HIS Phosphopeptide generieren, die sich durch HPLC-Anionenaustausch-Chromatographie voneinander trennen lassen (Al-Hasani *et al.* 1997). Die Auftrennung des Phosphopeptid-Gemisches durch HPLC-Anionenaustausch-Chromatographie (Trennsäule: Nucleogel SAX1000-8/46, 50 x 4,6 mm) mit einem zweistufigen Salzgradient führt zur Separation von 29 Radioaktivität enthaltenden Fraktionen. Die Sequenz der darin enthaltenen Phosphopeptide konnte Al-Hasani durch direkte Edman-Sequenzierung ermitteln. Somit ist es möglich, jedem einzelnen Elutionspeak im Chromatogramm die entsprechende Aminosäuresequenz und Phosphorylierungsstelle der IRKD-HIS zuzuordnen. Der Vergleich dieses Elutionsprofils mit den korrespondierenden Profilen der IRKD und des aus Humanplazenta gereinigten Insulinrezeptors zeigte, dass die Autophosphorylierungsreaktionen dieser Enzyme in der identischen Besetzung der Autophosphorylierungsstellen resultiert (Tennagels 1995, Magg 1997). Das von Al-Hasani standardisierte Protokoll erlaubt demnach die Analyse des Phosphorylierungsstatus der einzelnen Phosphorylierungsstellen im Enzym. Für die Phosphopeptid-Kartierung wurden Autophosphorylierungsreaktionen des „Lebend-/Tot-Hybrids“, des „GST-Hybrids“ und weiterer Kinasen durchgeführt. Nach der Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE wurde das Gel getrocknet, die Proteinbande durch Autoradiographie lokalisiert und ausgeschnitten. Das Gelstück wurde durch tryptische Spaltung eluiert (9.2.9.1) und die HPLC-Analyse durchgeführt. Die Probe sollte wenigstens 10000 cpm enthalten und ein Volumen von 700 µl nicht überschreiten.

Laufpuffer: Puffer A: 20 mM Ammoniumacetat, pH 7,0
 Puffer B: 1 M Kaliumphosphat, pH 4,0

- Tryptisches Eluat mit Puffer A auf 1 ml auffüllen und bei 10000 ´ g für 5 min zentrifugieren
- Säule mit 10 ml Puffer A äquilibrieren
- Säule mit Probe beladen, Flußrate: 0,5 ml/min
- dreistufigen linearen Gradienten anlegen: 0-50 % B in 120 ml, Flußrate 0,5 ml/min
 0-10 min: 0 % B, 10-50 min: 10 % B, 50-125 min: 50 % B

- Fraktionen von 0,5 ml sammeln, Radioaktivität durch Messung der Cerenkov-Strahlung ermitteln

6.2.11 Phosphoaminosäureanalyse über Eindimensionale Elektrophorese auf Zellulose (Boyle et al. 1991)

- Lyophilisate werden in MQ aufgenommen, so dass man etwa 500 cpm pro μl erhält. 0,5 μl (250 cpm) auf DC-Zellulose-Membran auftragen und mit 0,4 μl (DNP-Lysin) Farbstoff versehen. Zudem wird zur Kontrolle der Auftrennung ein Phosphoaminosäurestandard (0,5 μl) bestehend aus Phosphotyrosin, Phosphoserin und Phosphothreonin mit aufgetragen.
- Die 1D-Elektrophorese läuft konstant bei 1000 V für 25-30 min. Die Stromstärke sollte zwischen 8 und 15 mA liegen. Der Laufpuffer ist ein Ameisensäure-Eisessigsäure-MQ Gemisch.
- Nach dem Ende der Elektrophorese wird die Membran mit einer Ninhydrinlösung besprüht und anschließend im Trockenschrank bei 80°C für 5 Minuten getrocknet. Ninhydrin färbt Aminosäuren und macht so den Phosphoaminosäurestandard sichtbar.
- Zur Auswertung wird die Membran mindestens über Nacht auf eine Detektionsplatte des Phosphoimagers aufgelegt und anschließend analysiert.

Die Reihenfolge der Auftrennung bei einer 1D-Elektrophorese vom Auftrag ausgegangen: Peptidgemisch, Phosphotyrosin, Phosphoserin/-threonin und freies P_i .

6.2.11.1 Phospho-Imager-Auswertung

Radioaktive Signale auf Membranen, in Gelen oder auf HPTLC-Platten 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 Literaturverzeichnis

Ablooglu, A., & Kohanski, R. Activation of the Insulin Receptor's Kinase Domain Changes the Rate-Determining Step of Substrate Phosphorylation. *Biochemistry*, 2001, 40(2), 504-513.

Adams, J. A., McGlone, M. L., Gibson, R., & Taylor, S. S. Phosphorylation modulates catalytic function and regulation in the cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry* 1995, 34(8), 2447-54.

Al-Hasani H „Die Insulinrezeptorkinase: Biochemische Untersuchungen an einem rekombinanten Enzym.“ Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität zu Köln (1995)

Al-Hasani, H, B Eisermann, N Tennagels, u. a. Identification of Ser-1275 and Ser-1309 as autophosphorylation sites of the insulin receptor. *FEBS Letters* 400, no. 1 1997(Januar 2): 65-70.

Al-Hasani H, Passlack W, Klein HW. „Phosphoryl exchange is involved in the mechanism of the insulin receptor kinase.“ *FEBS Lett.* 1994 Jul 25;349(1):17-22.

Allison, R D, J A Todhunter, und D L Purich. Steady State and equilibrium exchange kinetic studies of the sheep brain glutamine synthetase reaction. *The Journal of Biological Chemistry* 252, 1977.no. 17 (September 10): 6046-51. doi: 19464.

Argetsinger, L S, und J A Shafer. The reversible and irreversible autophosphorylations of insulin receptor kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 267, 1992 no. 31 (November 5): 22095-101.

Baer K, Al-Hasani H, Parvaresh S, Corona T, Rufer A, Nölle V, Bergschneider E, Klein H.W. “Dimerization-induced activation of soluble insulin/IGF-1 receptor kinases: an alternative mechanism of activation.” *Biochemistry*. 2001 Nov 27;40(47):14268-78.

Baer K, Lisinski I, Gompert M, Stuhlmann D, Schmolz K, Klein HW, Al-Hasani H. Activation of a GST-tagged AKT2/PKBbeta. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Oct 10;1725(3):340-7.

Baxter RM, Secrist JP, Vaillancourt RR, Kazlauskas A. Full activation of the platelet-derived growth factor beta-receptor kinase involves multiple events. *J Biol Chem*. 1998 Jul 3;273(27):17050-5.

Bossemeyer D, Engh RA, Kinzel V, Ponstingl H, Huber R. „Phosphotransferase and substrate binding mechanism of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit from porcine heart as deduced from the 2.0 Å structure of the complex with Mn²⁺ adenylyl imidodiphosphate and inhibitor peptide PKI(5-24).“ *EMBO J.* 1993 Mar;12(3):849-59.

Burke CL, Stern DF. "Activation of Neu (ErbB-2) mediated by disulfide bond-induced dimerization reveals a receptor tyrosine kinase dimer interface." *Mol Cell Biol.* 1998 Sep;18(9):5371-9.

Boudeau, Jerome, Diego Miranda-Saavedra, Geoffrey J Barton, und Dario R Alessi. Emerging roles of pseudokinases. *Trends in Cell Biology* 16,2006. no. 9 (September): 443-52.

Cann, A.D., und R.A. Kohanski. Cis-Au tophosphoryl ation of Juxtamembrane Tyrosines in the Insulin Receptor Kinase Domain. *Biochemistry* 36,1997. no. 25 (Juni 24): 7681-7689.

Cobb MH, Sang BC, Gonzalez R, Goldsmith E, Ellis L Autophosphorylation activates the soluble cytoplasmic domain of the insulin receptor in an intermolecular reaction" *J Biol Chem.* 1989 Nov 5;264(31):18701-6.

Cohen P. "Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century?" *Nat Rev Drug Discov.* 2002 Apr;1(4):309-15. Review.

Dickens M, Tavaré JM, Clack B, Ellis L, Denton RM. Phosphorylation of tyrosines 1158, 1162 and 1163 on a synthetic dodecapeptide by the insulin receptor protein-tyrosine kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991 Jan 31;174(2):772-8

Dickens M, Tavaré JM. Analysis of the order of autophosphorylation of human insulin receptor tyrosines 1158, 1162 and 1163. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 Jul 15;186(1):244-50.

Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K, Edery M, Graf L, Clauser E, Ou JH, Masiarz F, Kan YW, Goldfine ID, et al. „The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell.*" 1985 Apr;40(4):747-58.

Erickson, S L, K S O'Shea, N Ghaboosi, ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2-and heregulin-deficient mice. *Development (Cambridge, England).*124, 1997 no. 24 (Dezember): 4999-5011.

