

Mutationsanalyse der löslichen Insulinrezeptorkinase

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

vorgelegt von

Volker Nölle

aus Köln

1998

Berichterstatter:

Prof. Dr. H.W. Klein

Priv.-Doz. Dr. S. Waffenschmidt

Tag der mündlichen Prüfung:

10.12.1998

Meiner Familie

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1996 bis Oktober 1998 am Institut für Biochemie an der Universität zu Köln unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. W. Klein angefertigt.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin	DIR	Drosophila Insulinrezeptor
Abb.	Abbildung	DMF	N,N'-Dimethylformamid
AcNPV	<i>Autographa californica</i> Nuclear Polyhedrosis Virus	DMSO	Dimethylsulfoxid
ADP	Adenosindiphosphat	DNA	Desoxyribonukleinsäure
AMP-PNP	Adenylyl- imidodiphosphat	DNP	Dinitrophenyl
AP	Alkalische Phosphatase	DTT	Dithiothreitol
AS	Aminosäure	E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ATP	Adenosintriphosphat	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat	EGFR	epidermal growth factor receptor
Bp, kBp	Basenpaare, Kilobasenpaare	eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
BPS	between PH and SH2	Ex20	Exon 20 des IR
BSA	Rinderserumalbumin	FPLC	Fast Performance (oder Pressure) Liquid Chromatography
C	Cytosin	G	Guanosin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat	g	Erdbeschleunigung, 9.81 ms ⁻²
cAPK	Cyclic AMP-dependent Protein-kinase (=PKA)	Gab1	Grb2-associated binder-1
CDK2	Cyclin-dependent Proteinkinase	GAP	GTPase-aktivierendes Protein
cDNA	DNA-Kopie der mRNA	GDP	Guanosindiphosphat
Ci	Curie	Grb2	Growth factor receptor binding protein
CKII	Caseinkinase II	GSK-3	Glykogensynthase-Kinase 3
cpm	counts per minute, Zählimpulse pro Minute	GST	Glutathion-S-Transferase
CT	C-terminale Domäne des IR	GTP	Guanosintriphosphat
Da, kDa	Dalton, Kilodalton	h	Stunde
DC	Dünnschichtchromatographie		

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie	MOI	Multiplicity of Infection
HIR	humaner Insulinrezeptor	mol/mol	mol Phosphat pro mol Protein
HPLC	High Performance (oder Pressure) Liquid Chromatography	mSOS	mammalian Son Of Sevenless
IGF	Insulin-like growth factor	M_w	Molekulargewicht
IGF1R	Insulin-like growth factor Rezeptor	n.b.	nicht bestimmt
IL	Interleukin	NBT	Nitroblau-tetrazoliumchlorid
IR	Insulinrezeptor	ori	Startpunkt
IRKD	lösliche Insulinrezeptor-Kinase	p.i.	post infection
IRR	Insulinrezeptor related Rezeptor	PBS	Phosphate Buffered Saline
IRS	Insulinrezeptor Substrat	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
JM	Juxtamembran-Domäne des IR	PEG	Polyethylenglykol
keV	Kiloelektronenvolt	pEY	Poly(Glu:Tyr) _{4:1}
KRLB	Kinase regulatory binding	pfu	plaque forming units
LAR	Leukocyte antigen-related protein	PH	Pleckstrin homolog
LB	Luria-Bertani	PHAS-1	eIF-4E bindendes Protein
M	mol/l	P_i	Anorganisches Phosphat
mA	Milliampere	PI3K	Phosphatidylinositol-3'-Kinase
MAD2	mitotic arrest deficient protein	PKB	Proteinkinase B
MAPK	MAP-Kinase	PKC	Proteinkinase C
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase	PLC	Phospholipase C
MEK	MAPK Kinase	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
min	Minute	pS	phosphoryliertes Serin
MKP	MAPK Phosphatase	PSL	Photo Stimulated Luminescence
		PSM	Pro-rich, PH, SH2 domain-containing signaling mediator
		pT	phosphoryliertes Threonin

PTB	Phosphotyrosin bindend	T	Thymidin
PTP(ase)	Proteintyrosin-Phosphatase	Tab.	Tabelle
PVDF	Polyvinylidendifluorid	TBE	Tris-Borat-EDTA
pY	phosphoryliertes Tyrosin	TCA	Trichloressigsäure
Raf-1	MAPK Kinase Kinase	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
RNA	Ribonukleinsäure	TFA	Trifluoressigsäure
RNase A	Ribonuklease A	ThrP	Threoninphosphat
rpm	revolutions per minute	TM	Transmembran-Domäne des IR
RT	Raumtemperatur	TNF	Tumor necrosis factor
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase	TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
s	Sekunde	Triton X-100	PEG-(9,6)-p-t-octylphenylether
s.	siehe	TrkB-R	Tropomyosin related Kinase B-Rezeptor (= BDNF/NT-3 growth factor receptor)
SAIN	Shc and IRS-1 NPxY-Bindungsdomäne	TyrP	Tyrosinphosphat
SDS	Natriumdodecylsulfat	ÜNK	Übernachtkultur
SDS-Gel	SDS-Polyacrylamidgel	UV	Ultraviolett
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese	V	Volt
sec	Sekunde	v/v	volume/volume, ml Volumen in 100 ml Gesamtvolumen
SerP	Serinphosphat	vgl.	vergleiche
Sf9	Spodoptera frugiperda-Zellen	W	Watt
SH2, SH3	Src-homologe Domänen 2 und 3	w/v	weight/volume, g Substanz in 100 ml Gesamtvolumen
Shc	Src homology 2/ α -collagen-related protein	WT	Wildtyp
SHP-2	Src homology-protein tyrosine phosphatase 2		
STAT	Signal transducers and activators of transcription		



Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Der humane Insulinrezeptor	3
2.2 Die intrazellulären Domänen und die Bedeutung der Autophosphorylierungsstellen	5
2.2.1 Die Juxtamembranregion	5
2.2.2 Die Tyrosinkinasedomäne	5
2.2.3 Der C-terminale Domäne	10
2.3 Signaltransduktion	12
2.3.1 IRS-Proteine	12
2.3.2 Shc	14
2.3.3 Grb-Proteine	15
2.3.4 Andere Proteine	15
2.3.5 SH2-bindende Proteine	16
2.4 Mechanismus der Autophosphorylierung	18
2.4.1 Aktivierung der Kinase	18
2.4.2 Phosphoryltransfer	20
2.5 Transiente Phosphorylierung	20
2.6 Duale Spezifität der Insulinrezeptorkinase	22
2.7 Die lösliche Kinase als Modellenzym	23
2.8 Fragestellung	25
3-8 Ergebnisse	
3 Generierung, Expression und Reinigung mutierter Insulinrezeptorkinasen	27
3.1 Überblick über die IRKD-Konstrukte	27
3.2 Das Baculovirus-Expressionssystem	28
3.3 Chromatographische Reinigung	29
4 Charakterisierung der Autophosphorylierung	33
4.1 Phosphatinkorporation und Initialgeschwindigkeiten	33
4.2 Serinautophosphorylierung	37
4.3 Lokalisierung phosphorylierter Reste	39

4.3.1 Methodik der Phosphopeptid-Kartierung	39
4.3.2 Identifizierung zweier bisphosphorylierter Formen der Kinasedomäne	41
4.3.3 Zeitverlauf der Phosphatinkorporation	43
4.3.4 Vergleich der Initialgeschwindigkeiten und der zeitabhängigen Besetzung	44
4.3.5 Lokalisierung der Serinautophosphorylierungsstellen	47
5 Aktivierung der Insulinrezeptorkinase	49
5.1 Einfluß des Polykations Poly-L-Lysin	49
5.2 Autophosphorylierung unter äquimolaren ATP-Verhältnissen	51
5.2.1 Zeitabhängige Phosphatinkorporation in Abhängigkeit von Poly-L-Lysin	51
5.2.2 Lokalisierung initial besetzter Reste	55
5.2.3 Zeitverlauf der Besetzung	57
6 ATP-Umsatz	59
6.1 Lineare ADP-Bildung durch die IRKD nach der Aktivierung	59
6.2 Ausschluß von Fremdaktivitäten	61
6.3 Abhängigkeit von der ATP-Konzentration	63
6.4 Vergleich der ATP-Umsätze der mutierten Kinasen	64
7 Transiente Phosphorylierung	65
7.1 Phosphorylierung unter Pulse-Chase- und Pulse-Hot Chase-Bedingungen	65
7.2 Initialgeschwindigkeiten der Hot Chase-Reaktion	67
7.3 Lokalisierung der transienten Phosphorylierungsstellen	69
7.4 Serinphosphorylierung unter Chase-Bedingungen	72
7.5 Lokalisierung der Phosphorylierungsstellen unter ADP-Chase-Bedingungen	73
8 Phosphattransfer auf exogene Substrate	75
8.1 Transferaktivität auf Poly(Glu:Tyr) _{4:1}	75
8.2 Phosphorylierung natürlicher Substrate	77
8.3 Phosphopeptid-Kartierung der phosphorylierten Substrate	82
8.4 Transiente Phosphorylierung von GST-IRS1	84
8.5 Kinetische Konstanten der Substratphosphorylierung: Der C-Terminus	87
8.6 Inaktive Kinasen als Substrate der Δ CT	90
8.6.1 Bestimmung des K_M -Wertes	90
8.6.2 Serinphosphorylierung der D1120A	92

9 Diskussion	95
9.1 Generierung, Expression und Reinigung der Kinasen	95
9.2 Auswirkungen der Substitutionen	96
9.2.1 Kinasedomäne	96
9.2.2 C-Terminus und Juxtamembrandomäne	99
9.2.3 Phosphatase-ähnliche Motive	104
9.2.4 Essentielle Reste („tote“ Kinasen)	105
9.3 Initiale Aktivierung der Insulinrezeptorkinase	106
9.3.1 Phosphorylierung unter äquimolaren ATP-Bedingungen	106
9.3.2 Reihenfolge der Besetzung	108
9.3.3 Einfluß von Poly-L-Lysin	110
9.4. Schlußfolgerungen für die Serinphosphorylierung	112
9.4.1 Die Serinkinase ist eine intrinsische Aktivität der IRKD	112
9.4.2 Hinweise auf weitere Serinautophosphorylierungsstellen	112
9.4.3 Der Mechanismus der Serinphosphorylierung	113
9.4.4 Bedeutung für die Signaltransduktion	115
9.5 Schlußfolgerungen für die transiente Phosphorylierung	116
9.5.1 ATPase-Aktivität	116
9.5.2 De- und Rephosphorylierungsprozesse	117
9.5.3 Transiente Phosphorylierung von Y1150/Y1151	118
9.5.4 Ausblick	120
10 Methoden	121
10.1 Molekularbiologische Methoden	121
10.2 Konstruktion der Transfervektoren der pVL-IRKD-Derivate	121
10.3 Expression und Reinigung der löslichen Insulinrezeptorkinase IRKD und ihrer Varianten	123
10.3.1 Expression im Baculovirus-Expressionssystem	123
10.3.1.1 Zellkultur	123
10.3.1.2 Infektion, Proteinexpression und Ernte von Sf9-Zellen	123
10.3.2 Reinigung der löslichen Insulinrezeptorkinase	124
10.3.2.1 Anionenaustauschchromatographie	124
10.3.2.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie mit Phenyl-Sepharose	125
10.4 Protein-Biochemische Methoden	125
10.4.1 Transfer und immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membran	125

10.4.2 Proteinbestimmung	126
10.4.2.1 Coomassie Spot-Test	127
10.4.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford	127
10.5 Phosphorylierungsreaktionen	127
10.6 Bestimmung des Phosphateinbaus	128
10.6.1 Dot-Blot auf Phosphozellulose-Papier (Sahal und Fujita-Yamaguchi, 1987)	128
10.6.2 SDS-PAGE	128
10.7 Phosphoaminosäure- und Nukleotidanalyse	128
10.7.1 Tryptische Spaltung von Proteinen im SDS-Gel	128
10.7.2 Phosphoaminosäureanalysen	129
10.7.2.1 Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel 60 (Munoz und Marshall, 1990)	129
10.7.2.2 Zweidimensionale Dünnschicht-Elektrophorese auf Zellulose (Boyle et al., 1991)	129
10.7.3 Nukleotidanalyse	130
10.8 HPLC-Analyse tryptischer Peptide der Insulinrezeptorkinase (Phosphopeptid-Kartierung)	130
10.9 Spektrometrische Messungen mit dem Phosphatdonor 2-Methoxybenzoylphosphat	132
10.10 Computeranalyse	132
11 Material	133
11.1 Chemikalien	133
11.2 Radiochemikalien	135
11.3 Antikörper und Enzyme	135
11.4 Nukleinsäuren	136
11.4.1 DNA	136
11.4.2 Plasmidvektoren	136
11.4.3 Oligonukleotide	136
11.5 Chromatographie	137
11.6 Bakterien, Zell-Linien, Viren, Kulturmedien und -zusätze	138
11.7 Molekulargewichts-/Längenstandards	138
11.8 Kit-Systeme	138
11.9 Verbrauchsmaterial	139
11.10 Laborausstattung	139
12 Literatur	143

1 Zusammenfassung

Die lösliche Insulinrezeptorkinase (IRKD) dient als Modellenzym für den humanen Insulinrezeptor. Die Tyrosine der Autophosphorylierung sind in drei Domänen lokalisiert, wobei den Tyrosinen 1146, 1150 und 1151 der Kinasedomäne eine entscheidende Rolle bei der Aktivität zukommen soll. In der Literatur wird postuliert, daß die Phosphorylierung dieser drei Reste zur maximalen Aktivität führt. Daneben phosphoryliert die IRKD rezeptoreigene und in Substraten befindliche Serinreste und ist somit eine Kinase mit dualer Spezifität. Desweiteren unterliegt die IRKD einer transienten Phosphorylierung. Über diese beiden Eigenschaften des Enzyms existieren nur wenige Befunde. Die vorhandenen Literaturdaten sind wegen unterschiedlicher Systeme und Methodiken nur schwer vergleichbar und liefern besonders bei in vivo-Untersuchungen widersprüchliche Ergebnisse. Um ein homogenes Reaktionsfeld zur Analyse der zugrunde liegenden Mechanismen zu schaffen, wurden in dieser Arbeit mutierte Insulinrezeptorkinasen generiert, mit Hilfe des Baculovirus-Systems exprimiert und in zwei chromatographischen Schritten zur Homogenität gereinigt. Untersucht wurden Insulinrezeptorkinasen mit den Mutationen Y1146F, Y1150F, Y1151F, YYY960/1316/1322FFF, SS1275/1309DD, D1120A, K1018A, CHH1044/1045/1046TRQ, C1296S und zwei Varianten einer um 72 Aminosäuren am C-Terminus verkürzten Form, DCT und DCT-Y960F. Für die untersuchten Insulinrezeptorkinasen ergab sich folgendes Bild:

Poly-L-Lysin bewirkt eine 5-15fache Erhöhung der Initialgeschwindigkeit der Autophosphorylierung. Die Deletion der C-terminalen Domäne führt zum Verlust der initialen Aktivierbarkeit durch das Polykation. Hingegen ist die Transferaktivität der Deletionsmutante auf exogene Substrate nach langen Reaktionszeiten im Gegensatz zur IRKD nicht inhibiert.

Zwei bisphosphorylierte Formen der Kinasedomäne sind unterscheidbar. Als erste werden Y1150 und Y1151 phosphoryliert, während zu späteren Zeitpunkten eine Form mit Y1146/X (X=Y1150 und/oder Y1151) dominiert. Die Bisformen sind ebenfalls in einem Fusionsprotein, welches einen Teil der Aktivierungs- und der katalytischen Schleife beinhaltet, nachweisbar. Die Ausbildung der Bisformen korreliert mit den unterschiedlichen Initialgeschwindigkeiten der Kinasen.

Bei allen Mutanten findet sich der erhöhte ATP-Umsatz der IRKD wieder. Fremdaktivitäten sind durch den Einsatz von Phosphatase- und Kinase-Inhibitoren und die Verwendung einer inaktiven IRKD auszuschließen. Die Geschwindigkeit des ATP-Verbrauchs liegt mit $60 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ 3-4fach höher als die Geschwindigkeit der Rephosphorylierung, so daß ein Großteil der ATP-Moleküle hydrolysiert wird. Y1150 weist eine um 50 % verringerte Rephosphorylierung auf.

„Single turnover“-Experimente unter äquimolaren Verhältnissen von ATP zu Kinase zeigen, daß die Autophosphorylierungsreaktion um 2 bis 3 Größenordnungen verlangsamt wird und biphasisch verläuft. Der Austausch eines der Tyrosine der Kinasedomäne erhöht die Geschwindigkeit des Phosphateinbaus; initial sind nach der Phosphopeptid-Kartierung sowohl cis- (auf einer Untereinheit) als auch trans-Phosphorylierungen (zwischen zwei Untereinheiten) möglich.

Die Tyrosinreste 1150 und in stärkerem Maße 1151 der Kinasedomäne sind in den Prozeß der transienten Phosphorylierung der C-terminalen Tyrosinreste 1316 und 1322 involviert. Gebildetes ADP scheint keinen Einfluß auf die beobachtete transiente Phosphorylierung zu besitzen.

Die duale Aktivität wird nur von Y1151 moduliert, bei der eine 10fach verringerte Initialgeschwindigkeit der Phosphorylierung der C-terminalen Serinreste 1275 und 1309 sowohl im rezeptoreigenen C-Terminus als auch bei einem C-terminalen Fusionsprotein mit diesen Serinresten beobachtet wird. Der Austausch der Serinreste gegen Aspartatreste hat keine Auswirkungen auf die Transferaktivität des Enzyms, scheint jedoch eine Konformationsänderung zu bewirken. Für die weiterhin verzeichnete, wenn auch stark verringerte Serinautophosphorylierung wird der Serinrest 994 in der ATP-Bindungsdomäne als potentieller Kandidat diskutiert.

In Bezug auf die Substratphosphorylierung beeinflusst keine Mutation die Serin-/Threoninphosphorylierung eines rekombinanten Fragments des humanen Insulinrezeptor-Substrats-1 (IRS-1). Zudem wird keine Veränderung in der transienten Phosphorylierung des IRS-1-Fragments festgestellt.

Der Austausch der katalytischen Base D1120 führt wie erwartet zur vollständigen Inaktivierung der Kinase. In Substratphosphorylierungsreaktionen (mikromolarer K_M) verhält sich diese Mutante wie eine kinaseinaktive IRKD, der das für die ATP-Bindung essentielle K1018 fehlt. Beide können durch eine aktive Insulinrezeptorkinase an allen bekannten Tyrosin- und Serinautophosphorylierungsstellen besetzt werden.

2 Einleitung

2.1 Der humane Insulinrezeptor

Insulin stimuliert zahlreiche intrazelluläre Signalwege, die zu metabolen Effekten führen und das Zellwachstum regulieren (White und Kahn, 1994). Die physiologischen Effekte des Peptidhormons werden durch seinen transmembranen Zelloberflächenrezeptor vermittelt, einem heterotetrameren transmembranen Glykoprotein der Struktur β - α - α - β , dessen 4,2 Kilobasen große cDNA 1985 kloniert wurde (Ullrich *et al.* 1985; Ebina *et al.*, 1985). Das ca. 150 Kilobasen große Rezeptorgen ist auf dem kurzen Arm des humanen Chromosoms 19 lokalisiert und enthält 22 Exons (Seino *et al.*, 1990). Die α - und β -Untereinheiten werden durch proteolytische Spaltung aus dem Prorezeptor erhalten und sind durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft. Die α -Untereinheit (ca. 135 kDa) ist extrazellulär und beinhaltet die Bindungsstelle(n) für Insulin, während die β -Untereinheit (ca. 95 kDa) die Membran durchspannt. Die Bindung von Insulin an die α -Untereinheit aktiviert die intrinsische Tyrosinkinase der β -Untereinheit, was zur Autophosphorylierung des Rezeptors und nachfolgend zur Phosphorylierung zellulärer Substrate führt. Der Insulinrezeptor wird in allen Vertebratengewebe exprimiert, wobei die Hauptziele des Insulins Muskel- und Fettgewebe und die Leber sind. Zwei Isoformen des Rezeptors wurden identifiziert, die durch alternatives Splicing des Exon 11 entstehen und sich um 12 Aminosäuren in der Nähe des C-Terminus der α -Untereinheit unterscheiden. Das Expressionsmuster der Isoformen in verschiedenen Geweben ist bei verschiedenen Arten konserviert (Goldstein und Dudley, 1990), die physiologische Relevanz aber ist ungeklärt. Die Isoform mit Exon 11 weist eine 2fach höhere Affinität für Insulin auf als die ohne, was als ein Mechanismus zur Feinregulation der Insulinsensitivität in verschiedenen Geweben interpretiert werden kann (Mosthaf *et al.*, 1990; Yamaguchi *et al.*, 1991; McClain *et al.*, 1991; Kellerer *et al.*, 1992). Die Nummerierung der Aminosäuren in dieser Arbeit stimmt mit der Aminosäuresequenz von Ullrich *et al.* (1985) überein.

Als wesentliche strukturelle Merkmale befinden sich im extrazellulären Bereich eine cysteinreiche Domäne (Aminosäuren 124-329) und zwei Fibronectin III-Wiederholungen, die Tertiärstruktur der Ektodomäne ist jedoch nicht bekannt. Intrazellulär wird die Kinasedomäne von der Juxtamembran- und der C-terminalen Domäne flankiert. Nach Homologien in der Primärsequenz der katalytischen Domäne lassen sich die Proteintyrosinkinasen in mindestens 23 Gruppen unterteilen (Hanks and Quinn, 1991, Hanks und Hunter, 1995; ¹). Die Insulinrezeptor-Familie besitzt drei weitere strukturell verwandte Moleküle, den Insulin-Like Growth Factor I Rezeptor (**IGF1R**), den Insulinrezeptor Related Rezeptor (**IRR**), dessen Ligand noch nicht identifiziert wurde

¹ siehe auch http://www.sdsc.edu/pkr/pk_catalytic/pk_hanks_seq_align_long.html

(Shier und Watt, 1989; Zhang und Roth, 1992), und den Insulinrezeptor aus *Drosophila* (**DIR**). Die Mitglieder dieser Familie sind in der Primärsequenz hochkonserviert, mit über 80 % Homologie in der Kinasedomäne, aber Unterschieden im extrazellulären Bereich und intrazellulär vor allem in der C-terminalen Domäne.

Die α -Untereinheit des Insulinrezeptors ohne gebundenen Liganden wirkt inhibitorisch auf die Kinaseaktivität, da enzymatische oder vollständige Entfernung der extrazellulären Domänen die Kinase konstitutiv aktiviert (Shoelson *et al.*, 1988; Clark *et al.*, 1991; Ellis *et al.*, 1987; Lebowitz *et al.*, 1991). Insulin, das in den B-Zellen des Pankreas gebildet wird, aktiviert den Rezeptor in einem analogen Mechanismus wie monomere Rezeptoren, nach dem das Hormon sich wie ein divalenten Ligand verhält, der die Rezeptormonomere quervernetzt und so zur Aktivierung der Tyrosinkinase führt (Schlessinger 1988; De Meyts *et al.*, 1994; Lemmon und Schlessinger, 1994). Obwohl der Insulinrezeptor ein funktionelles Dimer darstellt, führt erst Insulinbindung zu einer Modifikation des α -Untereinheiten-Dimers, so daß überwiegend trans-Autophosphorylierung zwischen den β -Untereinheiten vermittelt werden kann (Treadway *et al.*, 1991; Frattali *et al.*, 1992; Ballotti *et al.*, 1989; Lammers *et al.*, 1990; Tartare *et al.*, 1991). Sowohl Insulin als auch der Rezeptor besitzen je zwei unabhängige Bindungsstellen füreinander, die eine Quervernetzung zwischen den kovalent verbundenen α -Untereinheiten bewirken sollen (De Meyts 1995). Die Cysteine 524 und 682 bilden Disulfidbrücken zwischen zwei α -Untereinheiten (Lu und Guidotti, 1996), während C647 und C872 die Verknüpfung zwischen den α - β -Untereinheiten bewirken sollen (Cheatham und Kahn, 1992; Sparrow *et al.*, 1997). Dimerisierung scheint jedoch nicht essentiell zu sein, da monomere Rezeptoren (mit C524S und C682S) sich in Autophosphorylierungsreaktionen annähernd wie native Rezeptoren verhalten (Lu und Guidotti, 1996).