Favelyukis, S., Till, J. H., Hubbard, S. R., & Miller, W. T. Structure and autoregulation of the insulin-like growth factor 1 receptor kinase. *Nat Struct Mol Biol,* 2001. 8(12), 1058-1063. doi: 10.1038/nsb721

Feener, E P, J M Backer, G L King, u. a. Insulin stimulates serine and tyrosine phosphorylation in the juxtamembrane region of the insulin receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 268, 1993.no. 15 (Mai 25): 11256-64. doi:8496180.

Florke RR, Klein HW, Reinauer H (1990) Structural requirements for signal transduction of the insulin receptor. *Eur J Biochem.* 1990 Jul 31;191(2):473-82.

Frankel M, Ablooglu AJ, Leone JW, Rusinova E, Ross JB, Henrikson RL, Kohanski RA. "Intrasteric inhibition of ATP binding is not required to prevent unregulated autophosphorylation or signaling by the insulin receptor." *Mol Cell Biol.* 2001 Jul;21(13):4197-207.

- Ge G, Wu J, Wang Y, Lin Q.** Activation mechanism of solubilized epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Jan 25;290(3):914-20
- Greenfield C, Hiles I, Waterfield MD, Federwisch M, Wollmer A, Blundell TL, McDonald N.** Epidermal growth factor binding induces a conformational change in the external domain of its receptor. *EMBO J.* 1989 Dec 20;8(13):4115-23.
- Hanks SK, Hunter T.** „Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification.“ *FASEB J.* 1995 May;9(8):576-96. Review.
- Hays JL, Watowich SJ.** Oligomerization-induced modulation of TPR-MET tyrosine kinase activity. *J Biol Chem.* 2003 Jul 25;278(30):27456-63. Epub 2003 Apr 23.
- Hays JL, Watowich SJ.** “Oligomerization-dependent changes in the thermodynamic properties of the TPR-MET receptor tyrosine kinase.” *Biochemistry.* 2004 Aug 17;43(32):10570-8.
- Heidenreich, K, M Paduschek, M Mölders, und H W Klein.** The insulin receptor: a protein kinase with dual specificity? *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 375, 1994. no. 2 (Februar): 99-104.
- Herrera R, Lebwohl D, Garcia de Herreros A, Kallen RG, Rosen OM.** “Synthesis, purification, and characterization of the cytoplasmic domain of the human insulin receptor using a baculovirus expression system.” *J Biol Chem.* 1988 Apr 25;263(12):5560-8.
- Herweg, Jens.** Charakterisierung der Aktivierung einer Rezeptortyrosinkinase. Diplomarbeit, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität zu Köln. 2007
- Hornby JA, Luo JK, Stevens JM, Wallace LA, Kaplan W, Armstrong RN, Dirr HW (2000)** „Equilibrium folding of dimeric class mu glutathione transferases involves a stable monomeric intermediate. *Biochemistry.* 2000 Oct 10;39(40):12336-44.
- Hubbard SR, Wei L, Ellis L, Hendrickson WA** “Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor.” *Nature.* 1994 Dec 22-29;372(6508):746-54.
- Hubbard SR.** “Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog.” *EMBO J.* 1997 Sep 15;16(18):5572-81.
- Hubbard SR, Miller WT.** Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 2007 Apr;19(2):117-23. Epub 2007 Feb 16. Review.
- Huse M, Kuriyan J.** “The conformational plasticity of protein kinases.“ *Cell.* 2002 May 3;109(3):275-82. Review.
- Jiang G, Hunter T.** Receptor signaling: when dimerization is not enough. *Curr Biol.* 1999 Jul 29-Aug 12;9(15):R568-71. Review.
- Johnson, L.N., und R.J. Lewis.** Structural Basis for Control by Phosphorylation. *Chemical Reviews* 2001, no. 8 (August 8): 2209-2242.

- Kaplan W, Hüsler P, Klump H, Erhardt J, Sluis-Cremer N, Dirr H.** Conformational stability of pGEX-expressed *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase: a detoxification enzyme and fusion-protein affinity tag. *Protein Sci.* 1997 Feb;6(2):399-406.
- Kemp BE, Pearson RB, House CM.** Pseudosubstrate-based peptide inhibitors. *Methods Enzymol.* 1991;201:287-304. Review.
- Kemp BE, Barden JA, Kobe B, House C, Parker MW.** Intrasteric regulation of calmodulin dependent protein kinases. *Adv Pharmacol.* 1996;36:221-49. Review.
- Knighton DR, Zheng JH, Ten Eyck LF, Ashford VA, Xuong NH, Taylor SS, Sowadski JM.** Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science.* 1991 Jul 26;253(5018):407-14.
- Kohanski RA.** Insulin receptor autophosphorylation. II. Determination of autophosphorylation sites by chemical sequence analysis and identification of the juxtamembrane sites. *Biochemistry.* 1993 Jun 8;32(22):5773-80.
- Kobe B, Heierhorst J, Kemp BE.** Intrasteric regulation of protein kinases. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.* 1997;31:29-40. Review.
- Kornev AP, Haste NM, Taylor SS, Eyck LF.** Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Nov 21;103(47):17783-8. Epub 2006 Nov 9
- Lammers, R, E Van Obberghen, R Ballotti, J Schiessinger, A Ullrich.** Transphosphorylation as a possible mechanism for insulin and epidermal growth factor receptor activation. *The Journal of Biological Chemistry* 1990.265, no. 28 (Oktober 5): 16886-90.
- Lemmon MA, Schlessinger J.** Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends Biochem Sci.* 1994 Nov;19(11):459-63. Review
- Lemmon MA, Bu Z, Ladbury JE, Zhou M, Pinchasi D, Lax I, Engelman DM, Schlessinger J.** Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer. *EMBO J.* 1997 Jan 15;16(2):281-94.
- Lim K, Ho JX, Keeling K, Gilliland GL, Ji X, Rüker F, Carter DC.** "Three-dimensional structure of *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase fused with a six-amino acid conserved neutralizing epitope of gp41 from HIV." *Protein Sci.* 1994 Dec;3(12):2233-44.
- Livnah O, Krause CD, Johnson DL, Stura EA, Farrell FX, Barbone FP, You Y, Liu KD, Goldsmith MA, He W, Pestka S, Jolliffe LK, Wilson IA.** An antagonist peptide-EPO receptor complex suggests that receptor dimerization is not sufficient for activation. *Nat Struct Biol.* 1998 Nov;5(11):993-1004.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S.** The protein kinase complement of the human genome. *Science.* 2002 Dec 6;298(5600):1912-34. Review.

- Middleton SA, Barbone FP, Johnson DL, Thurmond RL, You Y, McMahon FJ, Jin R, Livnah O, Tullai J, Farrell FX, Goldsmith MA, Wilson IA, Jolliffe LK.** Shared and unique determinants of the erythropoietin (EPO) receptor are important for binding EPO and EPO mimetic peptide. *J Biol Chem.* 1999 May 14;274(20):14163-9.
- Noelle V, Tennagels N, Klein HW.** A single substitution of the insulin receptor kinase inhibits serine autophosphorylation in vitro: evidence for an interaction between the C-terminus and the activation loop. *Biochemistry.* 2000 Jun 20;39(24):7170-7.
- Oliver AW, Knapp S, Pearl LH.** Activation segment exchange: a common mechanism of kinase autophosphorylation? *Trends Biochem Sci.* 2007 Aug;32(8):351-6. Epub 2007 Jul 12.
- Ottensmeyer FP, Beniac DR, Luo RZ, Yip CC.** Mechanism of transmembrane signaling: insulin binding and the insulin receptor. *Biochemistry.* 2000 Oct 10;39(40):12103-12. Review. Erratum in: *Biochemistry* 2001 Jun 12;40(23):6988.
- Parvaresch S, Yesilkaya T, Baer K, Al-Hasani H, Klein HW.** 14-3-3 binding to the IGF-1 receptor is mediated by serine autophosphorylation. *FEBS Lett.* 2002 Dec 18;532(3):357-62.
- Pautsch A, Zoepfel A, Ahorn H, Spevak W, Hauptmann R, Nar H.** Crystal structure of bisphosphorylated IGF-1 receptor kinase: insight into domain movements upon kinase activation. *Structure.* 2001 Oct;9(10):955-65.
- Pearson RB, Wettenthal RE, Means AR, Hartshorne DJ, Kemp BE.** Autoregulation of enzymes by pseudosubstrate prototopes: myosin light chain kinase. *Science.* 1988 Aug 19;241(4868):970-3.
- Pike AC, Rellos P, Niesen FH, Turnbull A, Oliver AW, Parker SA, Turk BE, Pearl LH, Knapp S.** Activation segment dimerization: a mechanism for kinase autophosphorylation of non-consensus sites. *EMBO J.* 2008 Feb 20;27(4):704-14. Epub 2008 Jan 31.
- Posner I, Engel M, Levitzki A.** Kinetic model of the epidermal growth factor (EGF) receptor tyrosine kinase and a possible mechanism of its activation by EGF. *J Biol Chem.* 1992 Oct 15;267(29):20638-47.
- Reynet C, Caron M, Magré J, Cherqui G, Clauser E, Picard J, Capeau J.** Mutation of tyrosine residues 1162 and 1163 of the insulin receptor affects hormone and receptor internalization. *Mol Endocrinol.* 1990 Feb;4(2):304-11
- Rosenfeld J, Capdevielle J, Guillemot JC, Ferrara P.** In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal Biochem.* 1992 May 15;203(1):173-9.
- Rubin GM, Yandell MD, Wortman JR.** Comparative genomics of the eukaryotes. *Science.* 2000 Mar 24;287(5461):2204-15.
- Salton SR.** Teaching resources. Protein phosphatases. *Sci STKE.* 2005 Mar 1;2005(273):tr8.