Die 23 Aminosäuren umfassende Transmembrandomäne vermittelt das extrazelluläre Insulinsignal zur intrazellulären Tyrosinkinase. Der genaue Mechanismus ist unbekannt, doch wird vermutet, daß die Transmembrandomäne die durch Insulin induzierten Konformationsänderungen stabilisiert (Frattali *et al.*, 1991; Yamada *et al.*, 1992; Longo *et al.*, 1992; Cheatham *et al.*, 1993). Die Autophosphorylierung findet an mindestens 6 Tyrosinen statt, Y960 in der Juxtamembrandomäne (möglicherweise auch Y953), einem Cluster in der Kinasedomäne (Y1146, Y1150 und Y1151) und Y1316 und Y1322 im C-Terminus (Tornqvist *et al.*, 1987; Tavaré *et al.* 1988; Kohanski 1993b). Zudem wird eine Autophosphorylierung an Serinresten beobachtet (Al-Hasani *et al.*, 1997; s. 2.6). Die Phosphorylierung der drei Tyrosine der Kinasedomäne ist für die Kinaseaktivität auf exogene Substrate notwendig (White *et al.*, 1998b; Flores-Riveiros *et al.*, 1989). Die Autophosphorylierung aller drei Tyrosine aktiviert die Kinase 10-20fach (White *et al.*, 1998b). Wird das für die ATP-Bindung essentielle K1018 substituiert, besitzt die Kinase keine Aktivität mehr, wodurch die Insulin-Signalweiterleitung unterbrochen wird (Chou *et al.*, 1987; McClain *et al.*, 1987; Tennagels 1998). Dazu zählen Glukosetransport, Glykogensynthese, Aminoisobuttersäureaufnahme, die Aktivierung der Mitogen

Activated Protein-Kinase (MAP-Kinase) und der S6-Kinase, Thymidinaufnahme und Transkription von c-fos und Egr1 (Ebina *et al.*, 1987; Stumpo und Blackshear, 1991), wahrscheinlich auch die Internalisierung des Insulinrezeptors (Hari und Roth, 1987; Russell *et al.*, 1987; Grako *et al.*, 1992; Backer *et al.*, 1991b).

2.2 Die intrazellulären Domänen und die Bedeutung der Autophosphorylierungsstellen

2.2.1 Die Juxtamembranregion

Die Juxtamembranregion des Insulinrezeptors umfaßt die Aminosäurereste 941-981 und besitzt mehrere Serinphosphorylierungsstellen sowie mindestens eine Tyrosinauto-phosphorylierungsstelle in einem NPxY960-Motiv (Feener *et al.*, 1993). Y953 stellt eine weitere potentielle Phosphorylierungsstelle dar (Kohanski 1993b). *In vitro* und *in vivo* inkorporiert der Holorezeptor 30 % der Radioaktivität in die Juxtamembrandomäne (Kayatz 1994; Feener *et al.*, 1993). Andere Untersuchungen hingegen deuten darauf hin, daß diese Region in der intakten Zelle keinen Hauptphosphatakzeptor darstellt (Tavaré *et al.*, 1988; White *et al.*, 1988b; Tornqvist *et al.*, 1988; Issad *et al.*, 1991). Die Juxtamembrandomäne ist essentiell für die Signalweiterleitung und Insulinrezeptor-Internalisierung. Die Signaltransduktion erfolgt vermutlich durch Kopplung an Phosphotyrosin bindende (PTB) Domänen der Proteine der IRS-Familie und Shc (s. 2.3). Mutationsanalysen an Y960 und Y953 und deren Umgebung führen zu uneinheitlichen Ergebnissen, Y960 scheint aber *in vivo* hauptverantwortlich für die Signalweiterleitung zu sein (White *et al.*, 1988a; Kaburagi *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1995; Yamasaki *et al.*, 1992; Backer *et al.*, 1991a; Murakami und Rosen, 1991; Thies *et al.*, 1990). Homologievergleiche des NPEY-Motivs bei Rezeptoren, die IRS-1 phosphorylieren, ergeben ein längere Konsensussequenz mit dem Motiv LxxxxNPxYxSxSD, welches die bevorzugte Erkennungsstelle für IRS-Proteine darstellen könnte (Keegan *et al.*, 1994) und an die PTB-Domäne der IRS-Proteine und Shc bindet (Sun *et al.*, 1995; Wolf *et al.*, 1995). Für die Internalisierung scheinen die Bereiche um Y953 und Y960 eine wichtige Rolle zu spielen, eine präzise Zuordnung und die relativen Beiträge der Sequenzen sind aber umstritten (Backer *et al.*, 1990, 1991b und 1992c; Murakami und Rosen, 1991; Thies *et al.*, 1990; Berhanu *et al.*, 1991; Rajagopalan *et al.*, 1991).

2.2.2 Die Tyrosinkinasedomäne

Eines der ersten Ereignisse nach Insulinbindung ist die Autophosphorylierung der Tyrosine 1146, 1150 und 1151. Diese befinden sich in der katalytischen oder Kinasedomäne (Aminosäurereste 982-1244), die 11 Subdomänen beinhaltet (Hanks *et al.*, 1988). Im Zentrum ist die katalytische Schleife (Reste 1118-1125) mit der katalytischen Base D1120 lokalisiert, der sich die Aktivierungs- (Reste 1136-1158) und die P+1-Schleife

(Reste 1159-1167) anschließen. Im Gegensatz zum Insulinrezeptor besitzen die meisten anderen Proteintyrosinkinasen nur ein oder zwei homologe Tyrosine in der Aktivierungsschleife, wobei Y1151 die bei weitem höchste Homologie unter allen Kinasen besitzt (Hanks 1991). Bei vielen Serin-/Threoninkinasen findet sich an dieser Position ein Threonin; auf diese Tatsache wird weiter unter eingegangen. Zahlreiche Mutationsanalysen wurden durchgeführt, um die individuelle Rolle der einzelnen Tyrosine für die metabolen und mitogenen Antworten zu ermitteln. Keines der Tyrosine ist *in vitro* essentiell für die Autophosphorylierung der anderen Tyrosine (Zhang *et al.*, 1991; Tavaré und Dickens, 1991; Dickens und Tavaré, 1992; Wilden *et al.*, 1992a). Monosubstitutionen führen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* meist zu einer leichten Verringerung der Tyrosinkinaseaktivität und der *in vivo*-Phosphorylierung von IRS-1 (Zhang *et al.*, 1991; Wilden *et al.*, 1990, 1992a und b; Murakami und Rosen, 1991; Ellis *et al.*, 1986; Yonezawa und Roth, 1991). Eine stärkere Reduktion ergibt sich bei Disubstitutionen der Tyrosine, wobei die Tyrosine 1150 und 1151 offenbar am meisten zur Aktivität beitragen (Wilden *et al.*, 1992a). Werden all drei Tyrosine gegen Phenylalanin ausgetauscht, ist die Kinaseaktivität stark reduziert. Diese Daten sind konsistent mit der Idee, daß die Autophosphorylierung der Tyrosine 1146, 1150 und 1151 essentiell für die Kinaseaktivität auf Substrate ist (White *et al.*, 1988b; Flores-Riveiros *et al.*, 1989; Dickens und Tavaré, 1992; Herrera und Rosen 1986; Tornqvist und Avruch, 1988).

In Bezug auf Glukosetransport und Glykogensynthese zeigt der Austausch der Tyrosine 1150 und 1151 ebenfalls die stärksten Auswirkungen, wobei der Glukosetransport einer zeitlichen Verzögerung unterliegt (Desbois *et al.*, 1992; Wilden *et al.*, 1992b; Murakami und Rosen, 1991; Wilden *et al.*, 1990; Ellis *et al.*, 1986; Debant *et al.*, 1988; Cherqui *et al.*, 1990). Der Austausch aller drei Tyrosine führt zur völligen Inhibition des insulinvermittelten Glukosetransports und der Glykogensynthese (Wilden *et al.*, 1992b; Murakami und Rosen, 1991).

In vivo-Untersuchungen der insulinstimulierten Thymidininkorporation führen zu kontroversen Ergebnissen. Monosubstitutionen zeigen generell nur geringe Auswirkungen (Wilden *et al.*, 1992b). Disubstitution von Y1150 und Y1151 in CHO-Zellen führt bei zwei Arbeitsgruppen zur Blockierung der Thymidininkorporation (Wilden *et al.*, 1992b; Yonezawa *et al.*, 1991), während eine andere Arbeitsgruppe dies nicht bestätigen kann (Debant *et al.*, 1988). Die Tripelsubstitution erweist sich in CHO-Zellen als inaktiv in Bezug auf die Thymidinaufnahme (Wilden *et al.*, 1992b; Murakami und Rosen, 1991), in HTC-Zellen aber als normal (Rafaeloff *et al.*, 1991). Diese Diskrepanzen sind möglicherweise auf generelle Beschränkungen der *in vivo*-Untersuchungen zurückzuführen (Tavaré und Siddle, 1993). So weisen die für stabile Transfektionen verwendeten Zelllinien (CHO, NIH3T3- und Ratten-Fibroblasten, HTC) selbst nach Überexprimierung des Insulinrezeptors eine schlechte Insulinantwort auf; Insulin wird daher für die meisten Zellen als ein schwaches Mitogen betrachtet. Zudem wird die Betrachtung durch das Vorhandensein endogener Wildtyp-Insulinrezeptoren erschwert. Weiterhin können

klonale Variationen auftreten, durch die z. B. die basale, insulinunabhängige Antwort zwischen transfizierten Klonen schwanken kann. Auch ist der Gebrauch unterschiedlicher Zelllinien und Rezeptorkonstrukte zu berücksichtigen, die verwendet werden, um die Konsequenzen von Mutationen zu untersuchen. Schließlich ist zu beachten, daß in vielen Zelllinien IGF1-Rezeptoren vorhanden sind, die Insulinsignale weiterleiten könnten. So führt die insulinabhängige Stimulation der Thymidininkorporation bei NIH3T3-Zellen zu einer wenig sensitiven Antwort, was darauf hindeutet, daß das Signal über den IGF1-Rezeptor vermittelt wird (De Meyts *et al.*, 1995).

Widersprüche ergeben sich auch bei Untersuchungen der S6-Kinase-Aktivierung. YY1150/1151FF-Substitution führt zur Inhibition der durch Insulin induzierten S6-Kinase-Aktivität *in vitro* (Boulton *et al.*, 1990; Dickens *et al.*, 1992), hat aber keinen Effekt auf diese *in vivo* (Debant *et al.*, 1988). Der Austausch aller drei Tyrosine blockiert die Fähigkeit von Insulin, nicht aber von Antirezeptor-Antikörpern, die S6-Kinase zu aktivieren (Sung 1992; Sung *et al.*, 1992).

Übereinstimmend wird berichtet, daß die Substitution jedes der drei Tyrosine die Internalisierung des Insulinrezeptor beeinträchtigt (Wilden *et al.*, 1992b; Reynet *et al.*, 1990). Folglich sind drei Regionen des Rezeptors notwendig für die normale Internalisierung, die ATP-Bindungsstelle, die Internalisierungssequenz(en) der Juxtamembrandomäne und die Autophosphorylierung der Kinasedomäne (McClain 1992). Dies deutet darauf hin, daß Autophosphorylierung eine Konformationsänderung hervorruft, die zur Freilegung der Internalisierungssequenz der Juxtamembranregion führt. Konformationsänderungen in der Tyrosinkinasedomäne, die abhängig von sowohl Insulin als auch der Autophosphorylierung sind, lassen sich mit Antipeptid-Antikörpern nachweisen (Perlman *et al.*, 1989; Baron *et al.*, 1990 und 1992).

Von einer löslichen Insulinrezeptorkinase (IRK) existieren Röntgenkristallstrukturen der nicht phosphorylierten und der phosphorylierten Form (Abb. 1; Hubbard *et al.*, 1994; Hubbard 1997). Das kristallisierte Fragment umfaßt die Aminosäuren 966 bis 1271 mit den Aminosäureaustauschen C969A und Y972F. Damit fehlen ein Teil der Juxtamembrandomäne und annähernd vollständig die C-terminale Domäne. Somit ist keine Aussage über eine mögliche direkte Interaktion des C-Terminus mit dem aktiven Zentrum möglich, wie dies bei anderen Kinasen nachgewiesen wurde (Taylor *et al.*, 1995). Als Autophosphorylierungsstellen sind die drei Tyrosine der katalytischen Domäne vorhanden.

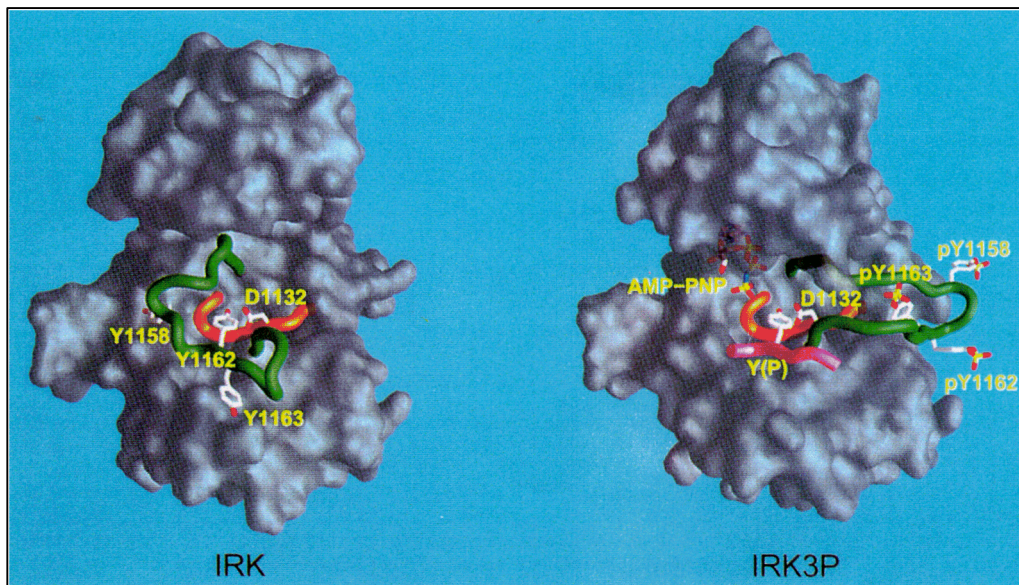


Abb. 1 Kristallstruktur der nicht phosphorylierten (IRK) und der trisphosphorylierten (IRK3P) Form der Insulinrezeptorkinase. Hervorgehoben ist die Aktivierungsschleife (grün) mit den Tyrosinen Y1146 (= Y1158; Nomenklatur nach Ebina *et al.*, 1985), Y1150 (= Y1162) und Y1151 (= Y1163) und die katalytische Schleife (orange) mit der katalytischen Base D1120 (= D1132). Das Substrat ist rosa, Kohlenstoffatome sind weiß, Stickstoffatome blau, Sauerstoffatome rot und Phosphoratome gelb dargestellt. Aus: Hubbard 1997.

Die lösliche Insulinrezeptorkinase ist in der Globalstruktur der cyclic AMP-dependent Proteinkinase (cAPK) sehr ähnlich und besteht wie diese aus zwei Lappen, wobei das aktive Zentrum in einem Spalt zwischen diesen beiden lokalisiert ist. Dieser Spalt ist, bedingt durch die relative Orientierung des Lappen zueinander, gegenüber der cAPK weiter geöffnet. Der kleinere aminoterminalen N-Lappen umfaßt fünf antiparallele β -Faltblätter und eine α -Helix und dient primär der ATP-Bindung. Der größere carboxyterminale C-Lappen weist acht α -Helices und vier β -Faltblätter auf und umschließt die Elemente des Katalyse und der Substratbindung.

Die Struktur der nicht phosphorylierten Form legt einen autoinhibitorischen Mechanismus nahe, bei dem Y1150 in der Aktivierungsschleife mit Proteinsubstraten um die Bindung im aktiven Zentrum kompetitiert, während Aminosäurereste der konservierten DFG-Sequenz im Beginn der Aktivierungsschleife den Zugang des ATP einschränken, so daß cis-Phosphorylierung des Y1150 verhindert wird. Y1150 ist mit der katalytischen Base D1120 über eine Wasserstoffbrücke verbunden. Allerdings ist nicht bekannt, ob diese Form der nicht aktivierten Kinase in der Zelle existiert, wo die ATP-Konzentration im millimolaren Bereich liegt (Taylor *et al.*, 1995). Möglicherweise existiert eine zweite basale Form, die ATP binden kann, welche durch die Juxtamembrandomäne in der Nähe des aktiven Zentrums aber inhibiert wird (Cann und Kohanski, 1997; Bishop *et al.*, 1998).

Die trisphosphorylierte Form der Kinase wurde in Gegenwart eines nichthydrolysierbaren ATP-Analogs (AMP-PNP) und eines 18 Aminosäurereste umfassenden Peptidsubstrats kristallisiert. Das Substrat ist von einer mutmaßlichen Insulinrezeptor-Phosphorylierungsstelle des IRS-1 um Y727 in einem YxxM-Motiv abgeleitet (Sun *et al.*, 1993). Autophosphorylierung der drei Tyrosine führt zu einer großen Konformationsänderung der Aktivierungsschleife, so daß ATP und Substrate ungehinderten Zugang erhalten. Stabilisiert wird die trisphosphorylierte Aktivierungsschleife durch Wasserstoffbrücken zwischen pY1151 und R1143 plus dem Amid-Stickstoff von G1154 sowie zwei Brücken zwischen pY1150 und R1164. Zusätzlich finden Wechselwirkungen zwischen dem phenolischen Ring des pY1151 und dem aliphatischen Teil von R1143 statt. Einzig pY1146 macht keine Proteinkontakte und weist eine gute Zugänglichkeit auf. Die Konformation (Abb. 2) ist vergleichbar der monophosphorylierten Aktivierungsschleife der cyclic AMP-dependent Proteinkinase (cAPK) (Knighton *et al.*, 1991), Cyclin-dependent Proteinkinase (CDK2) (Russo *et al.*, 1996) und der Src-Familie Tyrosinkinase LCK (Yamaguchi und Hendrickson, 1996). pY1151 der Insulinrezeptorkinase ist strukturell verwandt mit pT197 in der cAPK, pT160 in der CDK2 und pY394 in der LCK. Das für die ATP-Bindung essentielle K1018 bindet über eine Wasserstoffbrücke an das α -Phosphat, während eine weitere Brücke vom Amid-Stickstoff des S994 das β -Phosphat bindet. Das Peptidsubstrat ist, bedingt durch die längere Seitenkette des Tyrosins gegenüber Serin/Threonin, signifikant weiter vom N-Lappen entfernt als in der Serin-/Threoninkinase cAPK. Die Hydroxylgruppe des phosphorylierten Substrattyrosins ist über eine Wasserstoffbrücke mit der Carboxylatgruppe der katalytischen Base D1120 verbunden, welche somit in Position für die Aufnahme eines Protons ist. Die Konformation der P+1-Schleife (Aminosäurereste 1159-1167) könnte eine Erklärung für die Substratspezifität für Tyrosin gegenüber Serin/Threonin geben: nur die Seitenkette eines Tyrosins ist lang genug, um in das aktive Zentrum zu reichen. Das γ -Phosphat des AMP-PNP ist im Gegensatz zur cAPK zu weit entfernt für einen direkten „inline“ (assoziativen) Phosphotransfer, der für cAPK postuliert wird (Madhusudan *et al.*, 1994). Möglich erscheint eine dissoziativer oder gemischt assoziativ-dissoziativer Phosphotransfer-Mechanismus (Bramson *et al.*, 1984; s. 2.4.2).

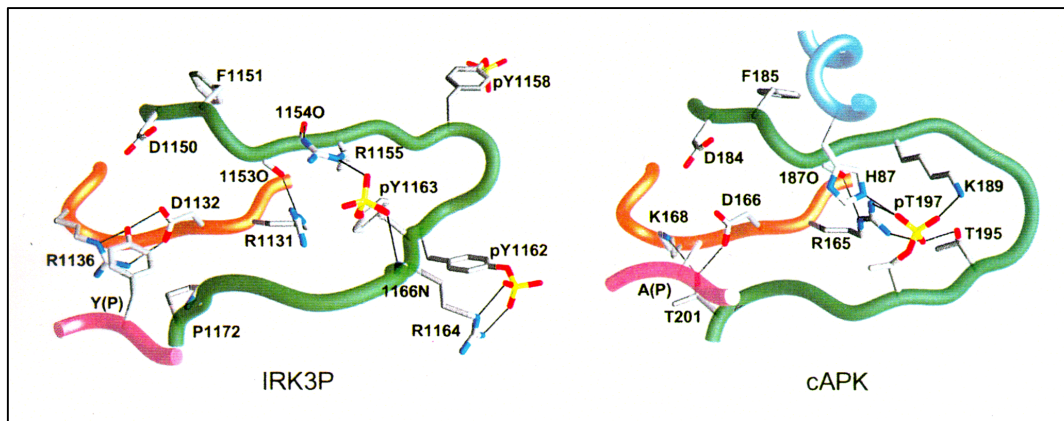


Abb. 2 Vergleich der phosphorylierten Aktivierungsschleifen der Insulinrezeptorkinase (IRK3P) und der cAPK. Ausgewählte Wasserstoffbrücken sind als schwarze Linien gezeichnet. Kohlenstoffatome sind in grau dargestellt, ansonsten Farbgebung wie in Abb. 1. Aus: Hubbard 1997.

Ungeklärt bleibt der grundsätzliche Unterschied zwischen Tyrosin- und Serin-/Threoninkinasen. Aus Sequenzvergleichen ergeben sich charakteristische Regionen in der katalytischen Schleife (YRDLKPEN in cAPK und HRDLAARN in IRK) und in der P+1-Schleife (TPEYLAPE in cAPK und PVRWMAPE in IRK). Im Vergleich der Konformationen ergeben sich aber auffallend ähnliche Strukturen der phosphorylierten Aktivierungs- und katalytischen Schleifen. Einzig die P+1-Schleife weist Unterschiede auf. Bei der IRK sind im Gegensatz zur cAPK keine Interaktionen zwischen der Nukleotidbindungsschleife und dem Peptidsubstrat erkennbar, bedingt durch weitere Entfernung des Substrats vom N-terminalen Lappen (Hubbard 1997). Das γ -Phosphor-Atom von AMP-PNP ist weiter vom Substrattyrosin entfernt als bei cAPK, doch der eigentliche Reaktionsmechanismus ist ungeklärt.

2.2.3 Die C-terminale Domäne

Proteintyrosinkinasen besitzen ausnahmslos eine carboxyterminale Verlängerung hinter der homologen Tyrosinkinase-Region. Der C-Terminus des Insulinrezeptors, der durch Exon 22 kodiert wird (Aminosäurereste 1245-1343), weist mit ca. 45 % eine nur begrenzte Homologie zu dem des IGF1-Rezeptors auf (Ullrich *et al.*, 1986) und eine geringe Homologie zu anderen löslichen oder Wachstumsfaktor-Proteintyrosinkinasen (Hanks *et al.*, 1988). Innerhalb der Arten ist der C-Terminus aber hoch konserviert, wie der Vergleich von humanen zu Maus- oder Ratten-Insulinrezeptor zeigt (über 90 %). Mit Y1316 und Y1322 befinden sich zwei Autophosphorylierungsstellen in diesem Bereich sowie diverse Serin-/Threoninphosphorylierungsstellen (s. 2.6). Mutationsanalysen liefern widersprüchliche Daten, welche Rolle der C-Terminus für die Insulinrezeptor-Funktion spielt. Die längste Deletion des C-Terminus, die *in vivo* zu einer stabilen β -Untereinheit führt, ist 69 Aminosäuren lang (Chin *et al.*, 1991; Dickens *et al.*, 1992; Tavaré *et al.*, 1992).

In vitro verhält sich eine um 72 Aminosäuren verkürzte lösliche Kinase ähnlich wie der Wildtyp (Wei *et al.*, 1995). Die Deletion von 43 Aminosäuren hat *in vivo* kaum Auswirkungen auf die Insulinrezeptor-Autophosphorylierung und Internalisierung (McClain *et al.*, 1988; Myers *et al.*, 1991), führt aber in Rat-1 Zellen zu verringerten metabolen und verstärkten mitogenen Signalen (Maegawa *et al.*, 1988; Thies *et al.*, 1989). In CHO-Zellen hingegen sind keine Unterschiede zum Wildtyp feststellbar (Myers *et al.*, 1991). Selbst die Deletion von 82 Aminosäuren hat *in vivo* wenig Einfluß auf Substratphosphorylierung und nachfolgende biologische Effekte, allerdings ist die insulinstimulierte Autophosphorylierung signifikant verringert (Yamamoto-Honda *et al.*, 1993). Es wird vermutet, daß der Verlust der C-terminalen Tyrosinphosphorylierungsstellen Y1316 und Y1322 verantwortlich für die erhöhten mitogenen Signale sein könnte (Myers *et al.*, 1991). Sowohl in Rat-1- als auch CHO-Zellen weist eine YY1316/1322FF-Mutante verstärkte mitogene Effekt auf (Takata *et al.*, 1991 und 1992; Ando *et al.*, 1992), wobei die Tyrosinphosphorylierung exogener Substrate normal bis erhöht erscheint. Die C-terminalen Tyrosine verhalten sich in diesen Versuchen wie Inhibitoren des mitogenen Signalwegs des Wildtyp-Insulinrezeptors. Interessanterweise besitzt der IGF1-Rezeptor im C-Terminus nur ein Tyrosin (entspricht Y1322 des Insulinrezeptors) und zeigt ein größeres Potential der mitogenen Signalweiterleitung als der Insulinrezeptor (Lammers *et al.*, 1989). Y1322 liegt in einem YxxM-Motiv, das eine Erkennungssequenz für SH2-Domänen wie die der p85-Untereinheit der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K, s. 2.3.1 und 2.3.5) darstellt (Backer *et al.*, 1992a; Escobedo *et al.*, 1991) und sich auch anderen Wachstumsfaktor-Rezeptoren und IRS-Proteinen findet. Mehrere Untersuchungen legen nahe, daß PI3K direkt an das phosphorylierte Y1322 bindet (Levy-Toledano *et al.*, 1994; Van Horn *et al.*, 1994). Die Deletionsmutante mit 43 Aminosäuren, der das SH2-Bindungsmotiv fehlt, zeigt aber weiterhin normale PI3K-Aktivierung (Backer *et al.*, 1991a; Murakami und Rosen, 1991); in Zellen ohne IRS-Proteine wird keine Assoziation der PI3K mit dem Insulinrezeptor beobachtet (Myers Jr *et al.*, 1994). Es scheint, daß *in vivo* PI3K nur indirekt via IRS-1 mit dem Insulinrezeptor interagiert. Der C-Terminus spielt offenbar eher eine Rolle bei der Regulation des Insulinsignals als bei der Rekrutierung von SH2-Proteinen. Peptid-Antikörper gegen die Region um die beiden Tyrosine deuten darauf hin, daß es in Folge von Insulinbindung und Autophosphorylierung zu Konformationsänderungen im C-Terminus kommt (Baron *et al.*, 1990 und 1991; Gual *et al.*, 1996).