Schlessinger J. Signal transduction by allosteric receptor oligomerization. *Trends Biochem Sci.* 1988 Nov;13(11):443-7.

Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2000 Oct 13;103(2):211-25. Review.

Sherrill JM. Insufficiency of self-phosphorylation for the activation of epidermal growth factor receptor. *Biochemistry.* 1997 May 13;36(19):5677-84.

Shoelson SE, Boni-Schnetzler M, Pilch PF, Kahn CR. Autophosphorylation within insulin receptor beta-subunits can occur as an intramolecular process. *Biochemistry.* 1991 Aug 6;30(31):7740-6.

Soderling TR. "Protein kinases and phosphatases: regulation by autoinhibitory domains." *Biotechnol Appl Biochem.* 1993 Oct;18 (Pt 2):185-200. Review.

Sherrill JM. "Insufficiency of self-phosphorylation for the activation of epidermal growth factor receptor." *Biochemistry.* 1997 May 13;36(19):5677-84

Tavaré JM, Dickens M. Changes in insulin-receptor tyrosine, serine and threonine phosphorylation as a result of substitution of tyrosine-1162 with phenylalanine. " *Biochem J.* 1991 Feb 15;274 (Pt 1):173-9

Tavaré JM, Clack B, Ellis L. Two-dimensional phosphopeptide analysis of the autophosphorylation cascade of a soluble insulin receptor tyrosine kinase. The tyrosines phosphorylated are typical of those observed following phosphorylation of the heterotetrameric insulin receptor in intact cells. *J Biol Chem.* 1991 Jan 25;266(3):1390-5.

Tavaré JM, Denton RM. Studies on the autophosphorylation of the insulin receptor from human placenta. Analysis of the sites phosphorylated by two-dimensional peptide mapping. *Biochem J.* 1988 Jun 1;252(2):607-15.

Taylor SS, Radzio-Andzelm E, Hunter T. How do protein kinases discriminate between serine/threonine and tyrosine? Structural insights from the insulin receptor protein-tyrosine kinase. " *FASEB J.* 1995 Oct;9(13):1255-66. Review.

Tennagels N, Telting D, Parvaresh S, Maassen JA, Klein H.W. Identification of Ser(1275) and Ser(1309) as autophosphorylation sites of the human insulin receptor in intact cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Mar 30;282(2):387-93.

Ullrich A, Bell JR, Chen EY, Herrera R, Petruzzelli LM, Dull TJ, Gray A, Coussens L, Liao YC, Tsubokawa M, et al. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature.* 1985 Feb 28-Mar 6;313(6005):756-61.

Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell.* 1990 Apr 20;61(2):203-12. Review.

Wei L, Hubbard SR, Hendrickson WA, Ellis L. Expression, characterization, and crystallization of the catalytic core of the human insulin receptor protein-tyrosine kinase domain. *J Biol Chem.* 1995 Apr 7;270(14):8122-30.

White, M., Shoelson, S., Keutmann, H., & Kahn, C. A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor. *J. Biol. Chem.*,1998, 263(6), 2969-2980.

Wilden PA, Kahn CR, Siddle K, White MF. Insulin receptor kinase domain autophosphorylation regulates receptor enzymatic function. *J Biol Chem.* 1992 Aug 15;267(23):16660-8.

Wilden PA, Siddle K, Haring E, Backer JM, White MF, Kahn CR. The role of insulin receptor kinase domain autophosphorylation in receptor-mediated activities. Analysis with insulin and anti-receptor antibodies. *J Biol Chem.* 1992 Jul 5;267(19):13719-27.

Zhang B, Tavaré JM, Ellis L, Roth RA. The regulatory role of known tyrosine autophosphorylation sites of the insulin receptor kinase domain. An assessment by replacement with neutral and negatively charged amino acids. *J Biol Chem.* 1991 Jan 15;266(2):990-6.

Zhang X, Gureasko J, Shen K, Cole PA, Kuriyan J. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell.* 2006 Jun 16;125(6):1137-49.

Zheng J, Knighton DR, ten Eyck LF, Karlsson R, Xuong N, Taylor SS, Sowadski JM. Crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MgATP and peptide inhibitor. *Biochemistry.* 1993 Mar 9;32(9):2154-61.

8 Anhang

8.1 Überblick über die Aminosäuresequenzen der verwendeten Kinasekonstrukte

```

GST
001 MSPILGYWKI KGLVQPTRLR LEYLEEKYEE HLYERDEGDK WRNKKFELGL EFNLPYYID GDVKLTQ SMA IIRYIADKHN MLGGCPKERA BISMLEGA

(GST)
101 DIRYGVSRIA YSKDFETLKV DFLSKLPEML KMFEDRLCHK TYLNGDHVTH PDFMLYDALD VVLYMDEMCL DAPFKLVCFK KRIEAIPOID KYLKSSKY

(GST)          Tev-Site          LIRK-dC
201 WPLQGWQATF GGGDHPPKSD LVPRGSENLY FQGELGSKRQ PDGPLGPLYA SSNPEYLSAS DVFPCSVYVP DEWEVSREKI TLLRELQGS FGMVYEGN

(LIRK-dC)
301 DIIKGEATR VAVKTVNESA SLRERIEFLN EASVMKGFTC HHVRLG VV SKGQPTLVVM ELMAHGD LKS YLRSRPEAE NNPGRPPPTL QEMIQMAA

(LIRK-dC)
401 ADGMAYLNAK KEVHRDLAAR NCMVAHDFTV KIGDFGMTRD IYETDYYLKG GKGLLPVRWM APESLKDGVF TTSSDMWSPG VVLWEITSLA EQPYQGLS

(LIRK-dC)
501 QVLKFMVMDGG YLDQPDNCPE RVTDLRMCW QFNPNMRPTF LEIVNLLKDD LHPSFPEVSF FHSEENK