2.3 Signaltransduktion

Nach Aktivierung und Autophosphorylierung des Insulinrezeptors bilden sich Signalkomplexe. Die Spezifität des Signals wird durch selektive Bindung der autophosphorylierten Stellen an Proteine mit komplementären Src homology 2-Domänen (SH2-Protein) (Pawson 1995) kontrolliert. Die SH2-Domäne besteht aus etwa 100 Aminosäureresten (Pawson 1995), die hochaffin ($K_d \sim 0,1-1 \mu\text{M}$) an Phosphotyrosine in einem spezifischen Aminosäurekontext bindet (Kuriyan und Cowburn, 1997). Einige Proteine im Signalkomplex werden durch Bindung an phosphorylierte Motive und andere durch direkte Phosphorylierung aktiviert; die subzelluläre Verteilung der SH2-Proteine könnte ebenfalls zur Signalspezifität beitragen. Im Folgenden werden die wichtigsten bekannten Signalmoleküle beschrieben.

2.3.1 IRS-Proteine

Die Familie der IRS-Proteine umfaßt derzeit 4 Mitglieder, von denen **IRS-1** das am besten charakterisierte Insulinrezeptor-Substrat ist (Myers Jr und White, 1995). Obwohl IRS-1 als Substrat des Insulinrezeptors entdeckt wurde, stellt es auch ein Substrat für mehrere andere Rezeptorsysteme wie die IL6-Familie, IL2-Familie, Interferone und TrkB dar (White 1997; Yamada *et al.*, 1997). IRS-1 besitzt ein rechnerisches Molekulargewicht von 132 kDa und retardiert im SDS-PAGE auf Grund des hohen Phosphorylierungsstatus apparent bei 185 kDa (White *et al.*, 1985; Sun *et al.*, 1991; Araki *et al.* 1994a). Im N-terminalen Bereich finden sich zwei 100-150 Aminosäurereste große IRS Homologie-Domänen IH1 und IH2, von denen IH1 einer Pleckstrin Homologen (PH) und IH2 einer Phosphotyrosin Bindenden (PTB) Domäne entspricht (Sun *et al.*, 1995). Darin anschließend ist eine 150 Aminosäurereste große SAIN-Domäne (Shc and IRS-1 NPxY-Bindungsdomäne) lokalisiert, die eine Ansammlung kurzer konservierter Motive inklusive bekannter Tyrosinphosphorylierungsstellen beinhaltet und an der Signalweiterleitung beteiligt ist (Gustafson *et al.*, 1995; Craparo *et al.*, 1995; O'Neill *et al.*, 1994). IRS-1 besitzt 21 potentielle Phosphorylierungsstellen vor allem im C-terminalen Bereich, von denen mindestens 8 durch den Insulinrezeptor phosphoryliert werden (Songyang *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 1991 und 1993). Die Bindung von IRS-1 an das NPxY960-Motiv des Insulinrezeptors erfolgt über die IH2^{PTB}- und/oder IH1^{PH}-Domäne (Myers Jr *et al.*, 1995; Gustafson *et al.*, 1995; Craparo *et al.*, 1995; Yenush L. *et al.*, 1996b).

IRS-2 ist IRS-1 sehr ähnlich und besitzt die gleichen Domänen, unterscheidet sich aber in Anzahl und Art der Phosphorylierungsstellen (Miralpeix *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1993a und b; Sun *et al.*, 1995). Die Bindung an den Rezeptor scheint über die PTB-Domäne und über eine IRS-2-eigene KRLB-Domäne (kinase regulatory binding) stattzufinden, die mit den phosphorylierten Tyrosinen der katalytischen Domäne interagiert (Sawka-Verhelle *et al.*, 1996). IRS-2 aktiviert wie IRS-1 den Glukosetransporter GLUT4 (Zhou *et al.*, 1997). In Hepatozyten scheint IRS-2 der Haupteffektor für metabolische und

wachstumsfördernde Prozesse zu sein (Rother *et al.*, 1998). Eine Kopplung des Leptin-signalwegs an den Insulinrezeptorsignalweg könnte durch IRS-2 stattfinden, da dieses nach Leptinstimulation phosphoryliert wird und die PI3K aktiviert (Kellerer *et al.*, 1997). **IRS-3** ist mit 60 kDa deutlich kleiner, besitzt aber dennoch eine PH- und eine PTB-Domäne (Lavan *et al.*, 1997b). In Adipozyten bindet IRS-3 schneller als IRS-1 oder IRS-2 an PI3K und ist das vorherrschende Insulinrezeptorsubstrat in Abwesenheit von IRS-1 (Smith-Hall *et al.*, 1997). IRS-3 interagiert *in vivo* mit den SH2-Domänen von PI3K und SHP-2, nicht aber von PLC- γ (Ross *et al.*, 1998). Da IRS-3 vor allem an der Plasmamembran lokalisiert ist, könnte ihm eine wichtige Rolle bei der Regulation des GLUT4-Transporters zukommen (Kelly und Ruderman, 1993).

Das 160 kDa große **IRS-4** besitzt ebenfalls eine PH- und eine PTB-Domäne (Kuhne *et al.*, 1995; Lavan *et al.*, 1997a). IRS-4 bindet die SH2-Domänen von PI3K und Grb2, jedoch nicht von SHP-2 oder PLC- γ (Fantin *et al.*, 1998).

IRS-Proteine regeln die Kontrolle des Glukose-Metabolismus, Proteinsynthese und Zellüberleben, -wachstum und -transformation. Eine Unterbrechung des Gens für IRS-1 führt bei Mäusen zu Wachstumsstörungen, aber nicht zur Ausbildung von Diabetes, da sich die Insulinsekretion erhöht und so die milde Insulinresistenz kompensiert wird; zudem findet teilweise eine Signalweiterleitung über andere IRS-Proteine statt (Araki *et al.* 1994b; Tamemoto *et al.*, 1994; Bruning *et al.*, 1997). Eine IRS-2 defiziente Maus hingegen zeigt Diabetes Typ II-Symptome mit sowohl Insulinresistenz in der Leber und der Skelettmuskulatur als auch das Fehlen einer über B-Zellen vermittelten Kompensation dieser Resistenz (Whithers *et al.*, 1998).

Das Insulinrezeptorhomolog aus *Drosophila* (**DIR**) besitzt eine ca. 400 Aminosäurereste große, C-terminale Verlängerung, die funktionell dem humanen IRS-1 ähnelt (Ruan *et al.*, 1995). Durch dieses IRS-1-Homolog interagiert ein chimärer, insulinbindender DIR direkt mit der PI3K, jedoch ist für mitogene Effekte das zusätzliche Vorhandensein von IRS-1 essentiell (Yenush L. *et al.*, 1996a).

Zwei weitere kleine Proteine sind zur IRS-Familie zu zählen, **Gab1** und **p62^{dok}**. Gab1 (Grb2-associated binder-1) ist ein Substrat des EGF- und des Insulinrezeptors und besitzt eine PH-, aber keine PTB-Domäne (Holgado-Madruga *et al.*, 1996). Nach Phosphorylierung bindet Gab1 die SH-2-Domänen von PI3K und SHP-2. *In vitro* ist die PH-Domäne nicht essentiell für die Wechselwirkung mit dem Insulinrezeptor, wohl aber *in vivo* für die Assoziation mit SHP-2 (Rocchi *et al.*, 1998). Als Substrat des Insulinrezeptors scheint der Signalweg jedoch über die PI3K und nicht über SHP-2 abzulaufen (Lehr 1998).

p62^{dok} besitzt eine PH- und möglicherweise ein PTB-Domäne, die beide aber wenig Homologien zu den der anderen IRS-Proteine aufweisen (Eck *et al.*, 1996). Das Protein dient vielen Proteintyrosinkinasen als Substrat (Yamanashi und Baltimore, 1997). Als einziges IRS-Protein reguliert p62^{dok} nicht die PI3K.

IRS-1 wird *in vivo* insulinabhängig an Serinresten phosphoryliert, wodurch die Tyrosinphosphorylierung des IRS-1 durch den Insulinrezeptors inhibiert wird; zudem ist eine basale Serinphosphorylierung nachweisbar (Sun *et al.*, 1992). Okadasäure, ein Inhibitor von Serin-/Threoninphosphatasen, führt *in vivo* zu einer Erhöhung der Serinphosphorylierung von IRS-1 (Tanti *et al.*, 1994). Als wichtiges Element ist die durch TNF- α (Tumor Necrosis Factor) induzierte Serin-/Threoninphosphorylierung des IRS-1 erkannt worden. Die Expression von TNF- α ist bei Adipositas im Fettgewebe erhöht und korreliert mit der Höhe der Hyperinsulinämie; Rattenmodelle bestätigen diese Hypothese (Hotamisligil *et al.*, 1994 und 1995). TNF- α induziert über eine nicht identifizierte Kinase eine Serinphosphorylierung des IRS-1 in kultivierten Adipozyten und Fao-Zellen, wodurch das Insulinsignal inhibiert wird (Hotamisligil *et al.*, 1996; Kanety *et al.*, 1995). Bemerkenswerterweise vermittelt IRS-1 die Inhibition des Insulinrezeptorkinase *in vitro*, und dieser Effekt ist abhängig von der Serinphosphorylierung des IRS-1 (Hotamisligil *et al.*, 1996). Sowohl die Serin-/Threoninphosphorylierung von IRS-1 als auch IRS-2 inhibiert deren Bindung an die Juxtamembrandomäne des Insulinrezeptors und beeinträchtigt ihre insulinstimulierte Tyrosinphosphorylierung (Paz *et al.*, 1997). Auch andere Kinasen sollen IRS-1 *in vivo* an Serinresten phosphorylieren, so die **Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)** (Tanti *et al.*, 1994; Freund *et al.*, 1995; Dhand *et al.*, 1994b), **Mitogenaktivierte Proteinkinase (MAP-Kinase)** (De Fea und Roth 1997b), **Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK-3)** (Eldar-Finkelman und Krebs, 1997), **Casein Kinase II (CKII)** (Tanasijevic *et al.*, 1993) und indirekt die **Proteinkinase C (PKC)** (Chin *et al.*, 1993; De Fea und Roth 1997a; Kellerer *et al.*, 1998). Phosphorylierte Serine im IRS-1 scheinen mit **14-3-3-Proteinen** zu assoziieren, die möglicherweise die Wechselwirkung zwischen Insulinrezeptor und IRS-1 unterbrechen könnten (Craparo *et al.*, 1997; Ogihara *et al.*, 1997).

2.3.2 Shc

Das Protein **Shc** (Src homology 2/ α -collagen-related protein), das in drei Isoformen existiert, bindet an das NPEY-Motiv in der Juxtamembrandomäne des aktivierten Insulinrezeptors. Die Bindung wird durch eine PTB-Domäne vermittelt, daneben besitzt das Protein eine SH2-Domäne und eine glycin-/prolinreiche Region (Pelicci *et al.*, 1992; Kaburagi *et al.*, 1995; O'Neill *et al.*, 1994; Isakoff *et al.*, 1996; Eck *et al.*, 1996). Die SH2-Domäne scheint eine wichtige funktionelle Rolle bei der Signaltransduktion des EGF-Rezeptors zu spielen (Ricketts *et al.*, 1996). Eine von Phosphotyrosinen abhängige Assoziation zwischen Shc und IRS-1 ist beschrieben worden (Kasus-Jacobi *et al.*, 1997).

2.3.3 Grb-Proteine

Eine neu entdeckte Familie von Proteinen, die direkt mit dem Insulinrezeptor interagieren, ist die Familie der **Grb-Proteine**, die aus Grb7, Grb10 und Grb14 besteht (Liu und Roth, 1995; O'Neill *et al.*, 1996; Frantz *et al.*, 1997; Stein *et al.*, 1994). Grb10 existiert in mindestens drei Isoformen, seine hochaffine Bindung an den aktivierten Insulinrezeptor scheint den Insulinsignalweg zu inhibieren (Liu und Roth, 1995). Allen Grb-Proteinen gemeinsam ist eine SH2-Domäne, eine prolinreiche Region, eine PH-Domäne und eine für Grb charakteristische BPS-Domäne (between PH and SH2, auch IPS genannt) (Ooi *et al.*, 1995; Margolis *et al.*, 1992; Daly *et al.*, 1996; He *et al.*, 1998). Die SH2- und die BPS-Domäne von Grb10 sind in einer kooperativen Weise wichtig für die Assoziation mit dem Insulinrezeptor *in vivo* und *in vitro*. Als Bindungsstelle für die beiden Domänen scheinen die autophosphorylierten Reste der Kinasedomäne zu dienen, möglicherweise auch das phosphorylierte Y1322 im C-Terminus (Dong *et al.*, 1997; He *et al.*, 1998; Hansen *et al.*, 1996). Grb10 scheint *in vivo* zu tetramersieren (Dong *et al.*, 1998). Interessanterweise bindet Grb10 nur schwach an den IGF1-Rezeptor und überhaupt nicht an den EGF-Rezeptor (Ooi *et al.*, 1995; He *et al.*, 1998). Anders als andere SH2-Proteine zeigt Grb10 *in vivo* keine Bindung an IRS-1, was auf eine von IRS-1 unabhängige Regulation des Insulinrezeptors hinweist (Hansen *et al.*, 1996).

2.3.4 Andere Proteine

Weitere Proteine, die direkt mit dem Insulinrezeptor interagieren sollen, sind identifiziert worden, so der Transkriptionsaktivator **STAT5b** (signal transducers and activators of transcription), der auch durch den EGF-Rezeptor phosphoryliert wird und eine Querverbindung zum JAK-STAT-Signalweg der Regulation der Genexpression darstellen könnte (Chen *et al.*, 1997; Sawka-Verhelle *et al.*, 1997). Das Protein **MAD2** (mitotic arrest deficient protein) assoziiert mit dem C-Terminus des Insulinrezeptors *in vivo* und *in vitro* auch dann, wenn der Rezeptor nicht phosphoryliert ist (O'Neill *et al.*, 1997). Das Plasmamembran-Glykoprotein **pp120** wird als Substrat vom Insulinrezeptor phosphoryliert und soll mit dessen C-Terminus interagieren (Najjar *et al.*, 1998). **PSM** (Pro-rich, PH, SH2 domain-containing signaling mediator) hat eine SH2-, eine PH-Domäne und drei prolinreiche Regionen und assoziiert *in vivo* und *in vitro* mit dem Insulinrezeptor, nicht aber mit IRS-1 (Riedel *et al.*, 1997). Die Proteintyrosin-Phosphatasen **PTP-1B** (Proteintyrosinphosphatase 1B) und **LAR** (Leukocyte antigen-related protein) sollen in die insulinabhängige Signaltransduktion verwickelt sein, allerdings ist ungeklärt, ob dieser Einfluß direkt oder indirekt mit dem Insulinrezeptor stattfindet (Bandyopadhyay *et al.*, 1997a; Ahmad und Goldstein, 1997; Byon *et al.*, 1998).

2.3.5 SH2-bindende Proteine

Ein Hauptmechanismus, den IRS-Proteine zur Signalweiterleitung verwenden, ist die direkte Bindung an SH2-Domänen verschiedener Signalproteine. Mehrere Enzyme und Adapterproteine, die mit IRS-1 assoziieren, sind identifiziert worden, so die **PI3K**, die **SHP-2**, die cytoplasmatische Tyrosinkinase **Fyn** und die Adapterproteine **Grb-2**, **Nck** und **Crk** (Myers *et al.*, 1994; Skolnik *et al.*, 1993a; Kuhne *et al.*, 1993; Sun *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1993; Beitner-Johnson *et al.*, 1996).

Das am besten charakterisierte Signalmolekül ist die Phosphatidylinositol-3 Kinase (**PI3K**). PI3K spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation biologischer Antworten auf verschiedene Hormone, Wachstumsfaktoren und Cytokine, wie der Mitogenese (Valius und Kazlauskas, 1993), Differenzierung (Kimura *et al.*, 1994), Chemotaxis (Kundra *et al.*, 1994; Okada *et al.*, 1994b), Membran-„Ruffling“ (Wennstrom *et al.*, 1994), Glykogensynthese, Proteinsynthese, antilipolytischen Effekten und der insulinstimulierten Translokation des GLUT4-Glukosetransporters zur Plasmamembran (Okada *et al.*, 1994a). Das Enzym besteht aus einer 110 kDa katalytischen Untereinheit (p110) und einer regulatorischen Untereinheit, von der fünf Isoformen bekannt sind (p85 α , p85 β , p50 α , p55 α , p55^{PIK}). Diese enthalten zwei SH2-Domänen und ein bis zwei prolinreiche Regionen, die p85-Isoformen zusätzlich eine SH3 (Src homolgy-3)-Domäne (Dhand *et al.*, 1994a; Fruman *et al.*, 1996). Diese prolinreiche Region von etwa 60 Aminosäureresten dient der Adaption an weitere Signalproteine über die Bindung charakteristischer PxxP-Motive (Kuriyan und Cowburn, 1997). Die Bindung der SH2-Domänen von p85 an phosphorylierte YxxM-Motive in IRS-1 aktiviert die assoziierte katalytische Untereinheit (Backer *et al.* 1992b). Der weitere Signalweg ist komplex und nicht vollständig verstanden und soll über PDK1, PKB/Akt, PKC ζ , GSK-3, FRAP und p70^{S6K} verlaufen (Alessi *et al.*, 1996; Cohen *et al.*, 1997; Bandyopadhyay *et al.*, 1997b; White 1998; Ogawa *et al.*, 1998). Unverstanden bleibt allerdings, daß auch andere Rezeptoren die PI3K aktivieren können, ohne daß es zur Stimulierung der Glukoseaufnahme kommt (Saltiel und Ohmichi, 1993; Isakoff *et al.*, 1995). Es gibt Hinweise, daß p85 direkt mit dem phosphorylierten Y1322 des C-Terminus des Insulinrezeptors interagieren kann. Allerdings ist unwahrscheinlich, daß dies *in vivo* stattfindet, da in Zellen ohne IRS-Proteine keine Assoziation der PI3K mit dem Insulinrezeptor zu beobachten ist und ein Insulinrezeptor mit verkürztem C-Terminus normale Aktivierung der PI3K zeigt (Staub *et al.*, 1994; Levy-Toledano *et al.*, 1994; Van Horn *et al.*, 1994; Myers Jr *et al.*, 1994; Backer *et al.*, 1992b; s. 2.2.3).

SHP-2 (auch PTP-1D, SH-PTP2 oder Syp genannt) ist eine 65 kDa Phosphotyrosin-Phosphatase mit zwei SH2-Domänen. Was SHP-2 von den meisten anderen Phosphataseen unterscheidet ist, daß sie als positives Signalmolekül in der Signalkette wirkt (Li *et al.*, 1994; Xiao *et al.*, 1994; Milarski und Saltiel, 1994). Nach Insulinstimulierung wird SHP-2 tyrosinphosphoryliert und bindet zwei Tyrosine im extremen C-Terminus von IRS-1 (Kuhne *et al.*, 1993; Eck *et al.*, 1996; Zhang-Sun *et al.*, 1996). SHP-2 bindet außerdem

direkt an das phosphorylierte Y1146 des Insulinrezeptors (Kharitonov *et al.*, 1995) und soll über SH2-Domänen mit dem C-terminalen Phosphotyrosin 1322 interagieren, wobei diese Bindung von einer aktivierten Kinasedomäne abhängig ist (Staub *et al.*, 1994; Rocchi *et al.*, 1996). Zusätzlich assoziiert SHP-2 mit einem 115 kDa-Protein (SHPS-I), das in der Plasmamembran lokalisiert ist (Eck *et al.*, 1996; Yamao *et al.*, 1997), und gewebespezifisch einem 60 kDa-Protein, das als Insulinantwort ebenfalls an Tyrosinresten phosphoryliert wird (Zhang-Sun *et al.*, 1996). SHP-2 könnte die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 verringern (Arrandale *et al.*, 1996) und den MAP-Kinase-Signalweg regulieren (Yamauchi *et al.*, 1995; Noguchi *et al.*, 1994). Kürzlich wurde eine neue Familie von Signalproteinen beschrieben, die signalregulatorischen Proteine **SIRPs**, die als Substrate von Rezeptortyrosinkinasen dienen und in tyrosinphosphorylierter Form via SH2-Interaktionen an SHP-2 binden und als deren Substrate agieren (Kharitonov *et al.*, 1997). SIRPs haben negative regulatorische Effekte auf zelluläre Antworten, die durch Wachstumsfaktoren, Onkogene oder Insulin hervorgerufen werden. Tyrosinphosphatasen scheinen generell in die mitogenen und weniger in die metabolen Signalwege des Insulinrezeptors verwickelt zu sein (Fantus und Tsiani, 1998).

Grb2 (growth factor receptor binding protein) ist ein Adapterprotein, das neben einer SH2-Domäne zwei SH3-Domänen aufweist, die konstitutiv mit mSos assoziieren, einem Guaninnukleotid-Austauschprotein, das den GDP/GTP-Austausch von p21^{ras} stimuliert (Myers *et al.*, 1994; Skolnik *et al.*, 1993b; Gale *et al.*, 1993). Die Rekrutierung von Grb2/mSos mit p21^{ras} zur Membran durch Wachstumsfaktor-Rezeptoren ist einer der Mechanismen zur Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade, die zu Stimulierung der Mitogenese führt (Schlessinger 1993). Nach Insulinstimulierung assoziiert Grb2 mit IRS-1, IRS-2, Shc oder SHP-2, obgleich die bevorzugten Wechselwirkungen zellspezifisch sind. Während IRS-1 das dominante Grb2-Bindeprotein im Muskel ist (Yamauchi *et al.*, 1996), spielt Shc die Hauptrolle in kultivierten Zellen (Myers *et al.*, 1994; Skolnik *et al.*, 1993b). Der MAP-Kinase-Signalweg reagiert jedoch nicht sehr sensitiv auf Insulin. Grb2-Bindung durch IRS-1 oder Shc geschieht nur bei einer großen Anzahl an Insulinrezeptoren, was üblicherweise durch Überexprimierung des Rezeptors erreicht wird (Myers *et al.*, 1994).

Nck ist ein 47 kDa Protein, das sich aus einer SH2- und drei SH3-Domänen zusammensetzt; **Crk** enthält eine SH2- und zwei SH3-Domänen (Pawson 1995). Diese Adapterproteine binden mit ihren SH3-Domänen an eine Vielzahl von Signalproteinen und führen zur Aktivierung von Rho/Rac (Nck) bzw. Rap (Crk) (Pawson, persönliche Mitteilung). Abb. 3 gibt einen graphischen Überblick über die wichtigsten Signalwege des Insulinrezeptors.

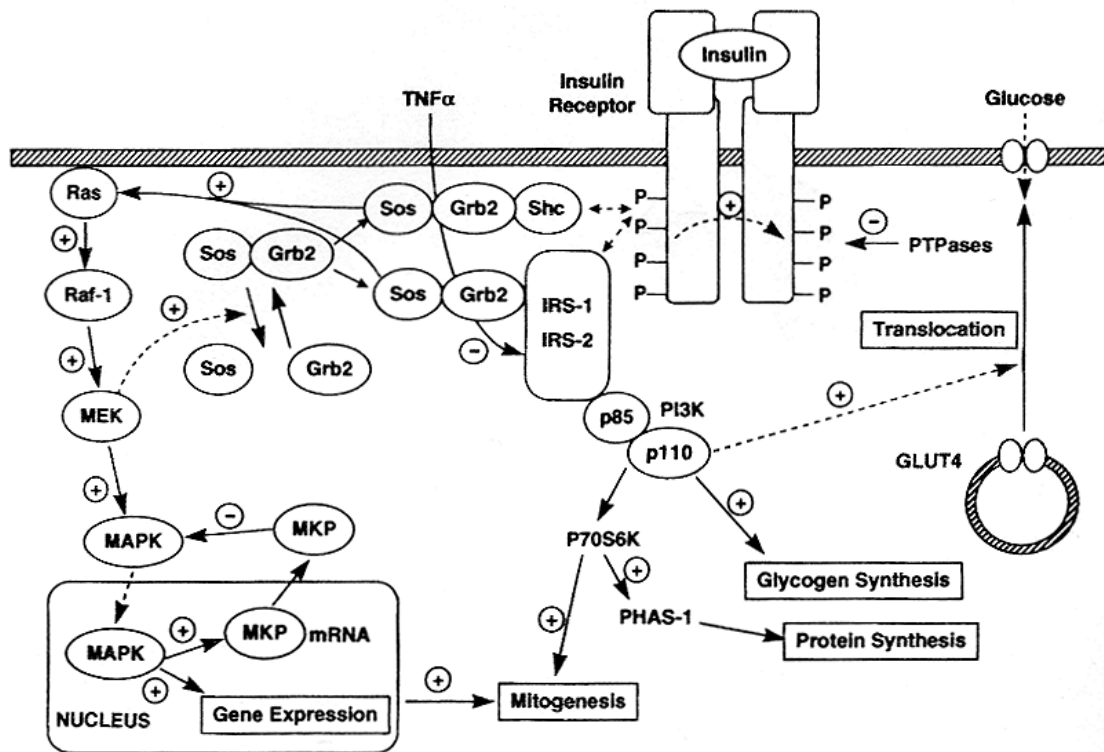


Abb. 3 Signalwege des Insulinrezeptors. MAPK: MAP-Kinase; MEK: MAPK Kinase; Raf-1: MAPK Kinase Kinase; MKP: MAPK Phosphatase; PHAS-1: eIF-4E bindendes Protein. Andere Abkürzungen siehe Text. Aus: Shymko *et al.*, 1997.

2.4 Mechanismus der Autophosphorylierung

2.4.1 Aktivierung der Kinase

Trotz zahlreicher Studien mit dem Insulinrezeptor und der löslichen Kinase und Kristallstrukturen ist bis heute nicht bekannt, wie die Aktivierung der Kinase stattfindet und inwiefern inter- (trans) bzw. intramolekulare (cis) Phosphorylierungen daran beteiligt sind. Die Tatsache, daß die Insulinrezeptorkinase nach der Autophosphorylierung unabhängig von der Ligandenbindung wird (Rosen *et al.*, 1983), was bei anderen bisher untersuchten Rezeptortyrosinkinasen nicht der Fall ist, deutet auf einen spezialisierten Aktivierungsmechanismus hin. Diese Fragestellung ist eng mit dem Problem der zeitlichen Besetzung der Tyrosine verbunden. Die Reihenfolge der Besetzung der Tyrosine der katalytischen Domäne wird kontrovers diskutiert. Verschiedene Untersuchungen zeigen, daß der erste phosphorylierte Rest Y1146 oder Y1150 sein könnte. Bei Abwesenheit von Y1150 wird *in vitro* und *in vivo* beim Insulinrezeptor Y1146 vor Y1151 besetzt, bei Substitution von Y1150 und Y1151 wird Y1146 phosphoryliert (Dickens und Tavaré, 1992; Tavaré und Dickens, 1991). Nach Kohanski wird bei einer löslichen Kinase Y1146 als letzter Rest phosphoryliert (Kohanski 1993b). Bei Phosphorylierungen synthetischer

Peptiden, die die Tyrosinreste der katalytischen Domäne umfassen, wird Y1150 vor Y1151 und zuletzt und nur partiell Y1146 besetzt. Ein Aminosäurerest wird dabei voll besetzt, bevor die nächste Position phosphoryliert wird. Für die Phosphatinkorporation von Y1150 ist weder Y1146 noch Y1151 notwendig, wobei Y1151 nur dann als erster Rest phosphoryliert wird, wenn die anderen beiden substituiert sind (Stadtmauer und Rosen, 1986; Levine *et al.*, 1991; Ellis und Levine, 1991). Die verkürzte lösliche Insulinrezeptorkinase der Kristallstruktur besetzt vorwiegend Y1150, gefolgt von Y1146 und schließlich Y1151 (Wei *et al.*, 1995).

Ungeklärt ist, zu welchem exakten Zeitpunkt exogene Substrate oder die Autophosphorylierungsstellen in der Juxtamembrandomäne und im C-Terminus Zugang zum aktiven Zentrum haben. Dies ist umso bedeutender, da diese Domänen ebenso wie ATP die Konformation des katalytischen Zentrums ändern könnten, besonders die Orientierung der zwei Schleifen relativ zueinander (Taylor *et al.*, 1995). Möglicherweise bindet der C-Terminus an das aktive Zentrum und dient als Autoinhibitor, vergleichbar der Serin-/Threoninkinase Twitchin (Hu *et al.*, 1994). Allerdings kann der C-Terminus des Insulinrezeptors proteolytisch entfernt werden, ohne daß die Kinase aktiviert wird (Hsuan *et al.*, 1989). Substratphosphorylierungen mit aus den korrespondierenden Exons abgeleiteten Fusionsproteinen des C-Terminus und einem Bereich, der Aktivierungs- und P+1-Schleife des Insulinrezeptors umfaßt, deuten auf einen inhibitorischen Effekt des C-terminalen Peptids auf die Kinaseaktivität *in vitro* hin (Tennagels 1998). Ein synthetisches Peptid, abgeleitet aus den Resten 1293-1307 des Insulinrezeptors, stimuliert die Autophosphorylierung *in vivo* und bindet an einen um 43 Aminosäuren am C-Terminus verkürzten Rezeptor (Kole *et al.*, 1996). Ein gegen die Aminosäuren 1294-1317 gerichteter Antikörper beeinflusst nicht die Autophosphorylierung, aber die Phosphorylierung artifizierender und natürlicher Substrate, wobei der Antikörper mit dem aktiven Zentrum des Rezeptors interferieren soll (Gual *et al.*, 1996).

Wie die Tyrosine des C-Terminus phosphoryliert werden, ist unklar. Obwohl sie in *cis* phosphoryliert werden könnten, wenn der C-Terminus um die katalytische Domäne gefaltet wäre, erscheint es räumlich am leichtesten vorstellbar, daß sie in *trans* phosphoryliert werden; ebenso scheinen die Stellen in der Juxtamembrandomäne am leichtesten in *trans* erreichbar zu sein (Taylor *et al.*, 1995). Cann und Kohanski (1997) deuten kinetische Untersuchungen einer löslichen Insulinrezeptorkinase im Sinne einer *cis*-Phosphorylierung der Juxtamembrandomäne. Sie stellen ein Modell vor, in dem Y960 der Juxtamembrandomäne mit dem aktiven Zentrum interagiert und die basale Bindung von ATP erlaubt, wobei der Phosphoryltransfer dieser *cis*-Reaktion langsam verlaufen soll.

2.4.2 Phosphoryltransfer

Der katalytische Mechanismus des Phosphoryltransfers vom ATP auf Aminosäurereste des Rezeptors und der Substrate ist nicht geklärt. Für Kinasen werden einfache und doppelte Verdrängungsmechanismen (Ping-Pong) diskutiert (Matte *et al.*, 1998): Bei der einfachen Verdrängungsreaktion kommt es nach Bindung aller Substrate zur Ausbildung eines ternären Komplexes, während beim doppelten Verdrängungsmechanismus zunächst eine Phosphorylgruppe vom Nukleotid transient auf das Enzym übertragen wird, üblicherweise auf einen Histidinrest. Anschließend wird die Phosphorylgruppe vom Phosphoenzym-Intermediat auf das zweite Substrat übertragen. In beiden Fällen kann der Übergangszustand des Phosphoryltransfers entweder als assoziativ (S_N2 -ähnlich) oder dissoziativ (S_N1 -ähnlich) beschrieben werden. Beim assoziativen Mechanismus ist der Übergangszustand durch Bindungsformierung gekennzeichnet und beinhaltet einen pentakoordinativen Übergangszustand, wobei die axialen Liganden durch das angreifende Nukleophil des Substrats und das Sauerstoffatom zwischen β - und γ -Phosphat gebildet werden. Im Falle des dissoziativen Mechanismus findet sich ein trigonal planarer Metaphosphat-Übergangszustand, dominierend ist die Brechung der Bindungen. Bei Übergangszuständen mit assoziativem Charakter sollte die Entfernung zwischen der terminalen Phosphorylgruppe und dem Akzeptorsubstrat kleiner als die Summe einer P-O van der Waals-Bindung und einer einfachen P-O-Bindung liegen, d.h. in der Größe von 4,9 Å; bei dissoziativen Übergangszuständen sollte die Entfernung entsprechend größer sein (Mildvan und Fry, 1987; Müller-Dieckmann und Schulz, 1994).

2.5 Transiente Phosphorylierung

Der Insulinrezeptor unterliegt einer transienten Phosphorylierung. Sowohl eine lösliche 48 kDa- als auch die verkürzte 35 kDa-Insulinrezeptorkinase der Kristallstrukturanalyse lassen eine Dephosphorylierung des Enzyms nach längeren Reaktionszeiten erkennen, die durch EDTA gehemmt werden kann und eine intrinsische Eigenschaft des Enzyms zu sein scheint (Gruppuso *et al.*, 1992; Wei *et al.*, 1995). Generell ist bei Kinasen die Reaktion durch hohe Konzentrationen an ADP umkehrbar. Dieses wurde auch für den Insulinrezeptor (Pike *et al.*, 1986) und eine lösliche Insulinrezeptorkinase (Cobb *et al.*, 1989) berichtet. Diese durch ADP vermittelte Dephosphorylierung betrifft rund 75 % der Phosphorylierungsstellen des Insulinrezeptors (Argetsinger und Shafer, 1992). Dieser Vorgang ist jedoch nicht mit der transienten Phosphorylierung zu verwechseln, der einige Enzyme unterliegen. So zeigen cAPK, EGF-Rezeptor und Insulinrezeptor auch in Abwesenheit von ADP eine schwache Phosphatase-Aktivität (Kole *et al.*, 1988). Zum Nachweis der transienten Phosphorylierung werden Autophosphorylierungsexperimente unter Pulse-Chase- und Pulse-Hot Chase-Bedingungen durchgeführt. Dabei wird das Enzym mit markiertem ATP phosphoryliert; zu einem bestimmten Zeitpunkt wird ein Überschuss an nicht markiertem ATP (Chase) zugegeben. Analog ist unter einem Hot

Chase-Versuch eine Phosphorylierung mit nicht markiertem und die anschließende Zugabe von markiertem ATP zu verstehen. Auf diese Weise kann gezeigt werden, daß die C-terminalen Tyrosine 1316 und 1322 der löslichen Insulinrezeptorkinase einer transienten Phosphorylierung unterliegen (Al-Hasani *et al.*, 1994; Tennagels 1995). Dieser Effekt ist zu jedem Zeitpunkt nach der Aktivierung der Kinase nachweisbar. Wie Messungen des ATP-Verbrauchs während der Autophosphorylierung zeigen, dauert dieser nach Aktivierung und vollständiger Phosphorylierung der Kinase an und liegt deutlich über der ATP-Menge, die zur kontinuierlichen De- und Rephosphorylierung der C-terminalen Tyrosine nötig wäre; zudem wird die Freisetzung von anorganischem Phosphat beobachtet (Al-Hasani *et al.*, 1994). Eine exogene Phosphatase-Aktivität kann durch die Verwendung von Staurosporin, EDTA und AMP-PNP ausgeschlossen werden, da diese die Dephosphorylierung der Kinase inhibieren (Al-Hasani *et al.*, 1994). Eine schwache intrinsische ATPase-Aktivität wurde auch für die cAPK nachgewiesen (Mendelow *et al.*, 1993; Yoon und Cook, 1987; Lee *et al.*, 1994). Interessanterweise ist bei Anwesenheit von Substraten der ATP-Verbrauch nicht erhöht, was für einen effizienten Phosphoryltransfer des Enzyms spricht (Al-Hasani *et al.*, 1994).

Unklar ist, wie dieser Vorgang mechanistisch zu erklären ist. Ein Ansatz liegt im Vergleich mit Proteintyrosin-Phosphatasen und dualspezifischen Phosphatasen. Diese besitzen das gemeinsame Sequenzmotiv HC(x)₅R(S/T). Das katalytische Cystein ist essentiell und soll das Nukleophil darstellen, welches ein kovalentes Thiolphosphat-Intermediat ausbildet (Zhang und Dixon, 1994). Die apparente Dissoziationskonstante pK_a der Sulfhydrylgruppe des Cysteins ist auffällig erniedrigt. Während der pK_a in der Regel bei ca. 8,5 liegt, besitzt die katalytische Sulfhydrylgruppe bei PTPasen einen apparenten pK_a von 4,5 bis 5 (Zhang und Dixon, 1993). Dies deutet auf eine Stabilisierung des Thiolatanions bei neutralem pH hin, möglicherweise durch das benachbarte, invariante Histidin. Ebenfalls über ein Thiolphosphat-Intermediat agiert eine andere Klasse von Phosphatasen („Low M_r acid phosphatases“), die mit PTPasen und Phosphatasen dualer Spezifität die Konsensussequenz C(x)₅R(S/T) im aktiven Zentrum teilt (Denu und Dixon, 1995). Der Insulinrezeptor besitzt zwei Sequenzen, die diesen Motiven ähneln. C1044 liegt in der Sequenz CH(x)₃R, C1296 ist in HC(x)₇R lokalisiert. Die benachbarten Histidine sowie die in unmittelbarer Nähe befindlichen Arginine könnten diese Cysteine zu katalytisch aktiven Phosphatase-Intermediaten aktivieren. Im Gegensatz zur konservierten Sequenz der PTPasen ist der Abstand der Arginine zu den Cysteinen verändert. Die Phosphataseaktivität des Insulinrezeptors sollte demnach deutlich schwächer als die der PTPasen ausgeprägt sein. In der Tat zeigt eine an Arginin mutierte PTPase eine 1000fach niedrigere Wechselzahl als der Wildtyp (Zhang *et al.*, 1994) und liegt von der katalytischen Aktivität in der gleichen Größenordnung, die die Insulinrezeptorkinase bei der Dephosphorylierung zeigt (Al-Hasani 1995). Möglicherweise ist ein Histidinrest im Sinne einer doppelten Verdrängungsreaktion (s. 2.4.2) generell in den Phosphoryltransfer des Insulinrezeptor involviert, ähnlich wie bei den bakteriellen

Phosphotransferase-Systemen und dem Zwei-Komponenten-System (Egger *et al.*, 1997; Appleby *et al.*, 1996; Cozzone A.J. 1998) sowie der Phospholipase D-Superfamilie (Gottlin *et al.*, 1998).

Die transiente Phosphorylierung der Insulinrezeptorkinase beschränkt sich nicht nur auf die Autophosphorylierung, sondern kann auch Substrate betreffen, wenn diese unter stöchiometrischen Verhältnissen phosphoryliert werden. Ein rekombinantes Fragment des IRS-1 kann durch die lösliche Kinase (Tennagels 1998) und den Holorezeptor (Parvaresh, persönliche Mitteilung) dephosphoryliert werden.

2.6 Duale Spezifität der Insulinrezeptorkinase

Es ist allgemein akzeptiert, daß eine Serinphosphorylierung des Rezeptors dessen insulinstimulierte Tyrosinphosphorylierung inhibiert; indes ist der Mechanismus für diesen Effekt unverstanden (Takayama *et al.*, 1998; Stadtmauer und Rosen, 1986). Die beobachtete Serinphosphorylierung ist der Tyrosinphosphorylierung zeitlich nachgeschaltet (White *et al.*, 1984; Pang *et al.*, 1985; Heidenreich 1995; Al-Hasani 1995; Tennagels). Vielfach konzentriert sich die Forschung auf den Einfluß exogener Serinkinasen, die den Insulinrezeptor phosphorylieren, so vor allem die PKC, die die Serine 955, 956, 1023, 1025 und 1315 sowie den Threoninrest 1336 phosphorylieren soll (Chin *et al.*, 1993 und 1994; Liu und Roth, 1994a, b und c; Lewis *et al.*, 1990b und 1994). Ahn *et al.* (1993) berichten von der Phosphorylierung des S1275, wobei aber unklar bleibt, ob dies auf die Aktivität der PKC oder eine andere Aktivität zurückzuführen ist. Die Serin/Threoninkinase CKII phosphoryliert *in vitro* T1148 in der Aktivierungsschleife, aktiviert durch die Autophosphorylierung der drei Tyrosinreste, besonders des Tyrosins 1151 (Marin *et al.*, 1996).

Lewis *et al.* (1990a) beschreiben die Phosphorylierung der Serinreste 1293/1294 und ordnen die Aktivität einer assoziierten Serinkinase zu. Tavaré *et al.* (1991) weisen die Serinphosphorylierung eines tryptischen Fragments des Rezeptors nach, das wahrscheinlich dem C-Terminus entspricht. Es wird auch die Abtrennung einer assoziierten Serinkinase beschrieben, die S1078 phosphorylieren soll (Carter *et al.*, 1995). Die Tatsache, daß die assoziierte Serinkinase-Aktivität sowohl in WGA-gereinigten (Zick *et al.*, 1983; Smith und Sale, 1988; Ballotti *et al.*, 1986) als auch zusätzlich insulinaffinitäts-gereinigten Insulinrezeptoren (Lewis *et al.*, 1990a; Heidenreich *et al.*, 1994) nachweisbar ist, führte zu der Vermutung, daß die *in vitro* beobachtete Serinphosphorylierung eine intrinsische Aktivität des Insulinrezeptors ist (Baltensperger *et al.*, 1992; Tauer *et al.*, 1996). In der Tat können bei einer löslichen Insulinrezeptorkinase die Serinreste 1275 und 1309 als Autophosphorylierungsstellen nachgewiesen werden, während eine inaktive Kinase keine Phosphorylierung aufweist (Al-Hasani *et al.*, 1997). Es gibt Hinweise darauf, daß diese Reste des Insulinrezeptors auch *in vivo* phosphoryliert werden (Tennagels 1998). Zudem ist die lösliche Insulinrezeptorkinase fähig, den eigenen

C-Terminus als Fusionsprotein an den beiden Serinresten zu phosphorylieren, wobei die Phosphorylierung der beiden Tyrosinautophosphorylierungsstellen im Substrat keine Voraussetzung dafür darstellt (Tennagels 1998).

Mutationen im Insulinrezeptor führen zu Auswirkungen auf die Serinphosphorylierung. Die Substitution des Y1150 führt *in vivo* zur einer scheinbar vollständigen Aufhebung der Threoninphosphorylierung, während die Serinphosphorylierung *in vivo* und *in vitro* leicht vermindert ist (Tavaré und Dickens, 1991). Die Serinphosphorylierung außerhalb des Juxtamembranbereichs erweist sich *in vitro* als abhängig von Y1151 (Feener *et al.*, 1993). Diverse Mutationen an Serinresten führen *in vivo* zu einer Verminderung der Autophosphorylierung: Während der Austausch gegen Alanin bei den Resten 1293/1294 und 1308/1309 keine signifikanten Auswirkungen hat, scheinen die Serine 994 und 10123/1025 die Autophosphorylierung zu beeinflussen (Strack *et al.*, 1997). Interessanterweise bindet der Amid-Stickstoff des S994 das β -Phosphat von AMP-PNP in der Kristallstruktur (s. 2.2.2); bei der Familie der Tyrosinkinase ist dieses Serin fast ausschließlich bei der Insulinrezeptor-Familie konserviert (Hanks und Hunter, 1995). Werden die Serine 1293/1294 und 1308/1309 gegen Alanin ausgetauscht, ist *in vivo* eine erhöhte Phosphorylierung der Phosphatase SHP-2 zu verzeichnen (Häring, persönliche Mitteilung).

Die Insulinrezeptorkinase besitzt die Eigenschaft, *in vitro* auch rekombinante Fragmente natürlicher Substrate wie IRS-1 und Gab1 an Serin- und Threoninresten zu phosphorylieren (Tennagels 1998; Parvaresh, persönliche Mitteilung). Damit erfüllt die Insulinrezeptorkinase die Kriterien einer Kinase mit dualer Spezifität, die sowohl bei Auto- als auch bei Substratphosphorylierung Tyrosin- und Serin-/Threoninphosphorylierung aufweist (Lindberg *et al.*, 1992). Diese Fähigkeit ist abhängig von der Stöchiometrie von Rezeptor und Substrat: Bei hohen Konzentrationen, die einem mehrfachen des K_M -Werts entsprechen, sind die Substrate fast ausschließlich an Tyrosinresten phosphoryliert, während bei Konzentrationen um den K_M eine signifikante Serin-/Threoninphosphorylierung beobachtet wird. Stöchiometrische Konzentrationen sind auch *in vivo* zu erwarten. Diese These wird unterstützt durch den DIR, der einen IRS1-ähnlichen Anhang besitzt (Ruan *et al.*, 1995); diese Erweiterung liegt damit automatisch in äquimolarer Konzentration zur Kinase vor.

2.7 Die lösliche Kinase als Modellenzym

Untersuchungen *in vitro* am hochreinen Holorezeptor sind schwierig durch die mengenmäßige Limitierung und die heterogene Population der Rezeptorpräparation. Als Ausweg wurde die lösliche Insulinrezeptorkinase konstruiert, die als Modell für den gesamten Rezeptor dient. Die lösliche Kinase wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen als rekombinantes Protein in Insektenzellen exprimiert und umfaßt den - teilweise verkürzten - cytoplasmatischen Anteil des Rezeptors (Ellis *et al.*, 1988; Herrera *et al.*, 1988;

Villalba *et al.*, 1989; Cobb *et al.*, 1989; Kohanski 1993a und b; Smith *et al.*, 1994; Al-Hasani *et al.*, 1994; Wei *et al.*, 1995; Tennagels 1995 und 1998). Das im Saccharose-Gradienten monomere Enzym (Herrera *et al.*, 1988) ist konstitutiv aktiv. Die Aktivität der löslichen Kinase ist abhängig von Metallionen, wobei eine Präferenz von Mangan gegenüber Magnesium festzustellen ist (Kwok *et al.*, 1986; Rosen und Lebowitz, 1988). Polykationen wie Poly-L-Lysin oder Protamin führen zu einer 10-20fachen Steigerung der Initialgeschwindigkeit der Autophosphorylierung und zu einer 2-3fachen Steigerung des Phosphateinbaus (Rosen und Lebowitz, 1988; Al-Hasani 1995; Tennagels 1998); der Holorezeptor wird ebenfalls durch Polykationen aktiviert (Rosen und Lebowitz, 1988). Der Mechanismus dieser Aktivierung ist ungeklärt; es wird vermutet, daß Polykationen direkt mit der Kinase interagieren, wobei eine saure Domäne im C-Terminus (Reste 1270-1280) eine potentielle Stelle darstellen könnte (Baron *et al.*, 1995). Dadurch könnte die Di-/Oligomerisierung der monomeren Moleküle gefördert werden, so daß trans-Autophosphorylierungen möglich werden. Konzentrationsabhängige Autophosphorylierungen der löslichen Insulinrezeptorkinase geben keinen klaren Aufschluß über cis- oder trans-Phosphorylierungen (Cobb *et al.*, 1989; Herrera *et al.*, 1988; Villalba *et al.*, 1989; Kohanski 1993a; Wei *et al.*, 1995). Polykationen substituieren die durch Mangan geförderte Aktivierung; möglicherweise können Polykationen eine hypothetische Mangan-Bindungsstelle okkupieren (Rosen und Lebowitz, 1988). Je nach Arbeitsgruppe finden sich unterschiedliche Bedingungen der Autophosphorylierung, so daß die Ergebnisse nur bedingt miteinander vergleichbar sind. Die von Tennagels klonierte Insulinrezeptorkinase IRKD weist eine maximale Aktivität bei je 5 mM MgCl₂ und MnCl₂ in 50 mM Tris/HCl pH 7,5-8 bei 20-25 °C auf. Die höchste Stimulierung der Kinaseaktivität wird durch äquimolare Mengen an Poly-L-Lysin (15-30 kDa) erhalten. Unter diesen Bedingungen wird im Schnitt eine Phosphatinkorporation von 4-5 mol/mol erreicht. Die Phosphorylierungsstellen der Kinase sind identisch mit denen des Holorezeptors; die Initialgeschwindigkeit der Kinase ist gegenüber dem Holorezeptor um eine Größenordnung erhöht (Herrera *et al.*, 1988; Tavaré *et al.*, 1991; Kohanski 1993b; Heidenreich 1995, Al-Hasani 1995, Magg 1997, Tennagels 1998). Exogene Substrate wie synthetische Peptide, Poly(Glu:Tyr)_{4:1}, Histon 2B sowie rekombinante Fragmente ausgewählter Domänen des Insulinrezeptors, von IRS-1 und Gab1 werden von der löslichen Insulinrezeptorkinase effizient phosphoryliert, wobei die Fragmente K_M-Werte im mikromolaren Bereich aufweisen (Al-Hasani 1995; Tennagels 1998; Lehr 1998).

2.8 Fragestellung

In der Literatur beschriebene Untersuchungen der Insulinrezeptorkinase sind nur schwer miteinander vergleichbar, da mit verschiedenen Konstrukten in unterschiedlichen Systemen gearbeitet wurde. Eine Vielzahl von artifiziellen und natürlichen Substraten dient der Bestimmung der Transferaktivität des Enzyms. Die Variabilität der publizierten Daten ist so groß, daß letztlich die Bedeutung der einzelnen Aminosäuren der Insulinrezeptorkinase nicht bekannt ist. Um eine definierte Vergleichbarkeit der Reaktionsbedingungen zu schaffen, sollten im Rahmen dieser Arbeit Mutationen in die lösliche Insulinrezeptorkinase eingeführt und die rekombinanten Proteine mit Hilfe des Baculovirus-Systems exprimiert, gereinigt und biochemisch charakterisiert werden. Die Charakterisierung betrifft kinetische Parameter, die Lokalisation beteiligter Aminosäurereste unter Verwendung der Phosphopeptid-Kartierung und die Analyse der initialen Autophosphorylierung mittels „single turnover“-Experimenten unter äquimolaren ATP-Verhältnissen.

Mit diesen methodischen Ansätzen sollte der Mechanismus der dualen Kinase detailliert untersucht und beteiligte Aminosäurereste identifiziert werden. Weiterhin stand der Reaktionsverlauf der transienten Phosphorylierung und deren Einfluß auf die duale Aktivität der Insulinrezeptorkinase im Mittelpunkt der Interesses.