```

Abbildung 8.1: Sequenz der GST-TEV-IRKDACT^{WT}

```

GST
001 MSPILGYWKI KGLVQPTRLR LEYLEEKYEE HLYERDEGDK WRNKKFELGL EFNLPYYID GDVKLTQ SMA IIRYIADKHN MLGGCPKERA

(GST)
091 BISMLEGAVL DIRYGVSRIA YSKDFETLKV DFLSKLPEML KMFEDRLCHK TYLNGDHVTH PDFMLYDALD VVLYMDEMCL DAPFKLVCFK

(GST)          Tev-Site          LIRK-dC Y1146F
181 KRIEAIPOID KYLKSSKYIA WPLQGWQATF GGGDHPPKSD LVPRGSENLY FQGELGSKRQ PDGPLGPLYA SSNPEYLSAS DVFPCSVYVP

(LIRK-dC Y1146F)
271 DEWEVSREKI TLLRELQGS FGMVYEGNAR DIIKGEATR VAVKTVNESA SLRERIEFLN EASVMKGFTC HHVRLG VV SKGQPTLVVM

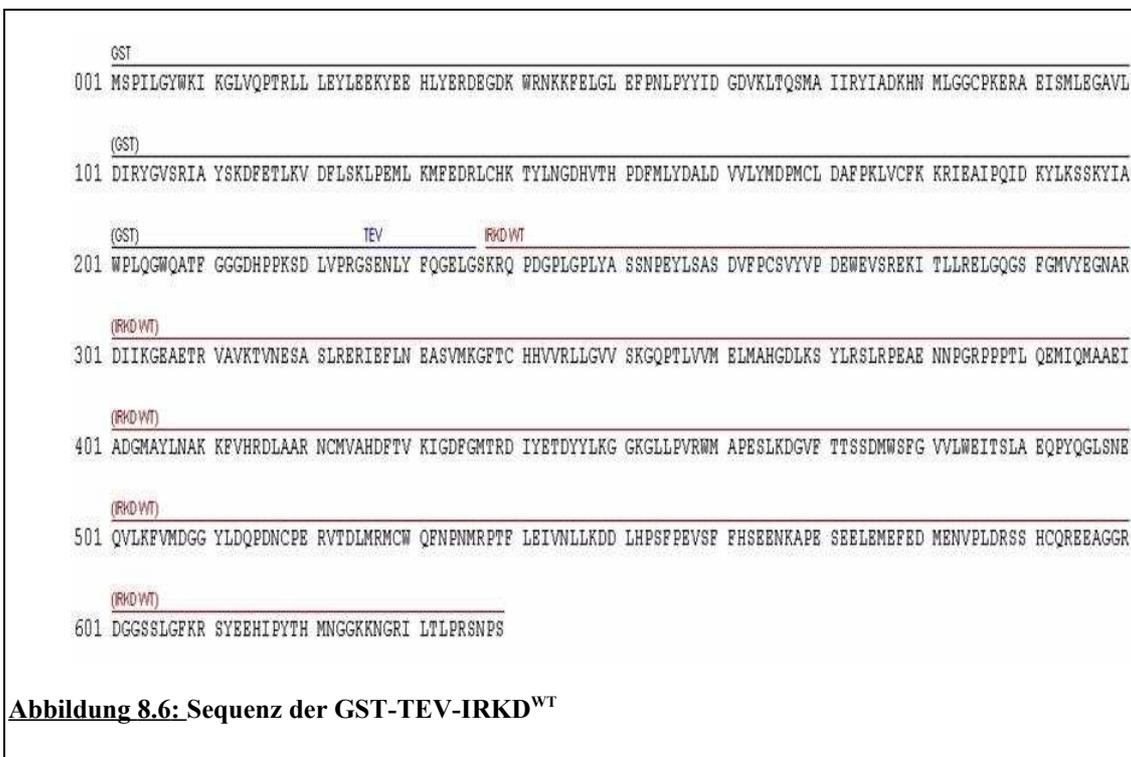
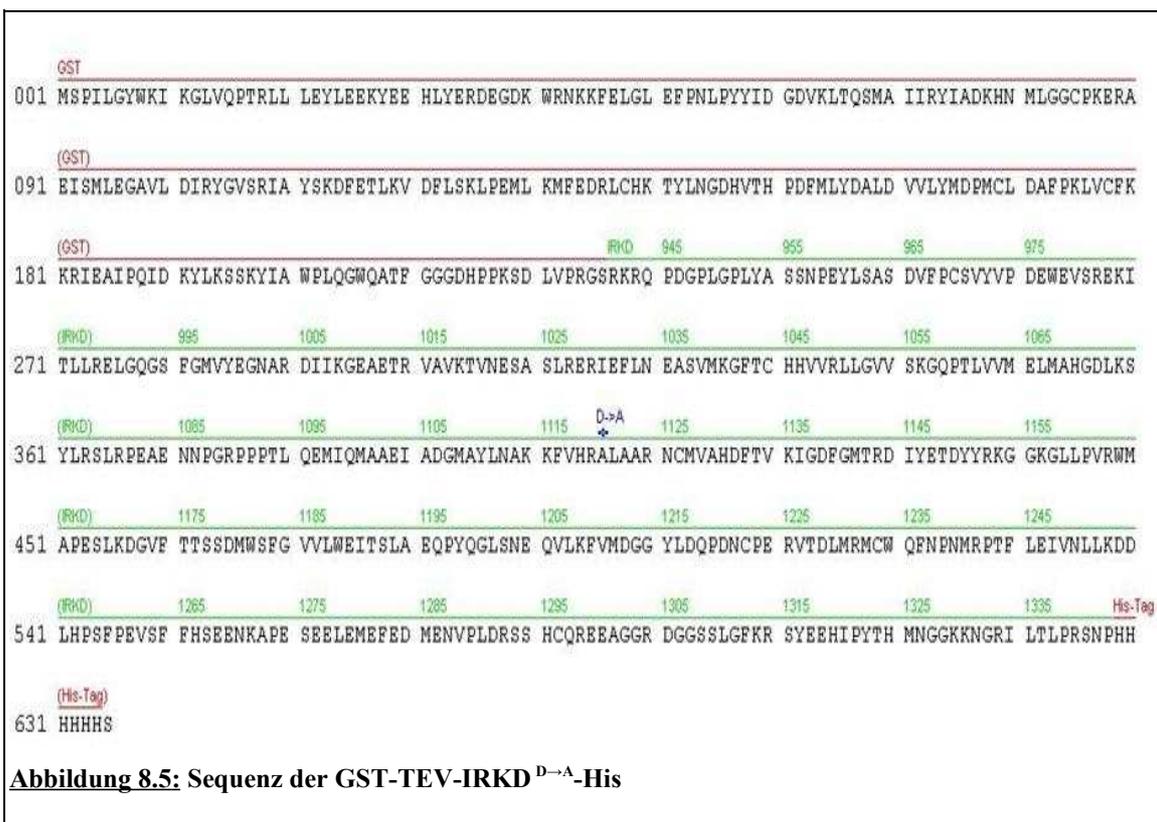
(LIRK-dC Y1146F)          Y1146F
361 ELMAHGD LKS YLRSRPEAE NNPGRPPPTL QEMIQMAAEI ADGMAYLNAK KEVHRDLAAR NCMVAHDFTV KIGDFGMTRD IFETDYYLKG

(LIRK-dC Y1146F)
451 GKGLLPVRWM APESLKDGVF TTSSDMWSPG VVLWEITSLA EQPYQGLSNE QVLKFMVMDGG YLDQPDNCPE RVTDLRMCW QFNPNMRPTF

(LIRK-dC Y1146F)
541 LEIVNLLKDD LHPSFPEVSF FHSEENK

```

Abbildung 8.2: Sequenz der GST-TEV-IRKDACT^{Y1146F}




```

GST
001 MSPILGYWKI KGLVQPTRL L LEYLEEKYEE HLYERDEGDK WRNKKPELGL BFPNLPYYID GDVKLTSMA IIRYIADKHN MLGGCPKERA EISMLEGAVL

(GST)
101 DIRYGVSRIA YSKDFETLKV DFLSKLPEML KMFEDRLCHK TYLNGDHVTH PDFMLYDALD VVLYMDPMCL DAFPKLVCFK KRIBAIRQID KYLKSSKYIA

(GST)          TEV          IRKD Y1151F
201 WPLQGQATF GGGDHPPKSD LVPRGSENLY FQGELGSKRQ PDGPLGPLYA SSNPEYLSAS DVFPCSVYVP DEWEVSREKI TLLRELQGS FGMVYEGNAR

(IRKD Y1151F)
301 DIIRGEATR VAVKTVNESA SLRERIEFLN EASVMKGTFC HHVVRLLGVV SKGQPTLVVM ELMANGDLKS YLRSLRPEAE NNPGRPPPTL QEMIQMAAEI

(IRKD Y1151F)          Y1151F
401 ADGMAYLNAK KVVHRDLAAR NCMVAHDFTV KIGDFGMTRD IYETDYFRKG GKGLLPVRWM APESLKDGVF TTSSDMWSPG VVLWEITSLA EQPYQGLSNE

(IRKD Y1151F)
501 QVLKFMVMDGG YLDQPDNCPE RVTDLRMCW QFNPNMRPTF LEIVNLLKDD LHPSFPEVSF FHSBENKAPE SEELEMEFED MENVPLDRSS HCQREAGGR

(IRKD Y1151F)
601 DGGSSLGFKR SYEEHIPYTH MNGGKKNRI LTLPRSNPS