3-8 Ergebnisse

3 Generierung, Expression und Reinigung mutierter Insulinrezeptorkinasen

3.1 Überblick über die IRKD-Konstrukte

Der pUC19-Vektor pUC-IRKD enthält die cDNA des cytosolischen Anteils des humanen Insulinrezeptors (R941-S1343; Nummerierung nach Ullrich *et al.*, 1985) und diente als Ausgangspunkt zur Generierung verschiedener mutierter löslicher Insulinrezeptorkinasen (IRKD):

IRKD-Y1150F, -Y1151F, -SS1275/1309DD, -CHH1044/1045/1046TRQ, -C1296S (Nölle 1995) und -D1120A (Keßler 1998). Zusätzlich wurden folgende Kinasen gereinigt und charakterisiert: IRKD-Y1146F (freundlicherweise von M. Koenen zur Verfügung gestellt), -YYY960/1316/1322FFF (freundlicherweise von C. Fried zur Verfügung gestellt), -K1018A (Tennagels 1995) und zwei Varianten einer um 72 Aminosäuren am C-Terminus verkürzten Form, Δ CT und Δ CT-Y960F (Wieber 1998). Damit stehen Insulinrezeptorkinasen zur Verfügung, die Punktmutationen der Hauptphosphorylierungsdomäne, der Serinautophosphorylierungsstellen, der ATP-Bindungsstelle, der katalytischen Base und potentiell aktiver Cysteine und Histidine (s. Einleitung) besitzen sowie eine Kinase, der annähernd der komplette C-Terminus fehlt („Core“ Kinase). Die Serinreste 1275 und 1309 wurden gegen Aspartate substituiert, um phosphorylierte Serine zu imitieren. Cystein 1044 wurde gegen Threonin ausgetauscht, so daß dieses, falls es phosphoryliert würde, leicht nachweisbar wäre. Tabelle 1 faßt die untersuchten Kinasen zusammen.

Die Mutagenese erfolgte mit dem QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene (10.2). Von positiven Klonen wurde die erfolgreiche Mutation der DNA durch Sequenzierung der Mutationsstellen verifiziert (Daten nicht gezeigt) und die DNA aus dem jeweiligen pUC-Vektor mittels Bam HI/Pst I-Schnitten in den Baculovirusvektor pVL1393 subkloniert (10.1, 10.2). Diese pVL-Derivate dienten im weiteren der Transfektion von Sf9-Zellen.

Tab. 1 Überblick über die untersuchten löslichen Insulinrezeptorkinasen

Kinase	Abkürzung	Lokalisation der Mutationen
IRKD-Y1146F	46F	Kinasedomäne
IRKD-Y1150F	50F	Kinasedomäne
IRKD-Y1151F	51F	Kinasedomäne
IRKD-YYY960/1316/1322FFF	Y3F	Phosphorylierungsstellen im C-Terminus und in der Juxtamembrandomäne
IRKD-SS1275/1309DD	SSDD	Serinauto-phosphorylierungsstellen
IRKD-K1018A	K1018A	ATP-Bindung
IRKD-D1120A	D1120A	Katalytische Base
IRKD-C1296S	CS	Reaktives Cystein
IRKD-CHH1044/1045/1046TRQ	CHH	Potentiell aktive Stellen
IRKD- Δ CT	Δ CT	Deletierter C-Terminus
IRKD- Δ CT-Y960F	Δ CT*	Deletierter C-Terminus, Phosphorylierungsstelle in der Juxtamembrandomäne

3.2 Das Baculovirus-Expressionssystem

Zur Expression der mutierten Insulinrezeptorkinasen wurde das Baculovirus-Expressionssystem gewählt (10.3; Summers u. Smith, 1987). Zur Herstellung rekombinanter Proteine werden Zellen des Mitteldarms von *Spodoptera frugiperda* (Sf9) gleichzeitig mit Baculovirus-DNA (AcNPV) und dem zu exprimierenden Gen kotransfiziert. Dieses wird mit Hilfe eines speziellen Transfervektors (hier: pVL1393) in die Zellen gebracht (Smith u. Summers, 1978). Die linearisierte und modifizierte AcNPV-DNA besitzt eine letale Mutation in der 3'-flankierenden Region des Polyhedringens, die durch *in vivo* Rekombination mit dem Transfervektor intakte Viren produziert, die das entsprechende Fremdgen tragen. Das Gen steht unter der Kontrolle des starken polyh-Promoters. Im Transfervektor pVL1393 ist der Originaltranskriptionsstart ATG zu ATT mutiert. Dies soll die Promotoraktivität verbessern, da so dem Startcodon folgende Sequenzen erhalten bleiben (Luckow u. Summers, 1989; O'Reilly *et al.*, 1992). Da dennoch an dieser Position Transkriptions-Initiationen beobachtet wurden (Beames *et al.*, 1991), ist es nötig, daß das eingebrachte Startcodon ATG in einem anderen Leseraster als der mutierte Originalstart liegt. Ein günstiges Umfeld im Bereich des Transkriptionsstart sowie die Termination durch das Codon TAA (Standard-Stoppcodon von AcNPV) soll eine effiziente Expression begünstigen. Bei der Klonierung der IRKD-Derivate wurden diese Bedingungen berücksichtigt (Original-Startsequenz TATAAAT vor ATG (Tennagels 1995), Stoppcodon original TAA).

Nach der Kotransfektion der Insektenzellen mit AcNPV-DNA und dem jeweiligen pVL1393-IRKD-Konstrukt wurden mit Hilfe des „Plaque Assays“ positive Klone identifiziert (10.3.1). Jeweils zwei wurden mehrfach mit einer MOI von 0,5 bis 1 amplifiziert, bis ein Virustiter von $1-2 \times 10^8$ pfu/ml („working stock“) erreicht wurde. Nach jedem Arbeitsschritt wurden die rekombinanten Insulinrezeptorkinasen immunologisch mit Antikörpern gegen den Juxtamembranbereich und den C-Terminus des Insulinrezeptors nachgewiesen (α -GST-JM bzw. α -GST-CT; 10.4.1). Zur Expression wurden 200 ml Sf9-Zellen einer Suspensionskultur mit einer MOI von 5 bis 10 für 55-65 Stunden infiziert. Vorversuche zeigten, daß nach dieser Zeitspanne die Proteinexpression maximal ist, ohne daß die Zellen durch die viral bedingte Lyse schon viel Protein freigesetzt haben. Die Mortalität betrug zu diesem Zeitpunkt ca. 15 %. Nach der Ernte wurden die Zellen mit PBS gewaschen und nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C verwahrt.

3.3 Chromatographische Reinigung

Die Reinigung der im Baculovirus-System exprimierten Insulinrezeptorkinasen erfolgte in mehreren Schritten (10.3.2). Zunächst wurden die sonifizierten Zellen durch differentielle Zentrifugation von unlöslichen Zellbestandteilen getrennt. Aus diesem Rohlysat wurden die Enzyme durch Anionenaustauschchromatographie und hydrophobe Interaktionschromatographie gereinigt (angelehnt an Villalba *et al.*, 1989 und Al-Hasani 1995).

Die Zellen wurden in einem Lysis-Puffer durch Sonifikation und Homogenisation aufgeschlossen. Nach Zentrifugationen bei $10000 \times g$ und $120000 \times g$ wurde der proteinhaltige Überstand (Rohlysat) aliquotiert (5-8 ml) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Proteinbestimmung nach Bradford (10.4.2.2) ergab Konzentrationen von 1,5-2,5 mg/ml für die Rohlysate. Damit konnten in 25 ml aufgearbeiteter cytosolischer Zellfraktion insgesamt 37-63 mg Protein nachgewiesen werden.

Die chromatographische Reinigung wurde auf einer Biologic-Anlage von Bio-Rad durchgeführt. Da die Reinigung auf einer Pharmacia-Anlage etabliert war, wurden die Reinigungsbedingungen übertragen und optimiert. Verwendet wurden eine 1 ml ResourceQ-Säule und eine 1 ml Phenyl-Sepharose Fast Flow-Säule. Um die Trennleistung der Säulen zu maximieren, wurde die Reinigung bei konstant 20°C durchgeführt. Die $15 \mu\text{M}$ großen, mit quartären Ammoniumgruppen substituierten Kügelchen der ResourceQ erreichten die beste Trennleistung bei 2 ml/min. Als Puffer wurden 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM DTT (Puffer A) und 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 M NaCl, 1 mM DTT (Puffer B) verwendet. Die Elution des rekombinanten Proteins erfolgte mit einem linearen Gradienten von 10 % - 30 % Puffer B in 12 Säulenvolumina (ΔCT : Äquilibration und Gradientenstart mit 7 % Puffer B). Die Fraktionen mit der Insulinrezeptorkinase wurden vereinigt, auf 20 % Ammoniumsulfat (% Sättigung) eingestellt und für die

nachfolgende hydrophobe Interaktionschromatographie verwendet. Bei der etablierten Reinigung erfolgte ein Zwischenschritt in Form einer Ammoniumsulfatfällung, die zur Abtrennung eines Fremdproteins führte. Dieses wurde unter den optimierten Bedingungen bereits bei der Ionenaustausch-Chromatographie entfernt. Eine probeweise durchgeführte Ammoniumsulfatfällung führte zu keinem Präzipitat, so daß auf sie verzichtet wurde. Zur hydrophoben Interaktionschromatographie auf Phenyl-Sepharose-Material wurden als Puffer 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM DTT (Puffer A) und 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 20 % Ammoniumsulfat (% Sättigung), 1 mM DTT (Puffer B) verwendet. Bei diesen Salzkonzentrationen bindet die IRKD vollständig an die Säule (Al-Hasani 1995). Eine Verringerung der Salzkonzentration führt zu einer Erniedrigung der Hydrophobizität der Proteine und damit zur Elution. Als Flußrate wurde 1 ml/min gewählt, um die Verweildauer des Enzyms auf der Säule kurz zu halten. Ein Stufengradient (100 % B / 50 % B / 25 % B / 10 % B / 0 % B) bewirkte eine Elution der IRKD in zwei „Pools“ bei 10 bzw. 0 % B. Die kinasehaltigen „Pools“ wurden dreifach mit 1 ml 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM DTT gewaschen und im Centricon C30 auf 0,7-1,6 mg/ml (Bestimmung mit Spot- und Bradfordtest, 10.4.2) aufkonzentriert und aliquotiert bei -80 °C schockgefroren. Unter diesen Bedingungen behielten die Kinasen für mindestens zwei Monate die volle Aktivität. Typischerweise ergaben sich Ausbeuten von 0,6 mg Kinase pro 200 ml Suspensionskultur.

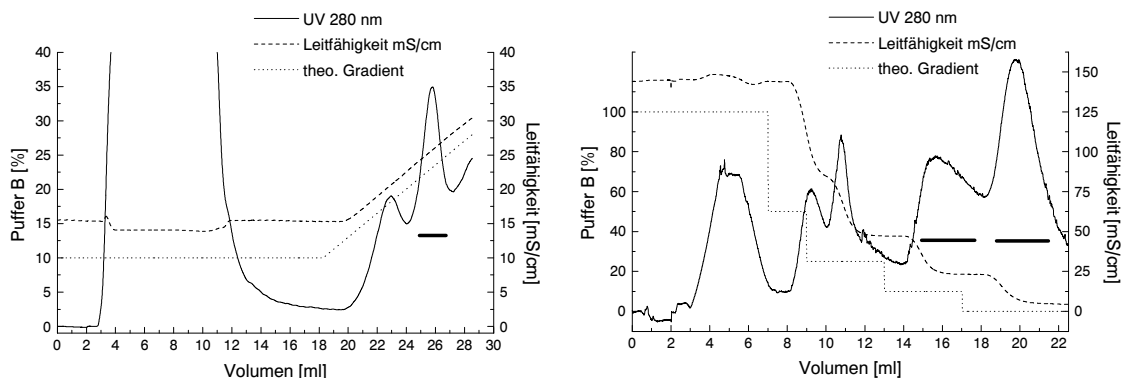


Abb. 4 Chromatogramme des Reinigungsverlaufs der Insulinrezeptorkinase. Gezeigt sind die Elutionsprofile der Anionenaustausch- (links) und der hydrophoben Interaktionschromatographie (rechts). Fraktionen mit der Insulinrezeptorkinase sind durch Querbalken markiert. Neben dem UV-Profil bei 280 nm sind die Leitfähigkeitsmessung und der theoretische Salzgradient eingezeichnet.

Abb. 4 zeigt zwei charakteristische Chromatogramme der Anionenaustausch- und der hydrophoben Interaktionschromatographie. Die IRKD, in der Grafik durch Querbalken markiert, eluierte bei der ResourceQ-Säule bei einer Leitfähigkeit von etwa 26 mS/cm (Δ CT: 19 mS/cm). Eine Ausnahme bildete die Mutante SSDD, die bei ca. 30 mS/cm eluierte; offensichtlich führten die zusätzlichen negativen Ladungen der Aspartatreste

zu einer verstärkten Bindung des Enzyms an die Säule. Bei der hydrophoben Interaktionschromatographie erfolgte die Elution der Kinase bei Leitfähigkeiten von 25-30 bzw. 5-15 mS/cm. Allerdings ist anzumerken, daß - bedingt durch das Säulenmaterial - die Kinase über einen breiten Bereich eluierte.

Abb. 5 stellt ein SDS-Gel mit einem charakteristischen Reinigungsverlauf der löslichen Insulinrezeptorkinase dar. Die IRKD besitzt ein rechnerisches Molekulargewicht von 45,7 kDa, retardiert in der SDS-PAGE aber apparent bei etwa 48 kDa. Neben dem Rohlysate (Spur 1) und der Anionenaustauscher-gereinigten Fraktion (Spur 2) sind in den Spuren 3 und 4 die Phenyl-Sepharose-gereinigten Kinasen zu erkennen. Der erste „Pool“ der hydrophoben Interaktionschromatographie erwies sich als der reinere (Spur 3); im zweiten „Pool“ eluierte zusätzlich ein Protein mit einem etwas niedrigerem apparenten Molekulargewicht als die Kinase. Im Western Blot mit dem gegen den Juxtamembranbereich gerichteten Antikörper α -GST-JM reagierte die Bande ebenso wie die Kinase positiv (10.4.1). Dies deutet darauf hin, daß es sich bei der Bande um ein Abbruchfragment der IRKD handelt, möglicherweise um eine Kinase mit verkürztem C-Terminus. Die Färbemethodik berücksichtigend, kann die Reinheit der Insulinrezeptorkinasen im SDS-PAGE mit über 90 % angegeben werden (10.4).

Im Rohlysate (Spur 1) befand sich ein Anteil von ca. 5-10 % rekombinanter Kinase, was etwa 0,08 - 0,25 mg/ml entspricht. In 25 ml Rohlysate (entsprechend 200 ml Zellen) waren demnach 2-6 mg Kinase vorhanden. Nach Reinigung mit Resource Q (Spur 2) konnte bereits ein Reinheitsgrad von 60-70 % erreicht werden.

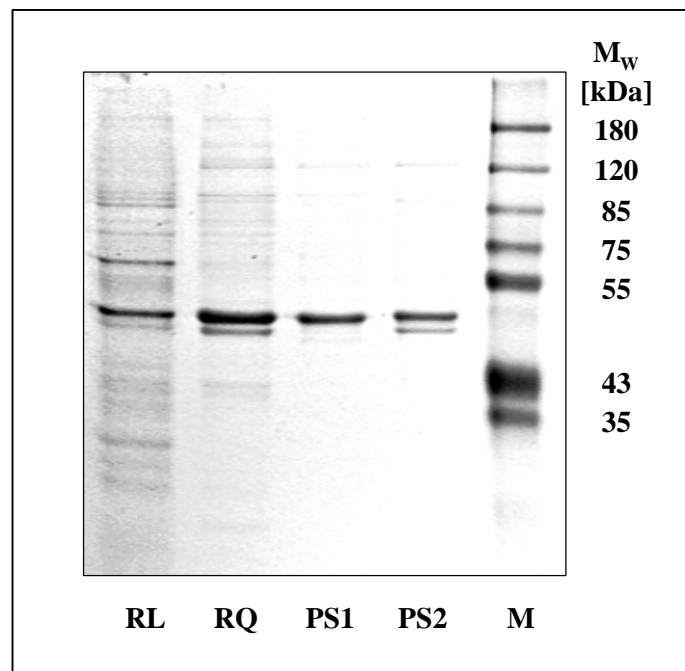


Abb. 5 Reinigungsverlauf der löslichen Insulinrezeptorkinase. Spur 1: Rohlysate (RL); Spur 2: Eluat nach Chromatographie mit ResourceQ (RQ); Spur 3: Eluat nach Chromatographie mit Phenyl-Sepharose, Pool 1 (PS1); Spur 4: wie Spur 3, aber Pool 2 (PS2); Spur 5: Proteinmarker (M). Färbung nach Blakesley *et al.*, 1977 (10.4).

Mit 0,6 mg erhaltener Kinase nach dem zweitem chromatographischen Schritt wurde, bezogen auf das Rohlysat, eine Gesamtausbeute von 10-30 % an Protein erreicht.

Eine Besonderheit stellte das Konstrukt CHH dar. Dieses Protein wurde von den Insektenzellen exprimiert und konnte immunologisch nachgewiesen werden; im Rohlysat nach der Ultrazentrifugation war aber nur noch wenig Kinase vorhanden. Offensichtlich präzipitierte CHH während der Aufarbeitung der Zellen. Dementsprechend zeigte diese Kinase eine kaum nachweisbare Aktivität.

Mit den gereinigten Kinasen wurde nach der Reinigung ein Aktivitätstest in Form einer zeitabhängigen Autophosphorylierungsreaktion durchgeführt. Für das Derivat CS wurde zusätzlich die Aktivität der verschiedenen Reinigungsstufen in Form einer Poly(Glu:Tyr)_{4:1}-Phosphorylierung bestimmt (10.6.1; Nölle 1995). Der Transfer von Phosphorylgruppen von der Kinase auf das Substrat ist ein Maß für die katalytische Aktivität des Enzyms. Die spezifische Transferaktivität auf Poly(Glu:Tyr)_{4:1} stieg dabei vom Rohlysat zur reinsten Fraktion der CS um etwa eine Größenordnung.

4 Charakterisierung der Autophosphorylierung

4.1 Phosphatinkorporation und Initialgeschwindigkeiten

Die Autophosphorylierung der mutierten Kinasen und deren Phosphoaminosäurezusammensetzung wurde charakterisiert (10.5, 10.7). Sofern nicht anders vermerkt, erfolgten sämtliche in dieser Arbeit beschriebene Reaktionen unter Standardbedingungen mit 1 μM Kinase, 1 μM Poly-L-Lysin (15-30 kDa), 250 μM [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$]ATP, 5 mM MgCl_2 , 5 mM MnCl_2 , 1 mg/ml protease- und phosphatasefreies BSA Fraktion V in 50 mM Tris/HCl pH 7,5 bei Raumtemperatur (19-26 °C). Unter diesen Bedingungen wird die IRKD maximal aktiviert (Tennagels 1998). Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Kinase gestartet. Die spezifische Radioaktivität des eingesetzten ATP lag zwischen 400 und 2000 cpm/pmol. Zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 10 Sekunden und 30 Minuten wurden 10 pmol Kinase entnommen und in SDS-Probenpuffer (100 mM DTT) aufgenommen. Die Auftrennung erfolgte mittels 12 %iger SDS-PAGE (10.6.2). Aus dem getrockneten Gel wurden die Banden, die auf Grund der inkorporierten Radioaktivität detektiert wurden, ausgeschnitten und die Cerenkovstrahlung im β -Counter bestimmt. Zur Ermittlung des Anteils an Serinphosphat wurden die Kinasen aus dem Gel unter tryptischem Verdau eluiert (10.7.1; Ausbeute typischerweise > 80 %). Die Fragmente wurden nach Lyophilisation partiell hydrolysiert (6 N HCl, 110 °C, 2 Stunden) und dünnschichtchromatographisch analysiert (10.7.2; Munoz und Marshall, 1990). Auf diese Art können phosphorylierte Tyrosine und Serine/Threonine getrennt werden. Diese Methodik ist zur Bestimmung des Serinphosphatgehalts ausreichend, da die IRKD keine Threoninphosphorylierung aufweist (Tennagels 1995; Nölle 1995). Die Auswertung erfolgte durch eine Phospho-Imager-Analyse und durch Autoradiographie. Abb. 6 stellt ein charakteristisches Autoradiogramm phosphorylierter Insulinrezeptorkinasen dar.

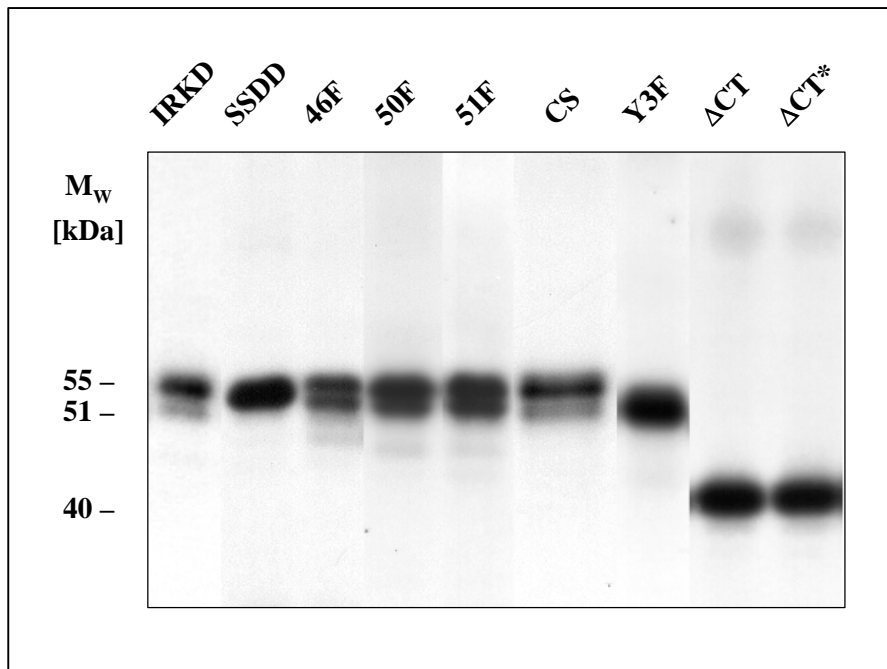


Abb.6 Autophosphorylierung der mutierten Insulinrezeptorkinasen. Alle Enzyme wurden unter Standardbedingungen für 30 Minuten autophosphoryliert und mittels SDS-PAGE getrennt. Gezeigt ist ein Autoradiogramm phosphorylierter Kinasen, das aus mehreren Einzelbildern zusammengestellt wurde. Alle mutierten Kinasen wurden zur Ermittlung des apparenten Molekulargewichts direkt gegen die Wildtyp-IRKD mittels SDS-PAGE untersucht.

Bei der Betrachtung des Autoradiogramms fallen Unterschiede zwischen den verschiedenen Kinasederivaten auf. Die Wildtyp-IRKD (ebenso wie CS) zeigte bei Autophosphorylierungsreaktionen eine charakteristische Doppelbande (51 kDa und 55 kDa), wobei sich das Verhältnis an inkorporierter Radioaktivität in diesen im Laufe der Reaktion zunehmend zur oberen Bande verschob, bis dieses nach 30 min etwa 3:1 betrug. Die Ursache der beiden Banden ist unklar; beiden zeigten in der Phosphopeptid-Kartierung (Methodik s. 4.3.1 und 10.8) keinen auffälligen Unterschied, einzig der Anteil an Serinphosphat, besonders der des phosphorylierten S1309, war in der oberen Bande erhöht (Nölle 1995). 46F, 50F und 51F wiesen die Doppelbande auf; im Gegensatz zum Wildtyp inkorporierten diese nach 30 Minuten jeweils nur wenig mehr an Radioaktivität in die obere Bande als die untere. Der Y3F hingegen fehlte die obere Bande; ebenso lief $\Delta\text{CT}/\Delta\text{CT}^*$ in einer distinkten Bande. Interessanterweise war bei SSDD nur eine Bande zu beobachten, die ein apparentes Molekulargewicht von 54 kDa besaß und sich damit annähernd wie die obere Bande verhielt. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, daß die Serinphosphorylierung und/oder Konformationsänderungen des C-Terminus für die verschiedenen Formen im SDS-PAGE verantwortlich sein könnten.

Aus den gemessenen Radioaktivitäten der autophosphorylierten Kinasen wurde der maximale Phosphateinbau (in mol Phosphat/mol Enzym), die Initialgeschwindigkeit des Phosphateinbaus (in nmol Phosphat/(min × mg Enzym)) und die Halbwertszeit des Phosphateinbaus (in Sekunden) ermittelt. Mittels der Phosphoaminosäureanalyse (Abb. 7) wurde der maximale Phosphateinbau in Serinreste (in mol Serinphosphat/mol Enzym) und die Halbwertszeit des Serinphosphateinbaus (in nmol Serinphosphat/(min × mg Enzym)) errechnet. Letztere wurde im linearen Bereich ermittelt, der bei 46F, 50F und Δ CT/ Δ CT* erst nach einigen Minuten Verzögerung einsetzte. Der Initialgeschwindigkeit des Phosphateinbaus und der Halbwertszeit wurde eine Meßzeit von 10 Sekunden zu Grunde gelegt. Zusätzlich wurden diese nach 30 Sekunden Reaktionsdauer bestimmt (Daten nicht gezeigt); die so ermittelten Werte unterschieden sich um das 2,2-2,6fache von den Messungen nach 10 Sekunden. So ergab sich beispielsweise für den Wildtyp nach 30 Sekunden Meßzeit eine Initialgeschwindigkeit des Phosphateinbaus von $157 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ und eine Halbwertszeit von 20 Sekunden (Ausnahme Δ CT/ Δ CT*: $16 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, 130 Sekunden). Tab. 2 faßt die erfaßten Daten der Autophosphorylierungsreaktionen zusammen.

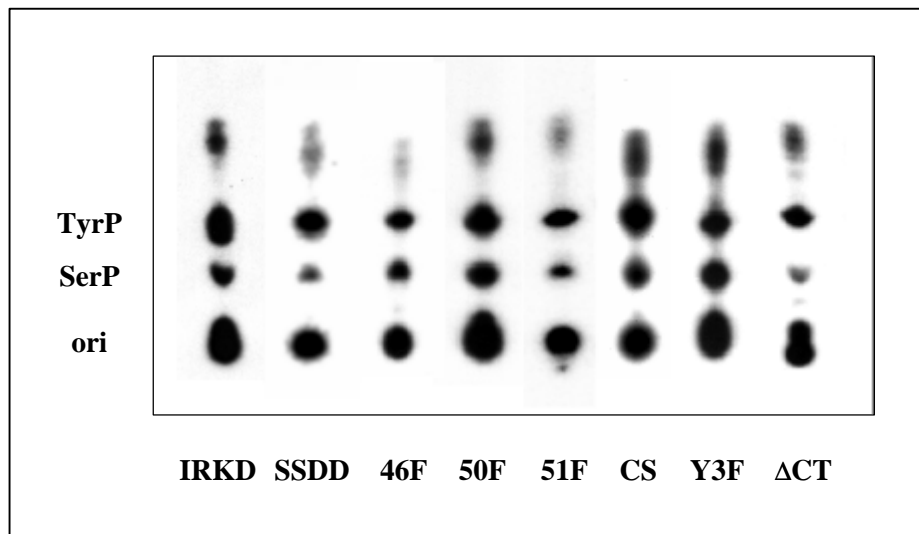


Abb. 7 Dünnschichtchromatographische Analyse der Phosphoaminosäuren. Die Untersuchung der für 30 Minuten unter Standardbedingungen autophosphorylierten und sauer hydrolysierten Kinasen erfolgte nach 10.7.2.1. Serin- und Threoninphosphat lassen sich mit dieser Methode nicht unterscheiden. Da die IRKD aber keine Threoninphosphorylierung aufweist, wird hier und im Folgenden bei Dünnschichtchromatographien das Serin-/Threoninphosphatsignal mit SerP bezeichnet. Oberhalb der Phosphoaminosäuren sind nicht hydrolysierte Peptide erkennbar. TyrP: Tyrosinphosphat; SerP: Serin(-/Threonin)phosphat; ori: Auftragspunkt.

Tab. 2 Daten der Autophosphorylierung. Gezeigt sind die Mittelwerte aus mehreren Messungen und Standardabweichungen. Max. P: maximale Phosphatinkorporation innerhalb 30 Minuten; Max. SerP: maximale Inkorporation in Serinreste; V_{ini} P: Initialgeschwindigkeit des Phosphateinbaus, bestimmt nach 10 Sekunden; V_{ini} SerP: Initialgeschwindigkeit der Serinphosphorylierung, bestimmt im linearen Bereich; $t_{1/2}$: Halbwertszeit des Phosphateinbaus.

Kinase	Max. P (mol/mol)	Max. SerP (mol/mol)	V_{ini} P (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	V_{ini} SerP (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	$t_{1/2}$ (s)
WT	4,5-5	1,3-1,6	430 ± 48	3-4	9 ± 1,5
46F	3-3,5	1,1-1,2	250 ± 14	2-3 ^a	9 ± 0,5
50F	3-3,5	1,1-1,3	239 ± 31	2,5-3,5 ^a	8 ± 0,5
51F	3,5-4,5	0,4-0,5	371 ± 30	0,2-0,3	7 ± 1
Y3F	3-3,5	1,3-1,6	200 ± 55	2,5-3,5	11 ± 1,5
SSDD	3,5-4	0,35-0,45	455 ± 43	0,3-0,4	6 ± 0,5
K1018A	0	0	-	-	-
D1120A	0	0	-	-	-
CS	4,5-5	1,3-1,5	310 ± 12	3-4	10 ± 2
Δ CT/ Δ CT*	2,5-3	0,25-0,35	21 ± 12	0,3-0,5	100 ± 9

^a 2-4 min Verzögerungsphase, im daran folgenden linearen Bereich bestimmt

Die Wildtyp-IRKD zeigte in der Autophosphorylierungsreaktion einen schnellen Einbau in Tyrosinreste, gefolgt von einer ca. 120fach langsameren Serinphosphorylierung. Nach 30 min waren 4,5-5 mol/mol Phosphateinbau nachweisbar, wovon 30-35 % auf Serinreste entfielen. Die Halbwertszeit des Phosphateinbaus lag bei etwa 9 Sekunden. Die mutierten Kinasen wiesen, entsprechend den fehlenden Phosphorylierungsstellen, niedrigere Gesamteinbauraten auf. Allerdings war bei 46F und 50F ein niedrigerer Einbau zu verzeichnen, als aufgrund einer fehlenden Stelle zu erwarten gewesen wäre. K1018A, der das für die ATP-Bindung essentielle Lysin, und D1120A, der die katalytische Base fehlt, zeigten erwartungsgemäß keine Kinaseaktivität.

Die Initialgeschwindigkeit des Phosphateinbaus wurde sehr unterschiedlich von den Mutationen beeinflusst. Während 51F, CS und SSDD nur eine leichte Veränderung gegenüber dem Wildtyp zeigten, lag bei 46F, 50F und Y3F die Geschwindigkeit um den Faktor 2 niedriger. Die auffälligste Veränderung aber ergab sich bei der Δ CT/ Δ CT*, deren Initialgeschwindigkeiten ca. 20fach erniedrigt waren.

Auch bei der Halbwertszeit des Phosphateinbaus ergaben sich Differenzen. Die 51F und die SSDD besaßen ca. 30 % niedrigere Halbwertszeiten als der Wildtyp, wogegen die Y3F eine leichte Erhöhung aufwies. Die größte Veränderung war wiederum bei Δ CT/ Δ CT* sichtbar, deren Halbwertszeiten um eine Größenordnung erhöht waren.

4.2 Serinautophosphorylierung

Von besonderer Bedeutung war die Frage, inwieweit sich die eingeführten Mutationen auf die Fähigkeit der Serinautophosphorylierung auswirken würden. 46F, 50F, Y3F und CS zeigten weder im Serinphosphateinbau noch der Initialgeschwindigkeit der Serinphosphorylierung signifikante Unterschiede zum Wildtyp. Die SSDD, bei der die beiden Autophosphorylierungsstellen S1275 und S1309 gegen Aspartat ausgetauscht wurden, hatte einen verringerten Anteil. Diese Serinphosphorylierung machte gut 25 % im Vergleich zum Wildtyp aus und war 10fach verlangsamt. Offensichtlich sind im Enzym noch weitere Serinreste vorhanden, die autophosphoryliert werden können, wenn auch mit deutlich verringerter Effizienz. Die Tatsache, daß bei den C-terminal verkürzten $\Delta\text{CT}/\Delta\text{CT}^*$ im Vergleich zu SSDD sowohl der Anteil an Serinphosphaten als auch deren Initialgeschwindigkeiten auf ähnlichem Niveau lagen, deutet darauf hin, daß diese Serinstellen vornehmlich außerhalb des C-Terminus lokalisiert sind. Dies deckt sich mit Beobachtungen, daß der Insulinrezeptor Serinphosphorylierung in der Juxtamembrandomäne zeigt (Feener *et al.*, 1993; Kayatz 1993; Heidenreich 1995; Magg 1993). Eine Überraschung war die geringe Fähigkeit der Mutante 51F, sich an Serinresten zu phosphorylieren. Die Aminosäure Y1151 scheint daher direkt oder indirekt in den Mechanismus der Serinautophosphorylierung eingebunden zu sein. Abb. 8 verdeutlicht die unterschiedliche Charakteristik exemplarisch im Vergleich der zeitabhängigen Autophosphorylierungen der 50F und der 51F. Dargestellt sind die Gesamteinbauraten ins Enzym und die jeweiligen Anteile an Serinphosphat.

Während beide Enzyme nach wenigen Minuten die maximale Phosphorylierung erreichten, war die Serinphosphorylierung zeitlich nachgeschaltet. 50F phosphorylierte sich an Serinresten vergleichbar wie die Wildtypkinase, wohingegen 51F deutlich verringerte Aktivität zeigt. Ebenso wie 51F verloren auch 46F, Y3F und SSDD nach 30 Minuten Reaktionszeit Radioaktivität, die übrigen Enzyme waren in diesem Zeitraum stabil. Der Zuwachs an Radioaktivität in Serinresten, der auf Kosten der Tyrosinphosphorylierung verläuft, ist wahrscheinlich nicht auf einem Transfer von Tyrosinphosphaten auf Serinreste begründet, wie Abb. 9 darlegt.

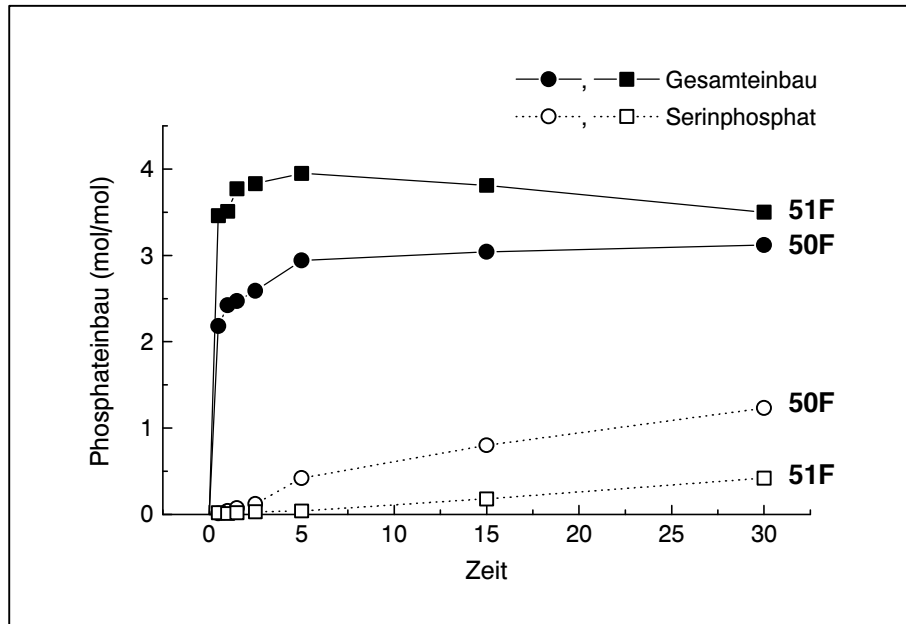


Abb. 8 Zeitverlauf der Autophosphorylierungsreaktionen von 50F und 51F. Ausgefüllte Symbole markieren die Gesamtinkorporation an radioaktivem Phosphat, offene Symbole stellen den Einbau in Serinreste dar.

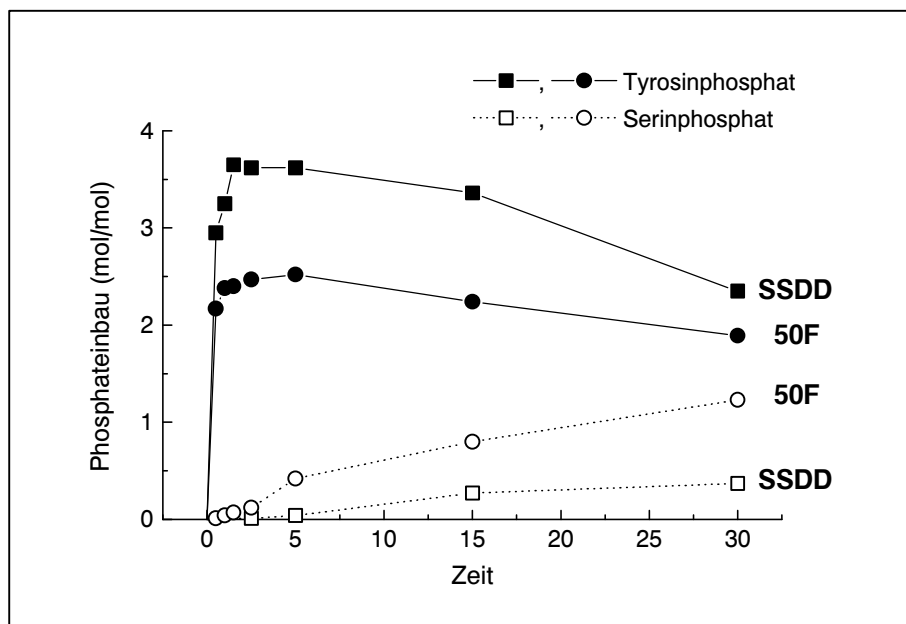


Abb. 9 Zeitverlauf des Phosphateinbaus in 50F und SSDD. Ausgefüllte Symbole stellen die Inkorporation in Tyrosin- und offene Symbole die Inkorporation in Serinreste dar.

Gezeigt sind die Anteile von Tyrosin- und Serinphosphorylierung der Kinasen 50F und SSDD in einem Zeitraum von 30 Minuten. Im Gesamtphosphateinbau war 50F während dieser Zeit stabil, während SSDD, die nur noch geringe Serinphosphorylierung aufwies, nach längeren Zeiten beständig Radioaktivität verlor. Beide Kinasen verloren ab 5 Minuten vergleichbar Radioaktivität in Tyrosinresten, wobei der Effekt bei der SSDD ausgeprägter war. Die Zunahme an Serinphosphorylierung korrelierte aber in keinem Fall mit der Abnahme der Tyrosinphosphorylierung. Bei der 50F war ein stärkerer Zuwachs an Serin- als die Abnahme an Tyrosinphosphorylierung zu beobachten. Im Gegensatz dazu war eine stärkere Dephosphorylierung der Tyrosin- als eine Phosphorylierung der Serinreste erkennbar.

4.3 Lokalisierung phosphorylierter Reste

4.3.1 Methodik der Phosphopeptid-Kartierung

Um die bei den Autophosphorylierungsreaktionen beteiligten Aminosäurereste lokalisieren zu können, wurden von sämtlichen Kinasen Phosphopeptid-Kartierungen (10.8) erstellt, die Reaktionszeiten von 10 Sekunden bis 30 (teilweise 60) Minuten unter Standardbedingungen abdeckten. Bei dieser Methode werden phosphorylierte Proteine (50000-100000 cpm) aus einem getrockneten SDS-PAGE mit TPCK-behandeltem oder „sequencing grade“-Trypsin eluiert und die Eluate mit Hilfe einer HPLC-Anionenaustauschchromatographie in einzelne Signale getrennt. Auf diese Weise entstehen bei der IRKD theoretisch 46 Fragmente (48 bei einer um eine Histidin-Markierung verlängerte IRKD), von denen 27 (29) die Aminosäurereste Tyrosin, Serin und Threonin besitzen und somit potentielle Phosphorylierungsstellen darstellen. 14 Phosphopeptide wurden chemisch sequenziert (Al-Hasani *et al.*, 1997); 5 tryptische Peptide wurden identifiziert, die 7 rezeptoreigene Autophosphorylierungsstellen enthielten (Tab. 3). Identifiziert wurden die Tyrosine 1146, 1150 und 1151 der Kinasedomäne, die partiell oder vollständig phosphoryliert vorliegen können; da diese auf einem Peptid lokalisiert sind, können bei der Phosphopeptid-Kartierung Signale mit ein- oder mehrfach phosphorylierten Formen unterschieden werden. Daneben wurden im C-Terminus die Tyrosine 1316 und 1322 sowie die Serinreste 1275 und 1309 als Phosphorylierungsstellen bestimmt; die Tyrosine liegen ebenfalls auf einem Peptid und können partiell (mono) oder vollständig (bis) phosphoryliert sein. Die N-terminale Histidin-Markierung enthält ein Tyrosin, welches ebenfalls phosphoryliert wurde. Durch den Vergleich der Retentionszeiten können tryptische Fragmente der einzelnen IRKD-Derivate entsprechenden Phosphopeptiden zugeordnet werden.

Tab. 3 Lokalisierung der sequenzierten Phosphopeptide und Positionen der phosphorylierten Aminosäuren im humanen Insulinrezeptor (IR). Sequenzdaten nach Ullrich *et al.*, 1985.

Peptid	Aminosäuren im IR	Position im IR	Domäne
DlpYETDpYpYR	1144-1152	Y1146, Y1150, Y1151	Kinase
SpYEEHIPpYTHMNGGK	1315-1329	Y1316, Y1322	C-Terminus
APEpSEELEMEFEDMENVPLDR	1272-1292	S1275	C-Terminus
DGGSpSLGFK	1305-1313	S1309	C-Terminus
DLpYDDDDK	-	-	Poly(His)

Die Phosphopeptid-Kartierung war auf einer Shimadzu-Anlage mit einer Anionenaustauschsäule SAX 1000-8/46 (50 × 4,6 mm; Macherey-Nagel) etabliert. Um Wechselwirkungen der Phosphopeptide mit Metallen der Anlage zu minimieren, wurde das Protokoll auf eine bioinerte HPLC-Gold-Anlage von Beckman übertragen. In Verbindung mit einem HPLC-Durchfluß-Radiometer 505TR von Packard ergab sich eine weiter verbesserte Auflösung der Signale.

Als Puffer wurden 20 mM Ammoniumacetat pH 7 (A) und 1 M KH₂PO₄ pH 4 (B) verwendet. Die Elution erfolgte durch einen zweistufigen Lineargradienten: 0 min 0 % B, 10 min 0 % B, 50 min 10 % B, 125 min 50 % B, die Flußgeschwindigkeit betrug 0,5 ml/min. Die Fraktionen wurden entweder à 0,5 ml gesammelt und im β-Counter gezählt oder im HPLC-Radiometer in einer 0,5 ml-Cerenkov-Flußzelle je 8 Sekunden mit Chemilumineszenz-Korrektur gemessen; der Multikanalanalysator zur Bestimmung des Signal-/Rauschverhältnisses ergab ein optimales Energiefenster von 0-24 keV für das Radiometer.

4.3.2 Identifizierung zweier bisphosphorylierter Formen der Kinasedomäne

Abb. 10 zeigt ein charakteristisches Elutionsprofil der Wildtyp-IRKD nach 60 Minuten Autophosphorylierung unter Standardbedingungen.

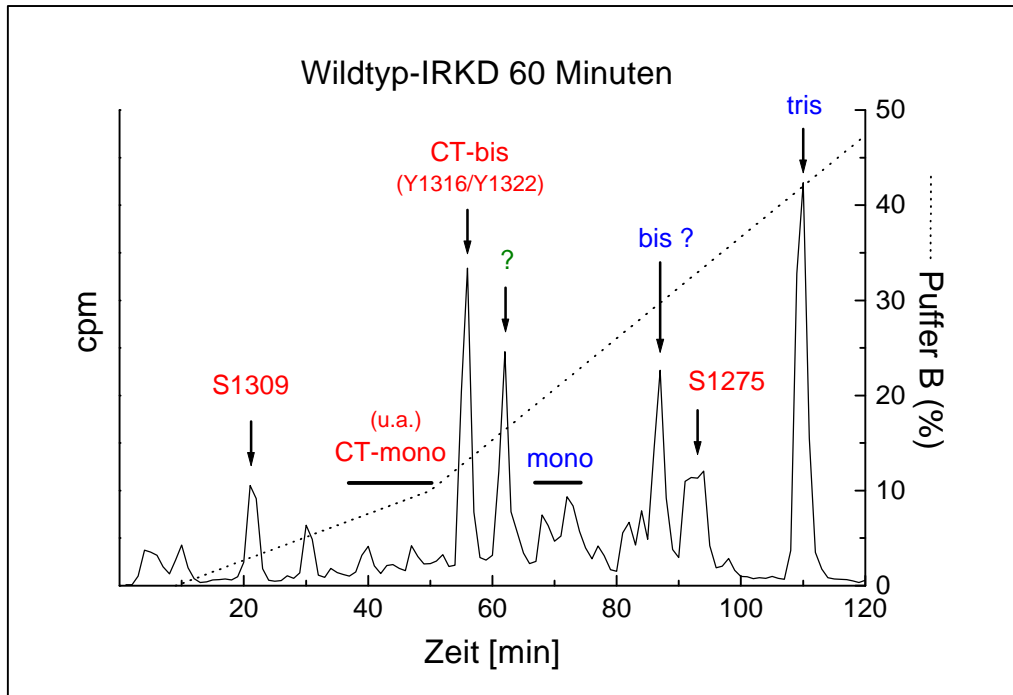


Abb. 10 Chromatographisches Referenz-Profil der IRKD nach 60 Minuten Autophosphorylierung unter Standardbedingungen. Gemessen wurden die radioaktiven Signale der tryptischen Phosphopeptide nach Anionenaustauschchromatographie. Gepunktet ist der theoretische Salzgradient eingezeichnet. Mono, bis, tris: mono-, bis-, trisphosphorylierte Form der Kinasedomäne (Y1146, Y1150, Y1151); CT-mono, CT-bis: mono-, bisphosphorylierte Form der C-terminalen Domäne (Y1316, Y1322); S1275, S1309: Phosphopeptide mit den Serinautophosphorylierungsstellen 1275 und 1309.

Zu erkennen sind die Signale der partiell („mono“) oder vollständig („tris“) phosphorylierten Tyrosine 1146, 1150 und 1151 (Retentionszeiten von 67-73 und 110 min), der partiell („CT-mono“) oder vollständig („CT-bis“) phosphorylierten Tyrosine 1316 und 1322 des C-Terminus (35-50 und 58 min) sowie die Phosphopeptide mit S1275 (93 min) und S1309 (21 min). Zu Beginn dieser Arbeit waren zwei bis dahin nicht identifiziertes Signale mit Retentionszeiten von 62 und 87 Minuten vorhanden; bei dem ersteren handelt es sich wahrscheinlich um ein tyrosinphosphoryliertes Signal des Juxtamembranbereichs (s. 8.3, Abb. 39). Das Signal nach 87 Minuten eluierte zwischen der monophosphorylierten und der trisphosphorylierten Form der Kinasedomäne. Da dieses Signal auch in einem phosphorylierten Substrat, welches die Kinasedomäne des Insulinrezeptors darstellt (GST-Ex20), nachgewiesen werden konnte, handelte es sich möglicherweise um eine bisphosphorylierte Form (Lehr 1995). Um diese Vermutung

abzuklären, wurden Kartierungen der mutierten Kinasen 46F, 50F und 51F nach 30 Minuten Autophosphorylierung erstellt (Abb. 11). Diesen Kinasen fehlt je ein Tyrosin der Kinasedomäne, dementsprechend können diese jeweils nur eine definierte Bis-Form ausbilden. 50F und 51F zeigten beide dieselbe Bis-Form (87 min), 46F hingegen ein später eluierendes Signal (90 min). Die Bis-Formen mit den phosphorylierten Tyrosinen 1146/1150 und 1146/1151 („1“) sind demnach in der Kartierung nicht unterscheidbar, während die Bis-Form Y1150/1151 („2“) ein stärker retardierendes Phosphopeptid erzeugt.

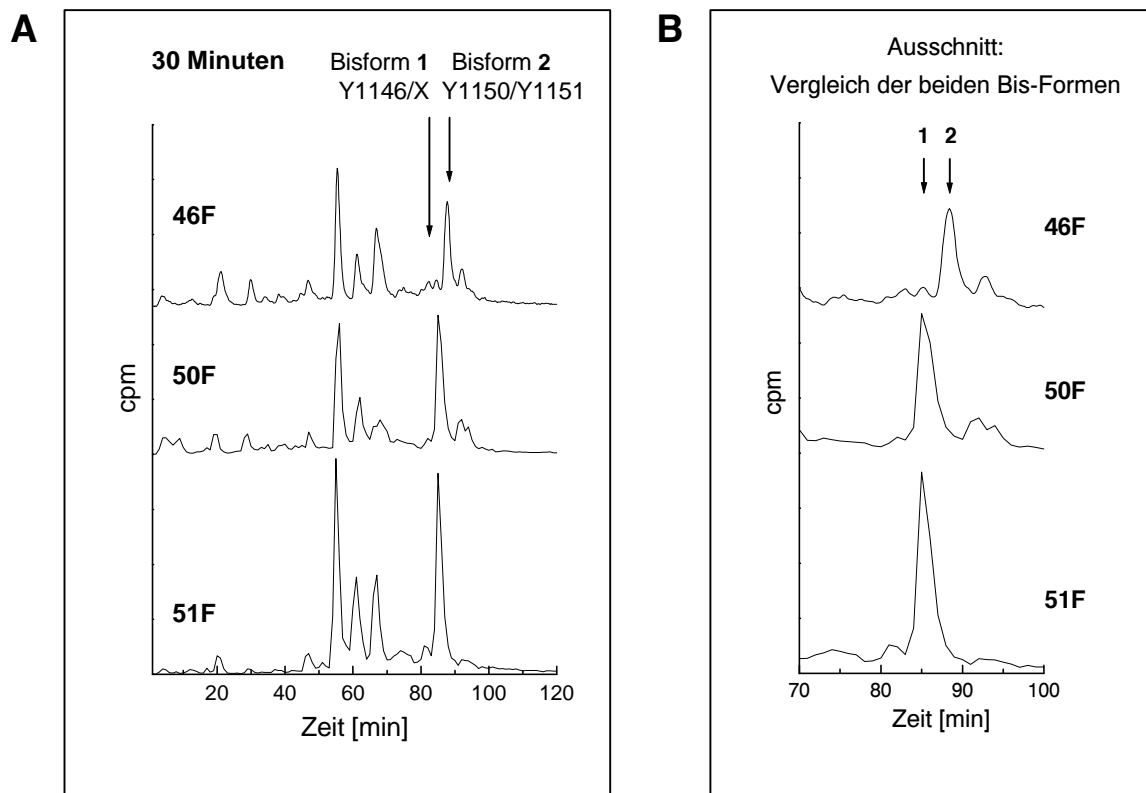


Abb. 11 A Phosphopeptid-Kartierungen der Kinasen 46F, 50F und 51F nach 30 Minuten Auto-phosphorylierung unter Standardbedingungen. Bisform 1: Peptid mit phosphorylierten Y1146 und Y1150 oder Y1151; Bisform 2: Peptid mit phosphorylierten Y1150 und Y1151.
B Ausschnittsvergrößerung des Bereichs von 70 bis 100 Minuten Retentionszeit.