```

Abbildung 8.9: Sequenz der GST-TEV-IRKD^{Y1151F}

8.2 Charakterisierung der GST-TEV-IRKD-Kinasekonstrukte

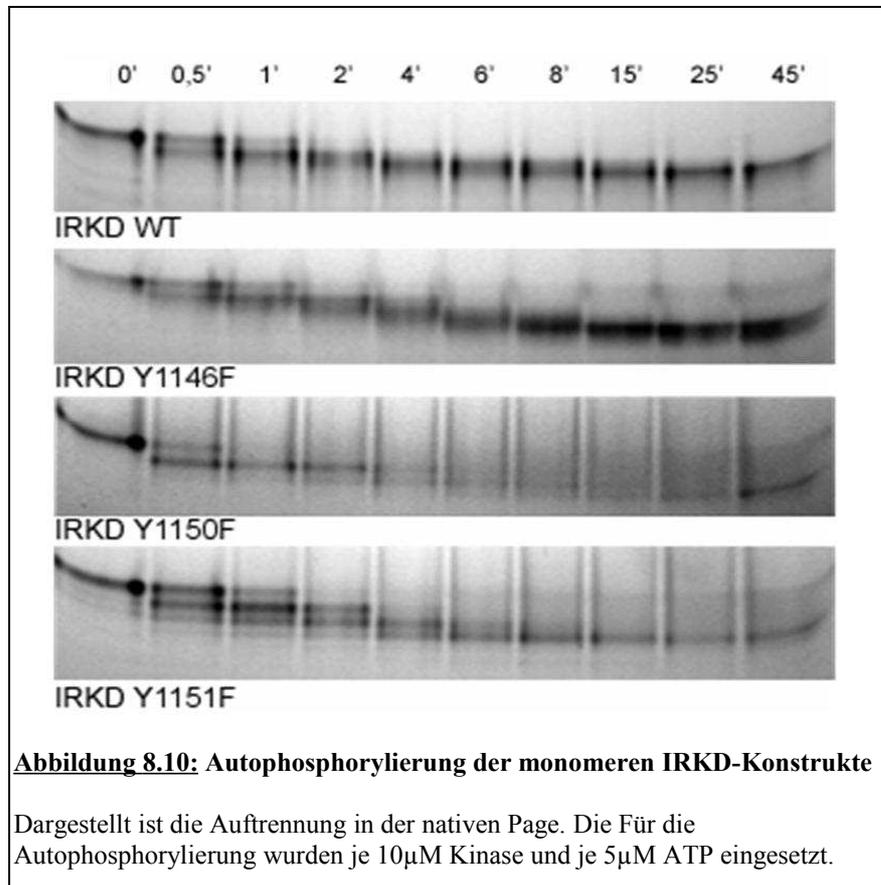
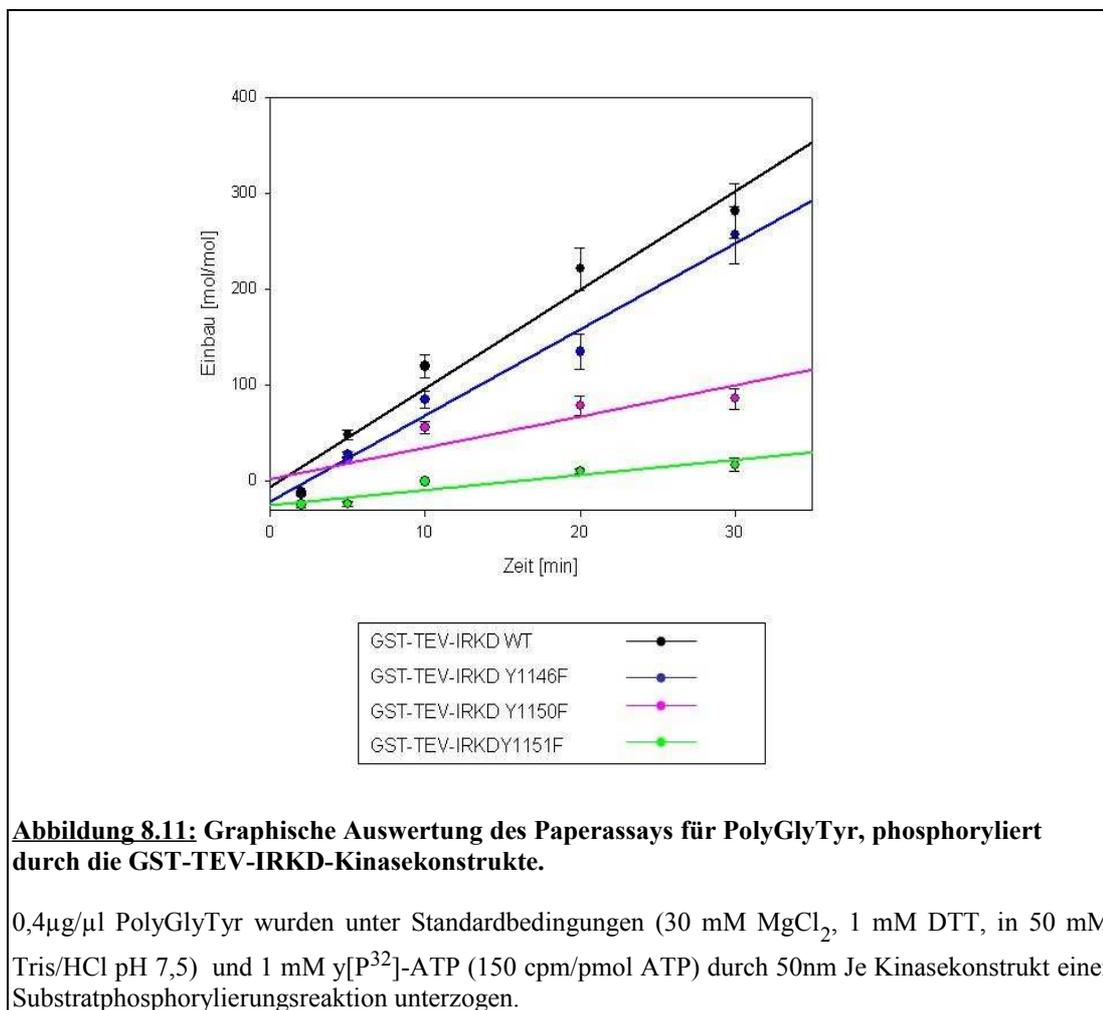


Abbildung 8.10: Autophosphorylierung der monomeren IRKD-Konstrukte

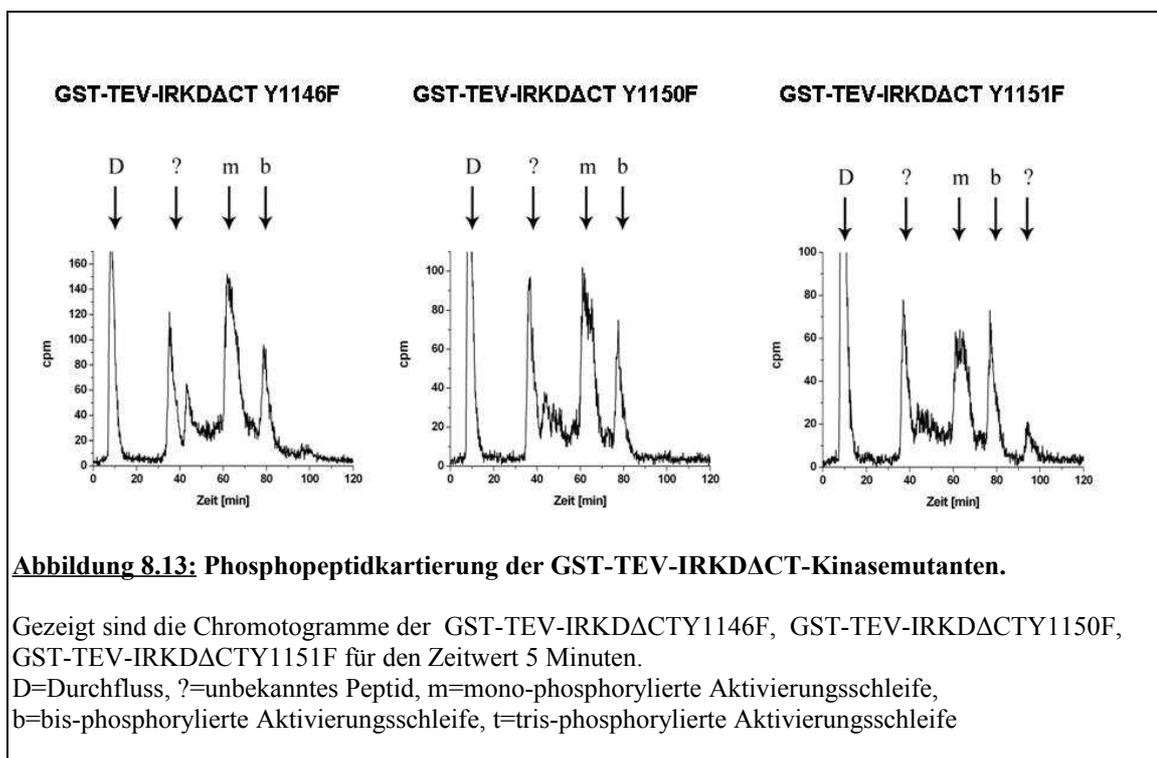
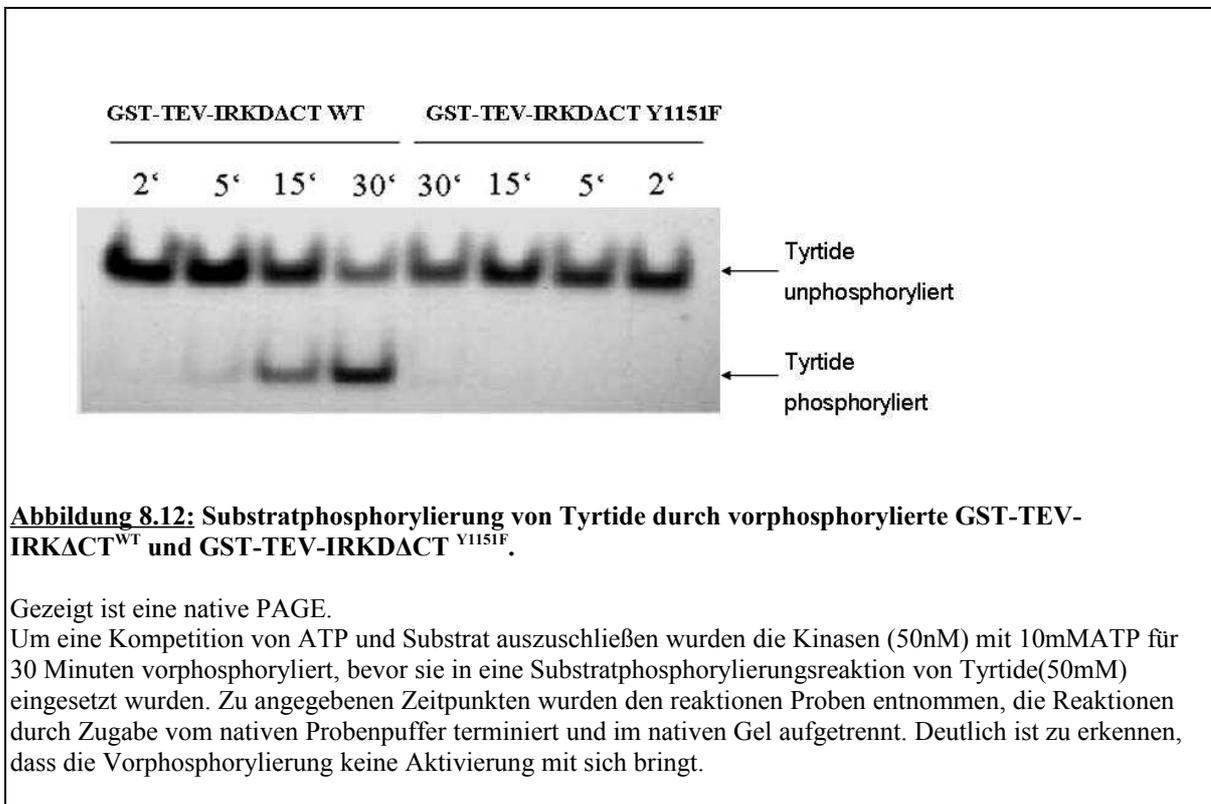
Dargestellt ist die Auftrennung in der nativen Page. Die Für die Autophosphorylierung wurden je $10\mu\text{M}$ Kinase und je $5\mu\text{M}$ ATP eingesetzt.