4.3.3 Zeitverlauf der Phosphatinkorporation

Um die molekulare Basis der unterschiedlichen Initialgeschwindigkeiten der Kinasen zu ergründen, wurden jeweils Phosphopeptid-Kartierungen von 10 bis 90 Sekunden unter Standardbedingungen durchgeführt. Bei der IRKD wurden dabei die beiden Bis-Formen identifiziert (Abb. 12). Überraschenderweise war ein Signal (Retentionszeit von 92 min) bis 30 Sekunden vorherrschend, während das andere (Retentionszeit von 87 min) ab diesen Zeitpunkt dominierte. Das später eluierende Signal wies dabei eine geringfügig verschiedene Retentionszeit gegenüber der Bis-Form Y1150/Y1151 der Mutante 46F auf (92 zu 90 min). Das es sich bei beiden um dasselbe Signal handelte, konnte durch die Phosphorylierung des Gst-Ex20 unter stöchiometrischen Bedingungen nachgewiesen werden; dieses zeigte in einer Phosphopeptid-Kartierung neben mono- und trisphosphorylierten Peptiden ebenfalls zwei Signale mit Retentionszeiten von 87 und 92 min (s. 8.3, Abb. 39). Folglich

mußte es sich bei der im Wildtyp als erste nachweisbare Bis-Form um das Peptid mit phosphorylierten Y1150/Y1151 handeln. Da die Phosphopeptide Y1146/Y1150 und Y1146/Y1151 anhand ihres Elutionsverhaltens nicht unterschieden werden konnten, ist nicht entscheidbar, ob die zeitlich spätere Bis-Form nur eine der beiden oder ein Gemisch beider Formen umfaßte. Sicher ist, daß nach 90 Sekunden in der IRKD nur noch eine phosphorylierte Bis-Form Y1146/X nachweisbar war, wobei X Y1150 und/oder Y1151 darstellt. Es findet somit ein Wechsel der bisphosphorylierten Formen der Kinasedomäne statt, bei der zuerst Y1150 und Y1151 phosphoryliert vorliegen.

Es ist anzumerken, daß das Signal der bisphosphorylierten Form der Tyrosine Y1150/Y1151 annähernd die gleiche Retentionszeit wie das Phosphopeptid mit S1275 hat und dieses unter bestimmten Reaktionsbedingungen verdecken kann. In einer Autophosphorylierungsreaktion wurde dies jedoch nicht beobachtet, da die Bis-Form mit Y1150/Y1151 nur initial und die Phosphorylierung des S1275 nur zu späteren Zeiten stattfand.

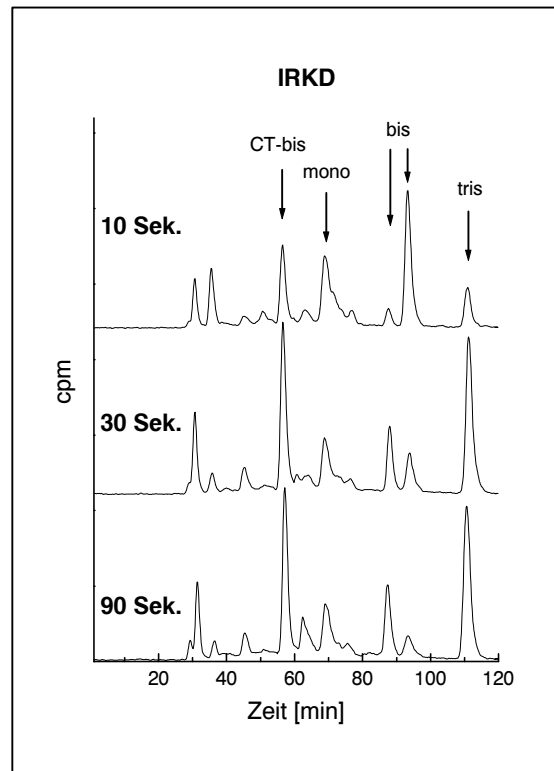
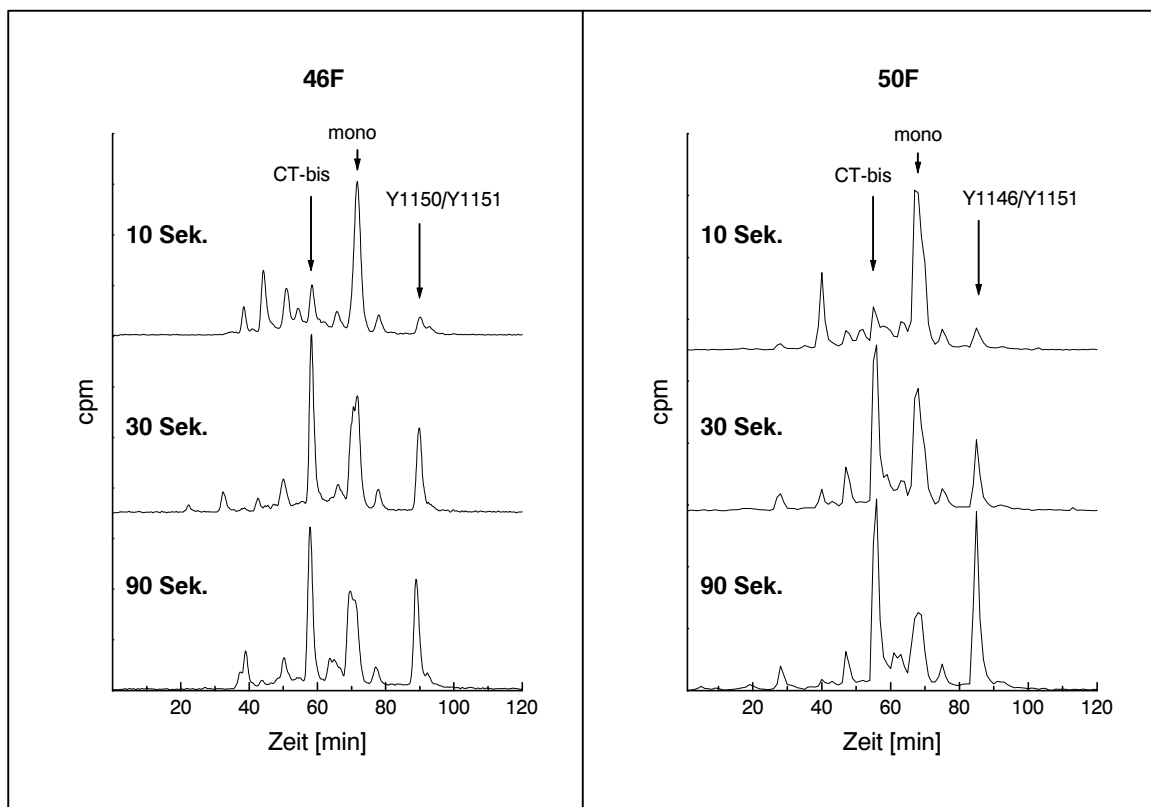


Abb. 12 Phosphopeptid-Kartierung der Wildtyp-IRKD von 10 bis 90 Sekunden Reaktionszeit unter Standardbedingungen. Die beiden Bis-Formen sind unterscheidbar und verändern sich im Laufe der Reaktion.

4.3.4 Vergleich der Initialgeschwindigkeiten und der zeitabhängigen Besetzung

Ausgehend von diese Grundlagen und den neu identifizierten Signalen wurden die Phosphopeptid-Kartierungen der einzelnen Kinasen verglichen. Dabei ergab sich eine Korrelation zwischen der Initialgeschwindigkeit der Autophosphorylierung und der Besetzung einzelner Tyrosinreste in der Kinasedomäne und im C-Terminus. Die Wildtyp-IRKD (Abb. 12) ließ schon nach 10 Sekunden einen teilweise bisphosphorylierten C-Terminus (Y1316/Y1322) und eine überwiegend an Y1150/Y1151 phosphorylierte Kinasedomäne erkennen, nach 30 Sekunden war die trisphosphorylierte Form maximal. Abb. 13 zeigt die Kartierungen der untersuchten Kinasen von 10 bis 90 Sekunden Reaktionszeit.



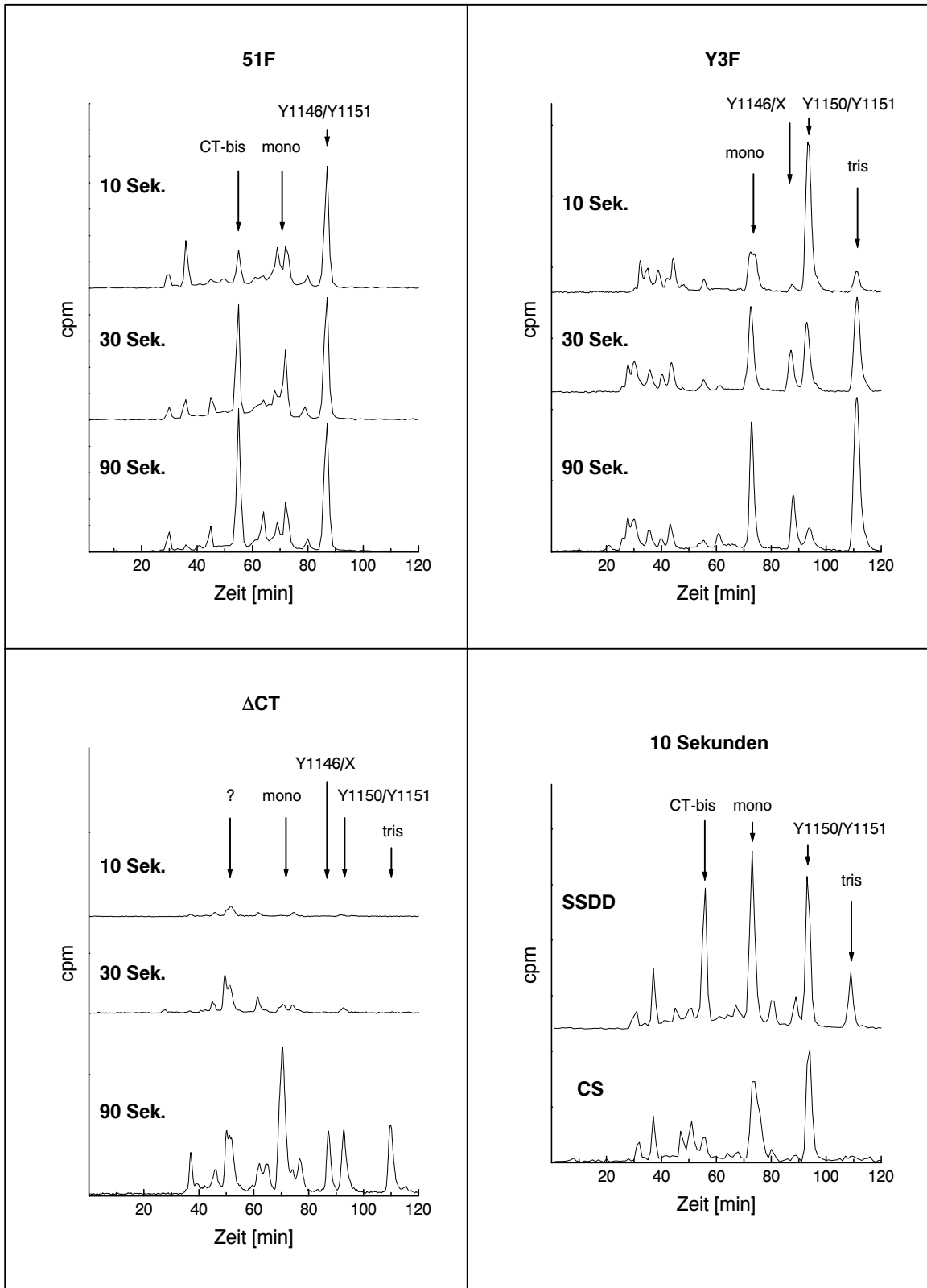


Abb. 13 (Diese und vorige Seite) Phosphopeptid-Kartierungen von 46F, 50F, 51F, Y3F, SSDD, CS und Δ CT nach 10 bis 90 Sekunden Autophosphorylierungsreaktion unter Standardbedingungen.

Im Vergleich zur IRKD dominierten bei den zweifach langsameren 46F und 50F nach 10 Sekunden monophosphorylierte Formen der Kinasedomäne und des C-Terminus, die Bis-Formen der Kinasedomäne erreichten erst nach 90 Sekunden den maximalen Wert. Bei 51F hingegen, die eine vergleichbare Geschwindigkeit wie der Wildtyp aufwies, war nach 10 Sekunden eine schnelle bis zur Sättigung reichende Besetzung der bisphosphorylierten Kinasedomäne zu beobachten. Die Bis-Form Y1146/Y1150 scheint in den Mutanten offensichtlich bevorzugt phosphoryliert zu werden.

Die ebenfalls zweifach langsamere Y3F verhielt sich in Bezug auf die Phosphorylierungsstellen der Kinasedomäne ähnlich wie der Wildtyp, erreichte die höchstmögliche trisphosphorylierte Form aber erst nach 90 Sekunden. Zudem war zu diesem Zeitpunkt ein hoher Anteil der monophosphorylierten Form erkennbar. Die niedrigere Initialgeschwindigkeit ist somit nicht nur auf den Verlust der C-terminalen Phosphorylierungsstellen zurückzuführen, sondern auch auf eine verzögerte Aktivierung der Kinasedomäne.

Die stark verlangsamte Autophosphorylierung der Δ CT ließ sich auch durch Phosphopeptid-Kartierung verifizieren. Bis 30 Sekunden war hauptsächlich ein nicht identifiziertes Signal sichtbar, bevor nach 90 Sekunden vornehmlich die monophosphorylierte und, schwächer ausgeprägt, beide Bis-Formen und die Tris-Form nachweisbar waren. Obwohl zu späteren Zeitpunkten die einzige Bis-Form Y1146/X war, ist die Reihenfolge der Bis-Formen bei der Δ CT nicht eindeutig identifizierbar. Möglicherweise werden beide gleichzeitig ausgeprägt.

Die SSDD ist insofern interessant, als daß nach 10 Sekunden die Phosphorylierung der C-terminalen Tyrosine annähernd komplettiert war (70-90 %); beim Wildtyp erreichte die Bis-Form des C-Terminus zu diesem Zeitpunkt etwa 30-50 % des maximalen Werts. Die Kinasedomäne wurde bei beiden Enzymen mit vergleichbarer Kinetik phosphoryliert. Dies deckt sich mit der Beobachtung einer leicht erhöhten Initialgeschwindigkeit und einer verringerten Halbwertszeit des Phosphateinbaus bei der SSDD. Die Einführung zweier negativer Ladungen im C-Terminus führt offenbar zu einer Stimulation der C-terminalen Autophosphorylierung. Im Gegensatz dazu war bei der CS nach 10 Sekunden kein bisphosphorylierter C-Terminus erkennbar, auch die Kinasedomäne schien leicht verzögert phosphoryliert zu werden.

4.3.5 Lokalisierung der Serinautophosphorylierungsstellen

Neben einer Phosphorylierung an Tyrosinen findet bei der IRKD auch eine zeitlich verzögerte Phosphorylierung der Serinreste 1275 und 1309 statt. Bei der SSDD sind diese beiden Autophosphorylierungsstellen gegen Aspartat substituiert und sollten in der Phosphopeptid-Kartierung abwesend sein. Die Kinase 51F zeigte eine stark verminderte Serinautophosphorylierung. Daher wurden von diesen Enzymen Kartierungen nach 60 Minuten Reaktionszeit unter Standardbedingungen erstellt, um Unterschiede der Serinphosphorylierung qualitativ beschreiben zu können (Abb. 14).

Beim Wildtyp waren die Signale der phosphorylierten Peptide mit S1275 (Retentionszeit von 92 min, 84 % Phosphoserinanteil; Abb. 15, Spur 4) und S1309 (Retentionszeit von 23 min, 89 % Phosphoserinanteil; Abb. 15, Spur 3) sichtbar, deren Serinphosphorylierung ca. 5 % (S1309) bzw. 8 % (S1275) des Gesamteinbaus an Radioaktivität ausmachten. Bei SSDD waren diese Phosphopeptide erwartungsgemäß nicht nachweisbar, bei 92 Minuten eluierte nur ein tyrosinphosphoryliertes Peptid (Abb. 15, Spur 5). Das S1275-Signal war auch bei der 51F nicht erkennbar, wogegen das S1309-Peptid gegenüber dem Wildtyp verringert erschien (23 min, 96 % Phosphoserinanteil). Offenbar kann die 51F die C-terminalen Serinreste mit einer nur geringen Effizienz (S1309) bzw. überhaupt nicht mehr (S1275) phosphorylieren. Diese verringerte Fähigkeit war auf die 51F beschränkt, da die Phosphorylierungsstellen S1275 und S1309 bei den Kinasen 46F, 50F (s. Abb. 11) und Y3F (s. 7.3, Abb. 31 „Pulse“) nachgewiesen werden konnten.

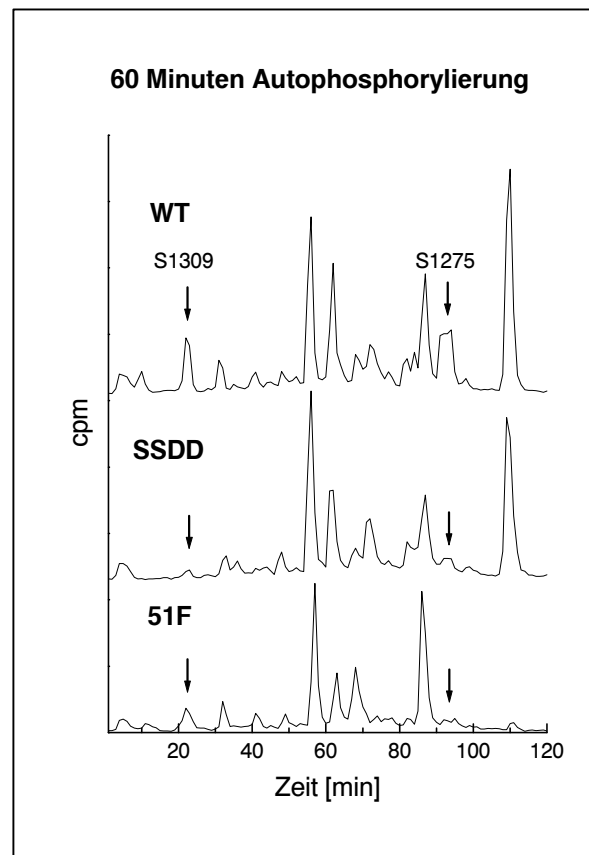


Abb. 14 Phosphopeptid-Kartierung von IRKD, SSDD und 51F zur Lokalisation der Serinphosphorylierungsstellen S1275 und S1309. Die Kinasen wurden 60 Minuten unter Standardbedingungen phosphoryliert.

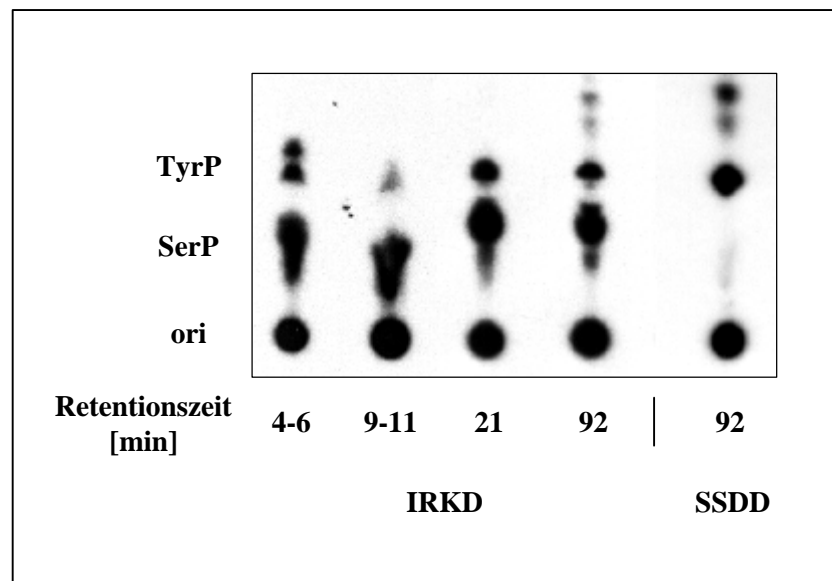


Abb. 15 Phosphoaminosäure-Analyse einzelner Signale der Phosphopeptid-Kartierung. Die Signale der angeführten Elutionszeiten wurden entsalzt (10.8) und nach saurer Hydrolyse dünn-schichtchromatographisch getrennt. Spuren 1-4: Signale der IRKD nach 4-6, 9-11, 21 (S1309) und 92 (S1275) Minuten Elutionszeit; Spur 5: Signal der SSDD nach 92 Minuten Elutionszeit. Oberhalb der Phosphoaminosäuren sind nicht hydrolysierte Peptide erkennbar.

Die SSDD wies trotz der beiden fehlenden Serinphosphorylierungsstellen noch Serinphosphorylierung auf. Daraufhin wurden die anderen Signale der phosphorylierten Wildtyp-IRKD auf Phosphoserin untersucht. Im Durchlauf (Retentionszeiten von 4-6 min bzw. 9-11 min) fanden sich mit 74 % bzw. 96 % (Abb. 15, Spuren 1 und 2) signifikante Anteil an Phosphoserin. Im Chromatogramm der SSDD fehlte das Signal von 9-11 min, was darauf hindeutet, dass in diesen ebenfalls das Phosphopeptid mit S1309 eluiert. Das Signal von 4-6 min konnte neben den gezeigten Kinasen auch in der 50F, nicht aber in der Δ CT nachgewiesen werden (s. 7.3, Abb. 31 „Pulse“). Es ist daher einem weiteren Peptid des C-Terminus zuzuordnen, welches unter den Versuchsbedingungen nicht an die Anionenaustauschersäule bindet. Das Peptid SSHCQR enthält die potentiellen Serinphosphorylierungsstellen S1293 und S1294 (Lewis *et al.*, 1990a) und sollte bei pH 7 und einfacher Phosphorylierung keine Nettoladung tragen. Das Signal von 4-6 min könnte durch dieses Phosphopeptid repräsentiert werden. Der Serinphosphatanteil der beiden Signale des Durchlaufs betrug je 2 % der Gesamtradioaktivität der Wildtypkinase. Zusammen ergab sich somit ein Anteil von 17 % Serinphosphaten in distinkten Signalen.

5 Aktivierung der Insulinrezeptorkinase

Die vorliegenden Röntgenkristallstrukturen der unphosphorylierten und der phosphorylierten Form der verkürzten löslichen Insulinrezeptorkinase geben keinen Hinweis auf die initiale Aktivierung der Kinase. Insbesondere über die Rolle des flexiblen C-Terminus ist wenig bekannt, da dieser in den Röntgenkristallstrukturen fehlt (Hubbard *et al.*, 1994; Hubbard 1997). Unklar ist zudem, ob die Aktivierung intramolekular in einer Untereinheit, als in einem cis-Mechanismus, oder intermolekular zwischen den beiden Untereinheiten (trans) stattfindet, oder ob beide Mechanismen eine Rolle spielen; konzentrationsabhängige Autophosphorylierungen zur Klärung dieser Frage erbrachten kontroverse Ergebnisse (Cobb *et al.*, 1989; Herrera *et al.*, 1988; Villalba *et al.*, 1989; Kohanski 1993a; Wei *et al.*, 1995). Auch über die Reihenfolge der Besetzung der Tyrosine der Kinasedomäne herrscht kein Konsens. Die Kristallstruktur legt die initiale Phosphorylierung von Y1150 in einer trans-Reaktion nahe (Hubbard *et al.*, 1994). Dann scheint Y1146 und zuletzt Y1151 besetzt zu werden (Wei *et al.*, 1995). Andere Arbeitsgruppen berichten, daß Y1151 vor Y1146 phosphoryliert werden soll (Stadtmauer und Rosen, 1986; Levine *et al.*, 1991; Ellis und Levine, 1991; Kohanski 1993b). Nicht auszuschließen ist initial eine Phosphorylierung des C-Terminus, der bei der inaktiven Kinase in das aktive Zentrum reichen könnte.