	Spez. Aktivität für PolyGlyTyr (%)
GST-TEV-IRKD ^{WT}	100
GST-TEV-IRKD ^{Y1146F}	82
GST-TEV-IRKD ^{Y1150F}	27
GST-TEV-IRKD ^{Y1151F}	15

Tabelle 8.1: Spezifische Aktivität der GST-TEV-IRKD-Konstrukte in der Substratphosphorylierung von PolyGlyTyr.

8.3 Charakterisierung der GST-TEV-IRK Δ CT-Kinasekonstrukte



8.4 Charakterisierung der Hybride

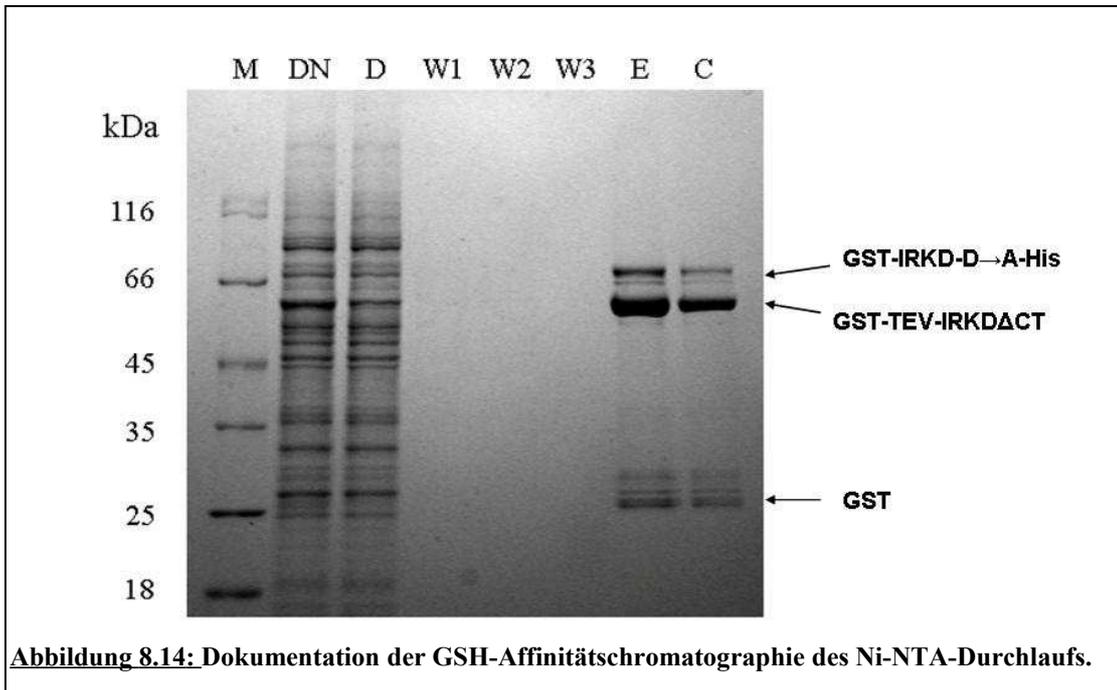


Abbildung 8.14: Dokumentation der GSH-Affinitätschromatographie des Ni-NTA-Durchlaufs.

Das aktive Homodimer befindet sich im Durchlauf der Ni-NTA-Reinigung. Zum Nachweis des aktiven Homodimers wurde der Durchlauf der Ni-NTA-Reinigung nochmals über eine GSH-Affinitätschromatographie gereinigt. Je 30 μ l der Proben wurden mit je 6ml SDS-Probenpuffer versetzt und auf einem 12%igem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt:

M=Marker, DN=Durchlauf der Ni-NTA-Reinigung, D=Durchlauf der GSH-Reinigung, W1/W2/W3=Waschschritte, E=Eluate, C=nach dem Einengen über Centricon

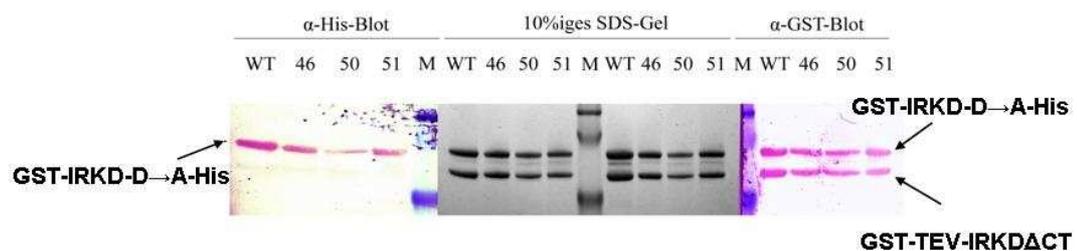


Abbildung 8.15: Immunologischer Nachweis der Reinigungstags.

Nach der Reinigung der Hybride über zwei aufeinander folgende Affinitätschromatographien und einer Überprüfung der Proteingröße mittels SDS-PAGE, soll die Reinigung immunologisch auf ihre Richtigkeit überprüft werden. Es wurden zwei spezifische Antikörper verwendet, die als Epitop je einen Reinigungstag erkennen (α -GST- und α -His-Antikörper).

Abgebildet sind von links nach rechts der entwickelte α -His-Blot, das zugehörige 10%ige SDS-Gel und der entwickelte α -GST-Blot. Auf das Gel wurden immer 10 μ g Protein aufgetragen: WT=Hybrid WT, 46=Hybrid Y1146F, 50=Hybrid Y1150F, 51=Hybrid Y1151F und M=Prestained Marker.

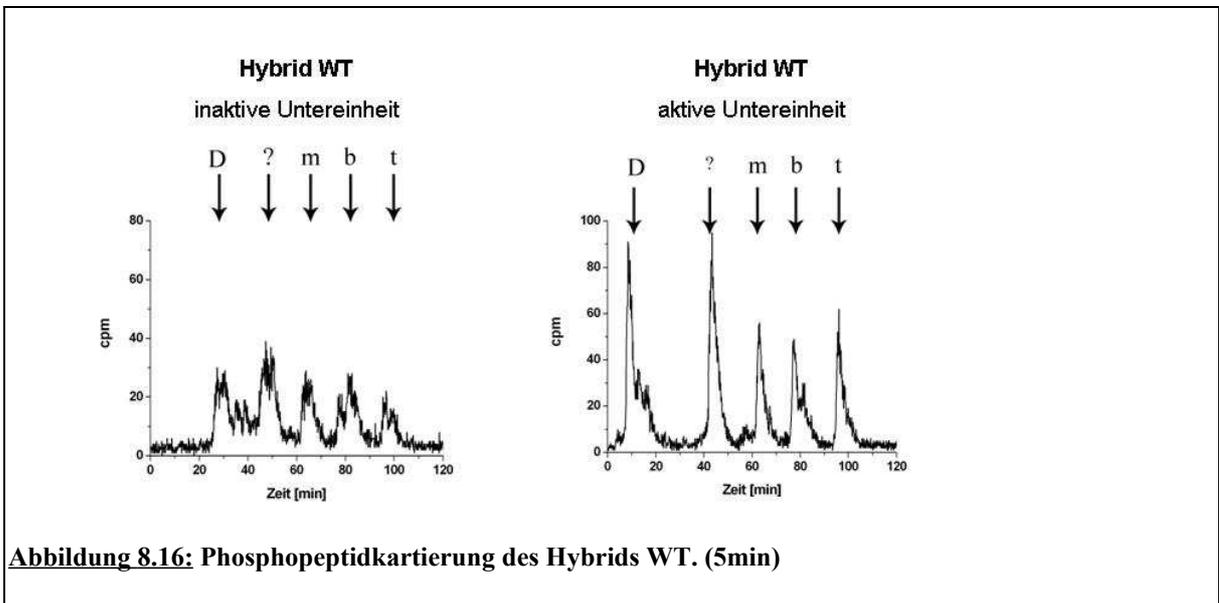


Abbildung 8.16: Phosphopeptidkartierung des Hybrids WT. (5min)

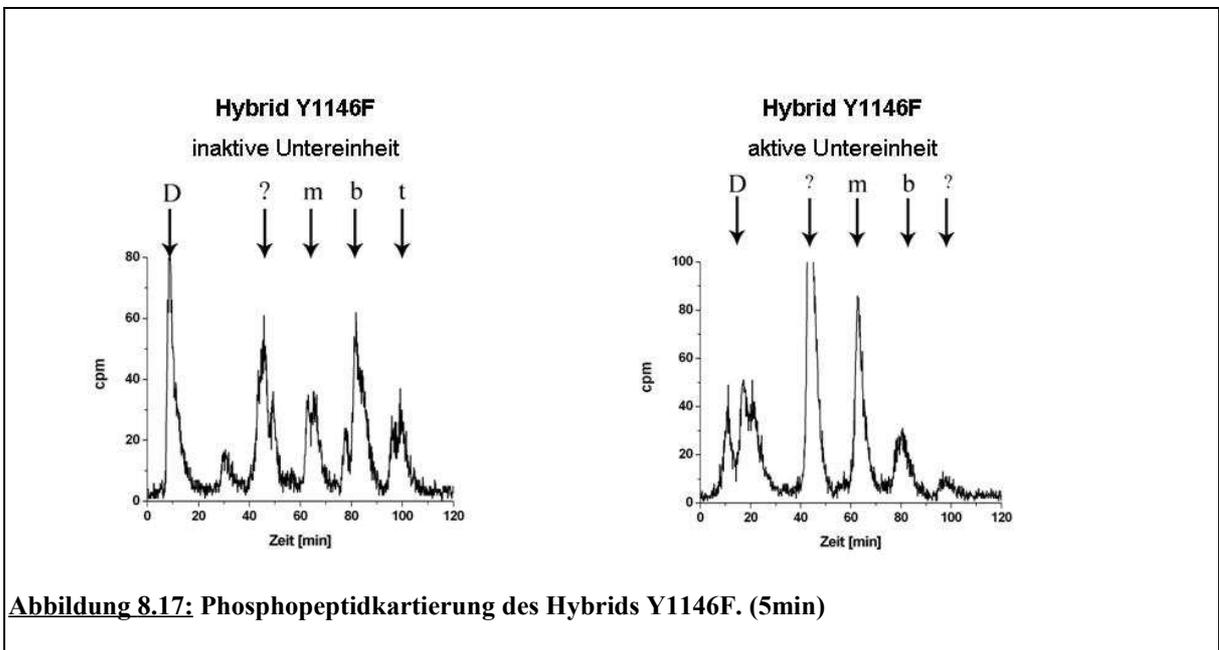
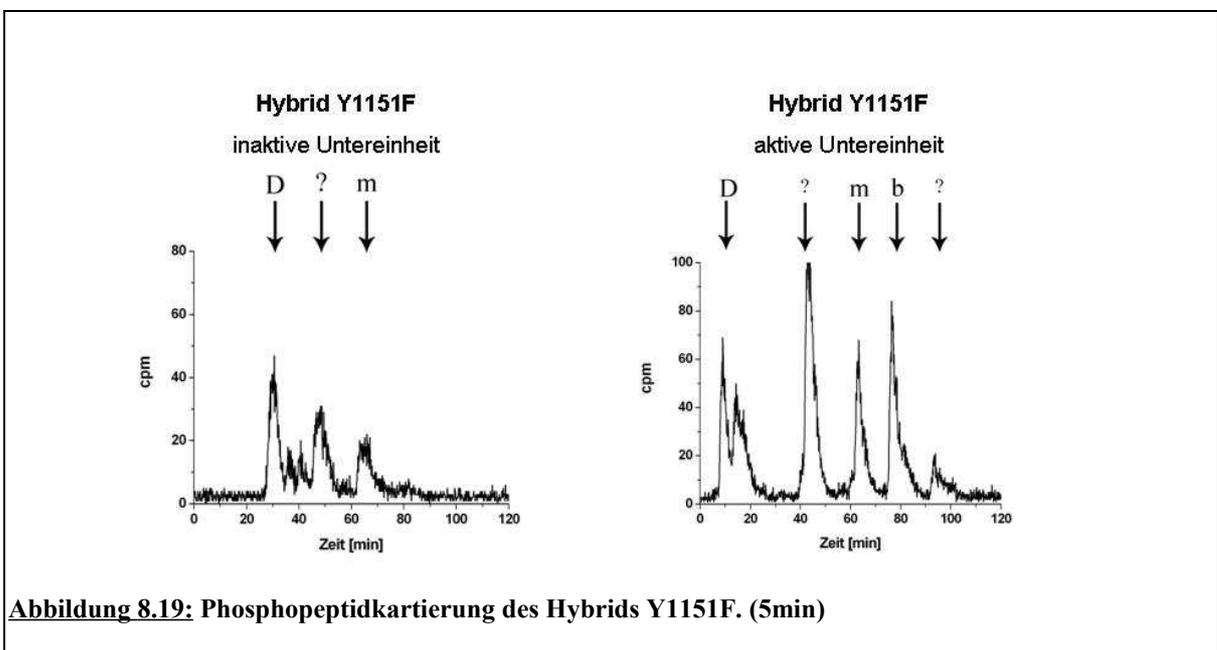
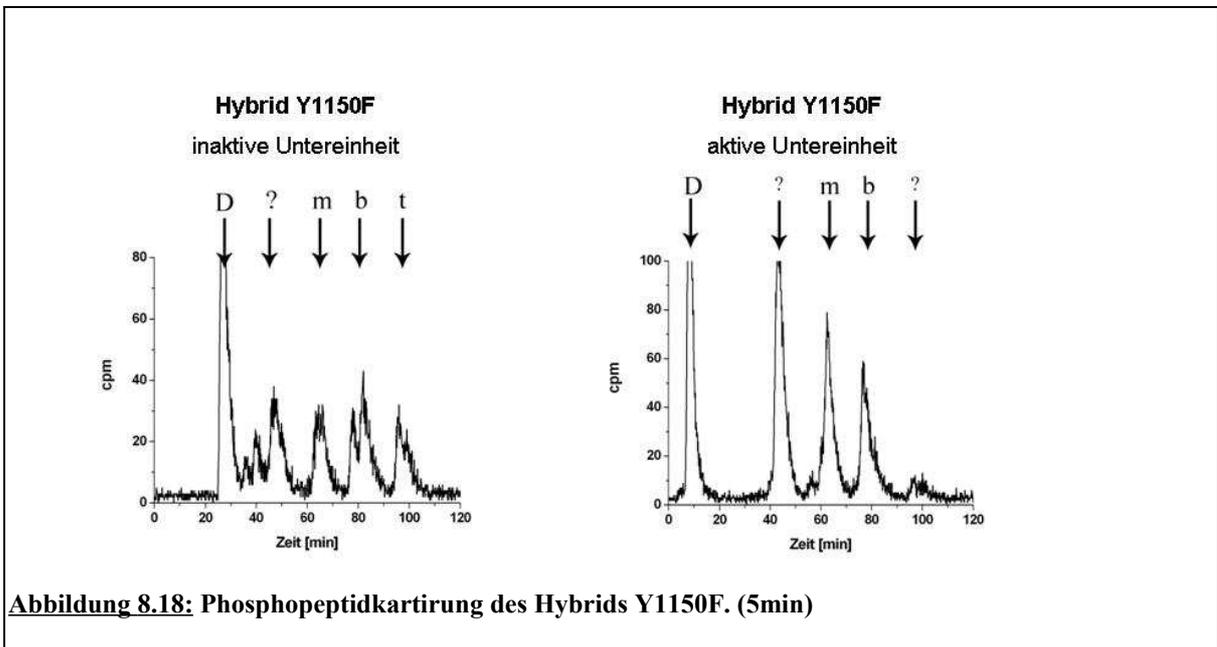
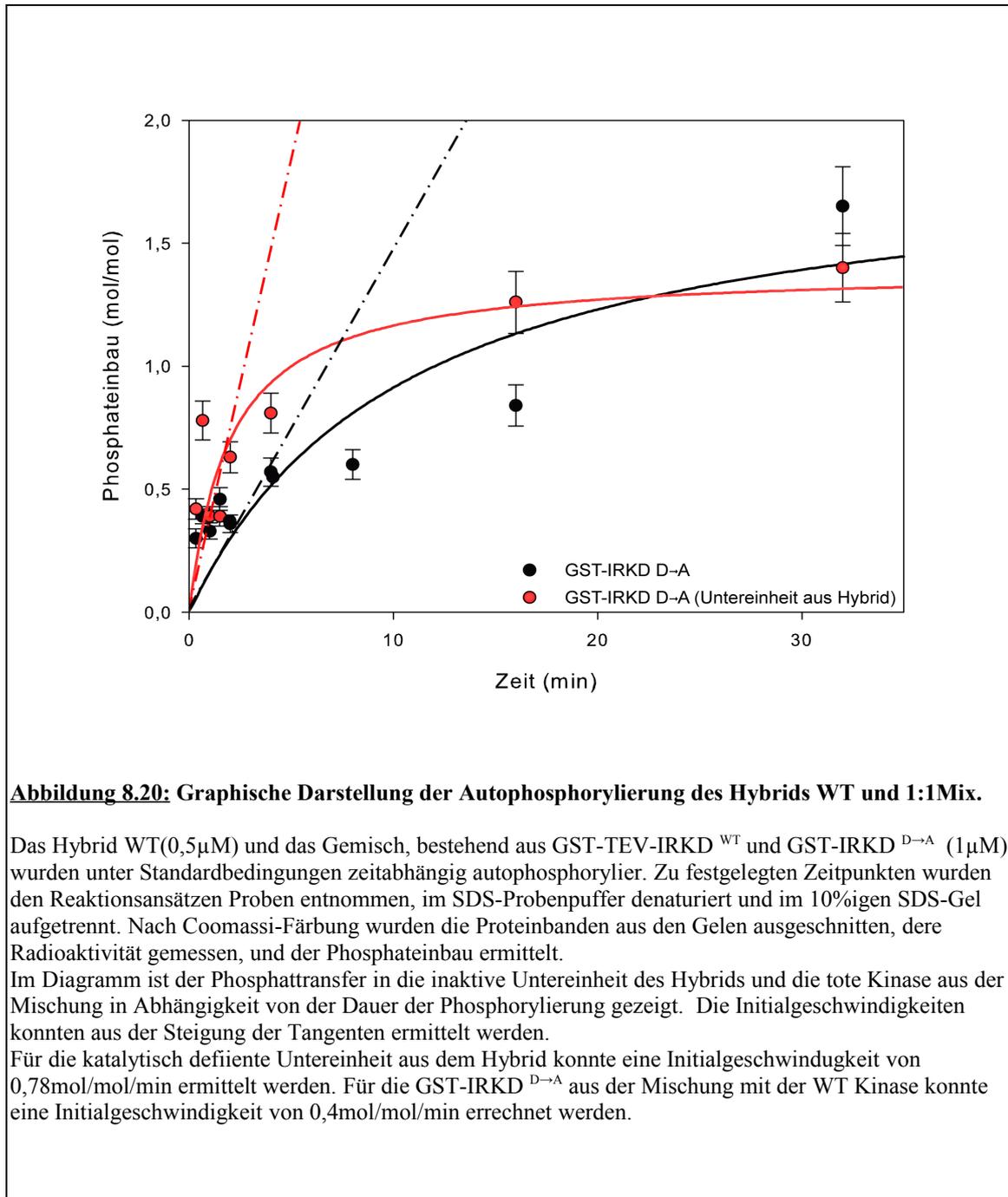


Abbildung 8.17: Phosphopeptidkartierung des Hybrids Y1146F. (5min)





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 dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Professor Dr. Helmut W. Klein betreut worden.

Koln, den

Julia Wassermann

DANKSAGUNG

Danke möchte ich besonders Herrn Prof. Dr. Klein sagen, der mir dieses interessante Thema für die Arbeit ermöglicht hat. Danke, für die sehr gute fachliche Betreuung, den Freiraum bei der wissenschaftlichen Arbeit, das entgegengebrachte Vertrauen und anregende Diskussionen.

Ein ganz besonderer Dank gilt der Gerhard C. Starck Stiftung für die großzügige finanzielle Unterstützung, die mir das das Vollenden dieser Arbeit ermöglicht hat.

Bei Monika Gompert möchte ich mich für die Einarbeitung in die *Sf9*-Zellkultur, gute Zusammenarbeit und das freundliche kollegiale Verhältnis in Labor bedanken.

Die große Bereitschaft von Frau Dr. Kristin Baer meine Fragen zu beantworten und fachliche Diskussionen zu führen, hat diese Arbeit durch wertvolle Hinweise und Ideen vorangetrieben. Jens Herweg möchte ich für die Einarbeitung in die Phosphopetidkartierung danken.

Marcin Monch und Magdalena Sznepka möchte ich für die außerordentlich gute Zusammenarbeit danken.

Der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich für die gute Zusammenarbeit, freundschaftliches Verhältnis und die Hilfsbereitschaft untereinander danken.

Dank gebührt meinen Korrekturlesern Magnus Manske, Nicole Richter und Monika Gompert.

Einen besonderen Dank möchte ich Magnus Manske und Nicole Richter für die dauerhafte fachliche und seelische Unterstützung während der Arbeit, gute Ratschläge und die Bereitschaft immer ein „offenes Ohr“ für mich zu haben, aussprechen

Mein Dank geht auch an die Mitarbeiter der mechanischen und elektronischen Werkstatt für ihre Hilfe bei allen technischen Problemen. Ebenso danke ich den Mitarbeitern der Nuklearchemie für das freundliche Verhältnis und die Hilfe bei technischen Problemen.

Nicht zuletzt möchte ich mich besonders bei meiner Familie bedanken, die immer an mich geglaubt haben und alle meine Entscheidungen unterstützt haben.

Zuletzt mochte ich mich bei allen nicht namentlich erwähnten Personen bedanken, ohne deren Hilfe die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Geburtsdatum: 10.07.1975
 Geburtsort: Tschernowtzy, Ukraine
 Emigration in die BRD: 1992
 Staatsangehörigkeit: Deutsch
 Familienstand: ledig

Schulbildung

1982 - 1992 Grundschule Nr.1 und Mittelschule Nr.1, Ukraine, Tschernowtzy
 Abschluss: Abitur (Note: „Sehr gut“)

Studium

1994 - 1995 Staatliches Studienkolleg für ausländische Studierende an der
 Universität zu Köln

WS1995/1996 - Studium der Biologie an der Universität zu Köln Angestrebter
 2003 Abschluss: Diplom

2001-2003 Aus gesundheitlichen Gründen erzwungene Unterbrechung des
 Studiums von 4 Semestern

2003 - 2004 Diplomarbeit an der Universität zu Köln im Institut für Biochemie
 Thema: „Etablierung von dualer Spezifität in Substraten des
 Insulinrezeptors“ Diplomnote „Gut plus“, Abschlussnote „Gut“

Seit 1.12.2004 Promotion an der Universität zu Köln, AG Prof. Dr. H.W. Klein,
 Institut für Biochemie, Otto-Fischer-Str.12, 50674 Köln