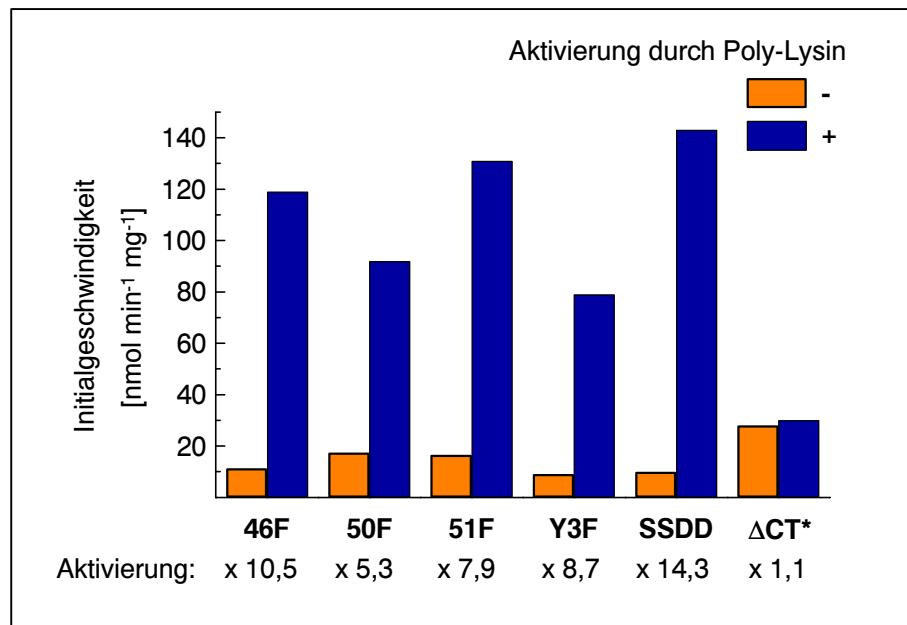
Im Zusammenhang mit der Aktivierung steht die Rolle des aktivierenden Polykations Poly-L-Lysin. Diese Polyaminosäure führt wie andere Polykationen zu einer 10-20fachen Steigerung der Initialgeschwindigkeit der Autophosphorylierung und zu einer 2-3fachen Erhöhung des maximalen Phosphateinbaus (Al-Hasani 1995; Tennagels 1998; Rosen und Lebowitz, 1988). Zudem steigert Poly-L-Lysin den Anteil der Serinphosphorylierung der IRKD. Poly-L-Lysin soll die Di-/Oligomerisierung der monomeren löslichen Kinase und damit trans-Phosphorylierungen begünstigen und interagiert möglicherweise mit einem sauren Bereich des C-Terminus (Baron *et al.*, 1995). Maximale Kinaseaktivität wird bei äquimolaren Mengen an Poly-L-Lysin zur Kinase erreicht (Al-Hasani 1995; Tennagels 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden der Mechanismus der Aktivierung zum einen auf die Frage einer cis- oder trans-Phosphorylierung untersucht; zum anderen wurde versucht, die Reihenfolge der Autophosphorylierung unter besonderer Berücksichtigung der initial phosphorylierten Reste zu ermitteln.

5.1 Einfluß des Polykations Poly-L-Lysin

Um festzustellen, ob die eingeführten Mutationen sich auf die Aktivierbarkeit durch Poly-L-Lysin auswirken, wurden Autophosphorylierungsreaktionen der Kinasen unter Standardbedingungen ohne und mit 1 μM Poly-L-Lysin durchgeführt. Die Kinasen (je 10 pmol) wurden 30 Sekunden autophosphoryliert und die Reaktionen durch Zugabe

von SDS-Probenpuffer abgestoppt. Die Radioaktivität der Kinasen wurden wie in 4.1 (10.6.2) bestimmt. Abb. 16 stellt die Ergebnisse graphisch dar. Zu beachten ist, daß die Initialgeschwindigkeiten im Gegensatz zu Tabelle 2 (4.1) nach 30 Sekunden Reaktionszeit bestimmt wurden und dementsprechend niedriger liegen.



ΔCT*: Wieber 1998

Abb. 16 Aktivierung der Initialgeschwindigkeit des Phosphateinbaus durch Poly-L-Lysin. Die untersuchten Kinasen wurden für 30 Sekunden unter Standardbedingungen in Ab- (orange) bzw. Anwesenheit (blau) des Polykations phosphoryliert.

Der Wildtyp konnte mit Poly-L-Lysin um das 10fache stimuliert werden (Tennagels 1998). Vergleichbares wurde für die Kinasen 46F, 51F, Y3F und SSDD festgestellt. Die 50F ließ sich weniger stark aktivieren. Die auffälligste Änderung jedoch wurde bei der ΔCT* festgestellt: Zugabe von Poly-L-Lysin führte zu einer kaum meßbaren Aktivierung. Der Verlust des C-Terminus führte somit bei der Insulinrezeptorkinase zu einer drastisch reduzierten, von Poly-L-Lysin abhängigen Stimulierbarkeit der initialen Auto-phosphorylierung. Ungewöhnlich war zudem, daß in der sich anschließenden Reaktionszeit eine Steigerung des Phosphateinbaus mit Poly-L-Lysin zu beobachten war, während ohne Polykation nur noch wenig weitere Radioaktivität inkorporiert wurde. Der Phosphateinbau konnte auf diese Art um das 3-3,5fache gesteigert werden (Wieber 1998). Die Stimulierung durch Poly-L-Lysin scheint folglich in zwei Phasen zu erfolgen: einer initialen, vom C-Terminus abhängigen und einer nach erfolgter Aktivierung, die unabhängig von der Anwesenheit des C-Terminus ist.

5.2 Autophosphorylierung unter äquimolaren ATP-Verhältnissen

5.2.1 Zeitabhängige Phosphatinkorporation in Abhängigkeit von Poly-L-Lysin

Es konnte gezeigt werden, daß die erste nachweisbare Bis-Form des Kinasedomäne die Phosphorylierung von Y1150 und Y1151 umfaßt (s. 4.3.2). Dies legte die Vermutung nahe, daß eine der beiden Reste die erste phosphorylierte Aminosäure der Kinasedomäne sein könnte. Allerdings verlief die Autophosphorylierung unter Standardbedingungen zu schnell, als daß Aussagen über die initiale Besetzung der Phosphorylierungsstellen und dabei verlaufende cis- bzw. trans-Phosphorylierungsprozesse getroffen werden konnten. Auch die Erniedrigung der Reaktionstemperatur auf 4 °C erwies sich als nicht als ausreichend. Erst durch Herabsetzen der ATP-Konzentration auf äquimolaren Mengen zur Kinase (1 µM) wurde die Reaktion genügend verlangsamt. Unter diesen Bedingungen steht pro Kinasemolekül ein ATP-Molekül zur Verfügung, wodurch der ATP-Vorrat schnell aufgebraucht wird und die Autophosphorylierung zum Stillstand kommt („single turnover“). Es sollten dabei diejenigen Hydroxylgruppen phosphoryliert werden, die kinetisch bevorzugt sind

Derart verlangsamt, boten Autophosphorylierungen der Kinasen die Möglichkeit, Untersuchungen der zuerst phosphorylierten Aminosäure durchzuführen. Gleichzeitig sollten Aussagen über initiale cis- oder trans-Phosphorylierungen möglich sein. Wenn Poly-L-Lysin die Dimerisierung und damit trans-Phosphorylierungen ermöglicht, sollte der initiale Phosphorylierungsschritt durch Poly-L-Lysin stimulierbar sein. Wäre die erste Phosphorylierung in cis, so sollte diese unabhängig von Poly-L-Lysin sein. Die Ergebnisse der Autophosphorylierung der ΔCT^* mit und ohne Poly-L-Lysin mit 250 µM ATP deuteten darauf hin, daß Poly-L-Lysin mit der C-terminalen Domäne interagiert. In diesem Fall sollte mit 1 µM ATP der Einfluß des Poly-L-Lysins ebenfalls gering sein. Da aber die Möglichkeit besteht, daß ohne C-Terminus die Dimerisierung der Kinase unterbleibt, wäre auch mit Poly-L-Lysin nur eine cis-Phosphorylierung möglich.

Alle Kinasen (1 µM) wurden mit 1 µM ATP und in An- bzw. Abwesenheit von 1 µM Poly-L-Lysin phosphoryliert. Nach 10 Sekunden bis 20 Minuten wurden die Reaktionen in SDS-Probenpuffer gestoppt. Die Radioaktivität der Kinasen wurden wie in 4.1 bestimmt. Abb. 17 zeigt ein repräsentatives Autoradiogramm einer solchen Autophosphorylierungsreaktion.

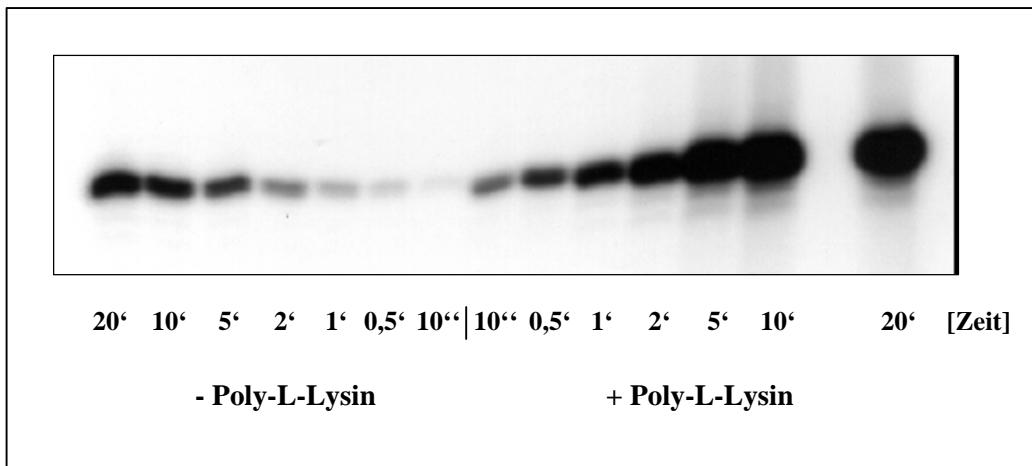


Abb. 17 Autophosphorylierung der IRKD in An- und Abwesenheit von Poly-L-Lysin mit 1 μM ATP. Die Kinase wurde für 10 Sekunden bis 20 Minuten phosphoryliert und mittels SDS-PAGE getrennt. Gezeigt ist das Autoradiogramm. Zur Auswertung siehe Abb. 19.

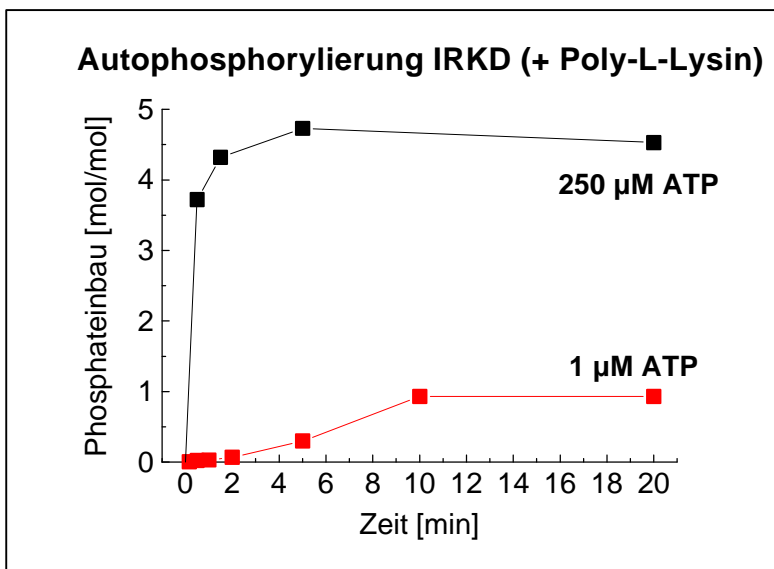


Abb. 18 Vergleich der zeitabhängigen Autophosphorylierung der Wildtyp-IRKD unter verschiedenen ATP-Konzentrationen. Die IRKD wurde in Anwesenheit von Poly-L-Lysin mit 1 bzw. 250 μM ATP für 10 Sekunden bis 20 Minuten phosphoryliert.

Abb. 18 vergleicht graphisch den zeitlichen Verlauf der Reaktion für die Wildtyp-IRKD in Anwesenheit von Poly-L-Lysin mit einer Reaktion unter Standardbedingungen bei 250 μM ATP. Mit 1 μM ATP verlief die Reaktion erwartungsgemäß langsamer als mit 250 μM und war durch einen biphasischen Verlauf gekennzeichnet; insbesondere in den ersten zwei Minuten der Reaktion war die Phosphorylierung stark verzögert. In der zweiten

Phase stieg der Phosphateinbau rasch an und erreichte nach 10 Minuten mit 1 mol/mol den maximalen Einbau. Bis 20 Minuten war der Phosphateinbau stabil und nur auf Tyrosinreste beschränkt. Die Initialgeschwindigkeit des Phosphateinbaus betrug zu Beginn der Reaktion 0,7 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ und im linearen Anteil zu Beginn der zweiten Phase 1,7 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$.

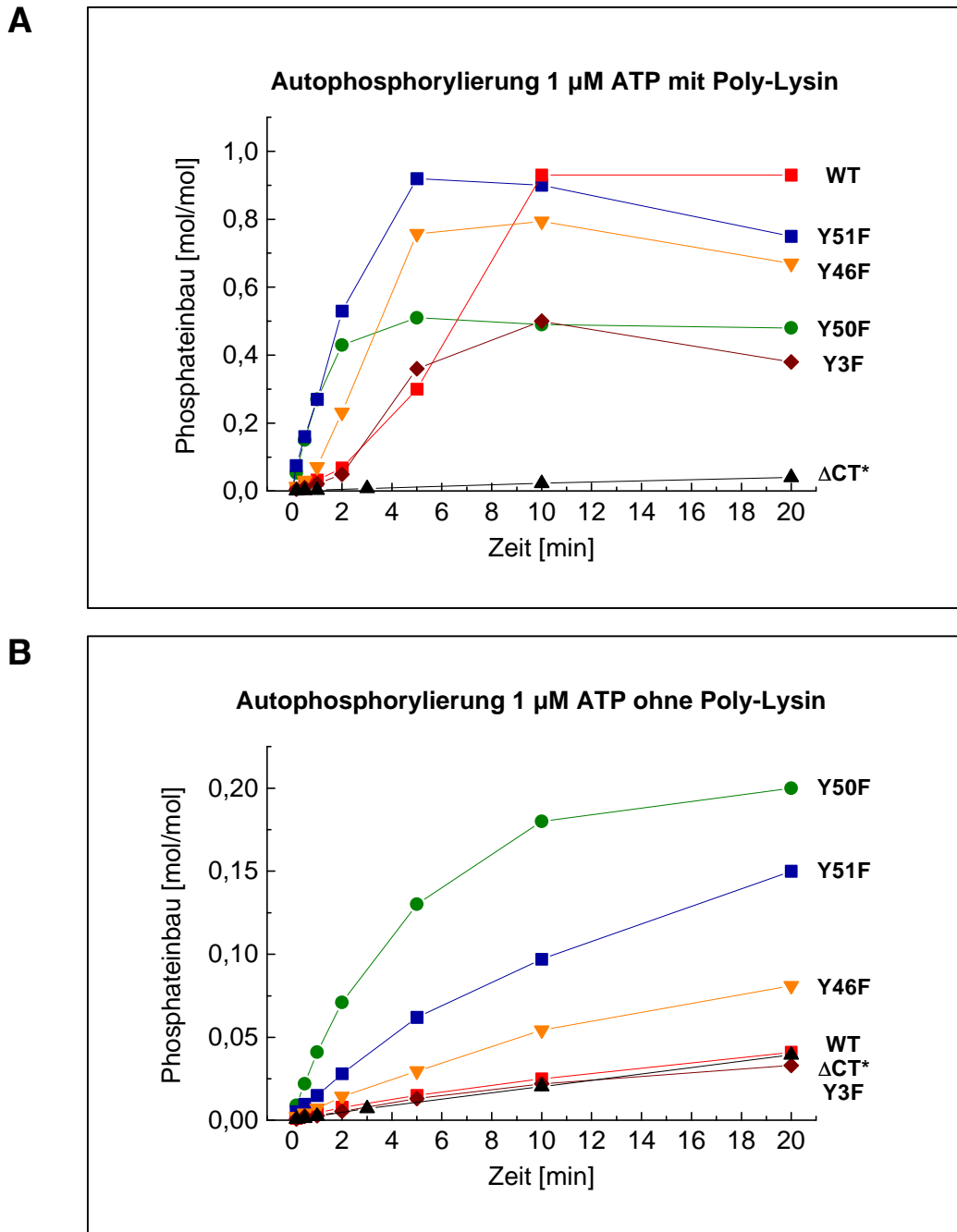


Abb. 19 Autophosphorylierung mit 1 μ M ATP in An- (A) bzw. Abwesenheit (B) von Poly-L-Lysin. Die Kinasen wurden für 10 Sekunden bis 20 Minuten autophosphoryliert. Zu beachten sind die unterschiedlichen Ordinaten.

Abb. 19 vergleicht die Autophosphorylierungen der Kinasen unter äquimolaren ATP-Bedingungen in An- (A) bzw. Abwesenheit (B) von Poly-L-Lysin. Mit Polykation ließ die Y3F wie der Wildtyp eine verzögerte initiale Phosphorylierung erkennen, die nach 2-3 Minuten stark anstieg. Im Gegensatz zum Wildtyp wurden nur 0,5 mol/mol eingebaut. Bei der 46F war schon nach kürzerer Zeit eine schnelle Zunahme zu verzeichnen,

die 0,8 mol/mol erreichte. Die Kinasen 50F und 51F zeigten keine initiale Inhibition der Autophosphorylierung, inkorporierten jedoch unterschiedliche Mengen an Phosphat (0,5 respektive 0,9 mol/mol). Gänzlich anders stellte sich die Situation bei der ΔCT^* dar, die nach 20 Minuten Reaktionsdauer in einem linearen Verlauf nur 0,04 mol/mol Phosphate inkorporierte.

Dieses Verhalten wird deutlicher beim Vergleich mit der Reaktion in Abwesenheit von Poly-L-Lysin (Abb. 19 B). Ohne Polykation verlief die Autophosphorylierung der Wildtyp-IRKD und der Y3F übereinstimmend mit der der ΔCT^* . Die drei Monosubstitutionen der Kinasedomäne hingegen wiesen eine erhöhte Aktivität auf, wobei die 51F und vor allem die 50F einen gesteigerten Phosphateinbau aufwiesen. Letztere erreichte einen Einbau von 0,2 mol/mol und somit 40 % der Einbaurrate mit Poly-L-Lysin. Interessanterweise war die Autophosphorylierung der ΔCT^* in beiden Fällen identisch und verlief im beobachteten Zeitraum annähernd linear. Dieser Sachverhalt ist in Abb. 20 im direkten Vergleich mit gespreizter Ordinate dargestellt. Wie die Abbildung verdeutlicht, erfolgte keinerlei Aktivierung unter äquimolaren Bedingungen von ATP zu Kinase.

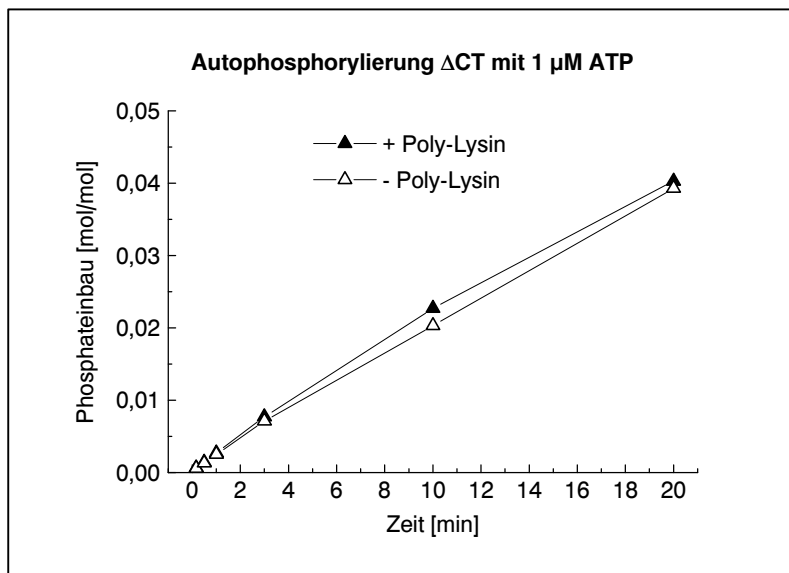


Abb. 20 Autophosphorylierung der ΔCT mit 1 μM ATP. Dargestellt sind die Reaktionsverläufe in An- und Abwesenheit von Poly-L-Lysin. Die Ordinate ist im Vergleich zu Abb. 19 stark gespreizt.

Sind alle drei Tyrosine der Kinasedomäne vorhanden, findet die Aktivierung mit einem biphasischen Verlauf statt (Wildtyp, Y3F). Die Substitution von Y1150 und Y1151 (Y1146 in geringerem Maß) führt zu einer schnelleren Aktivierung der Kinase. Nur bei fehlendem C-Terminus übt Poly-L-Lysin keinen stimulierenden Einfluß aus.

5.2.2 Lokalisierung initial besetzter Reste

Um Aufschluß über initial besetzte Tyrosine zu erhalten, wurden Phosphopeptid-Kartierungen der Proben nach 10 Sekunden Reaktionsdauer ohne Poly-L-Lysin erstellt. Abb. 21 stellt diese dar. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Elutionsprofile auf gleiche Gesamtradioaktivitäten normiert. Dies entspricht nicht den wahren Einbauraten, nach denen die 50F zehnmal mehr Radioaktivität inkorporierte als der Wildtyp und die Y3F. Um festzustellen, ob initial durch Poly-L-Lysin-Stimulation andere Stellen phosphoryliert werden, oder ob die ohne Polykation besetzen Positionen gleichmäßig mehr Radioaktivität inkorporieren, wurden vom Wildtyp, 46F, 50F und Y3F zusätzlich die entsprechenden Kartierungen mit Poly-L-Lysin erstellt. Abb. 22 zeigt exemplarisch die Elutionsprofile der 50F und der Y3F.

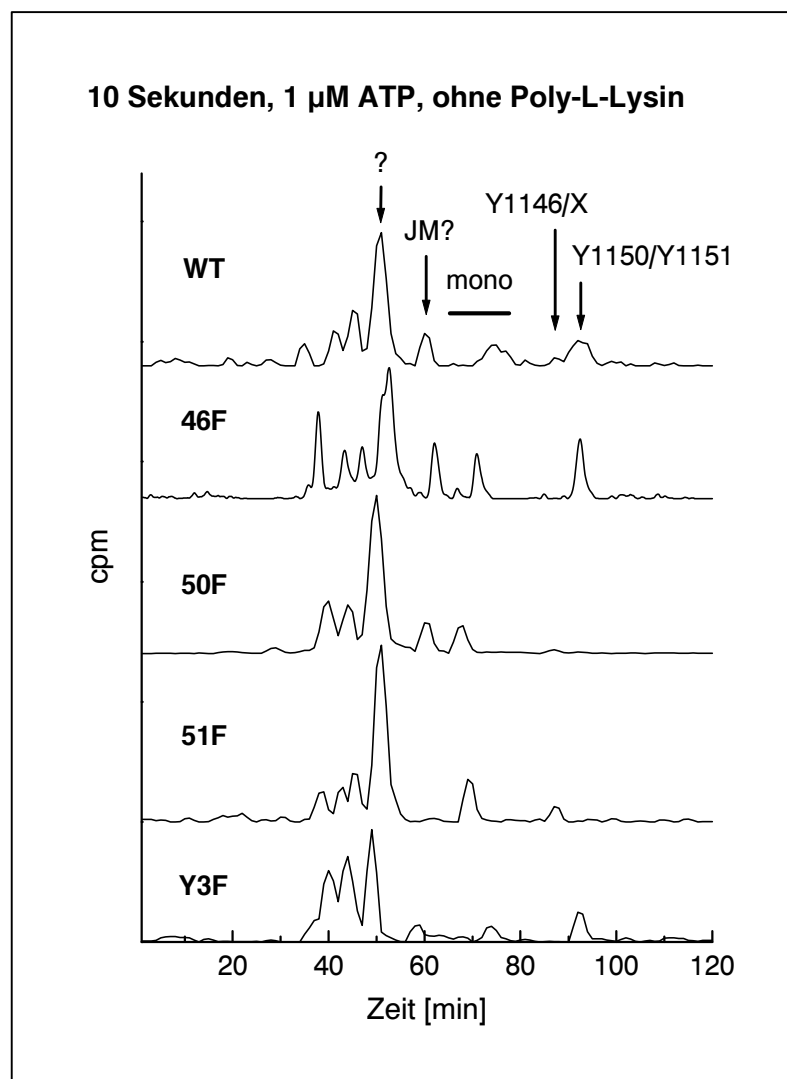


Abb. 21 Phosphopeptid-Kartierung in Abwesenheit von Poly-L-Lysin. Die Kinasen wurden 10 Sekunden mit 1 μM ATP autophosphoryliert. JM: Juxtamembrandomäne.

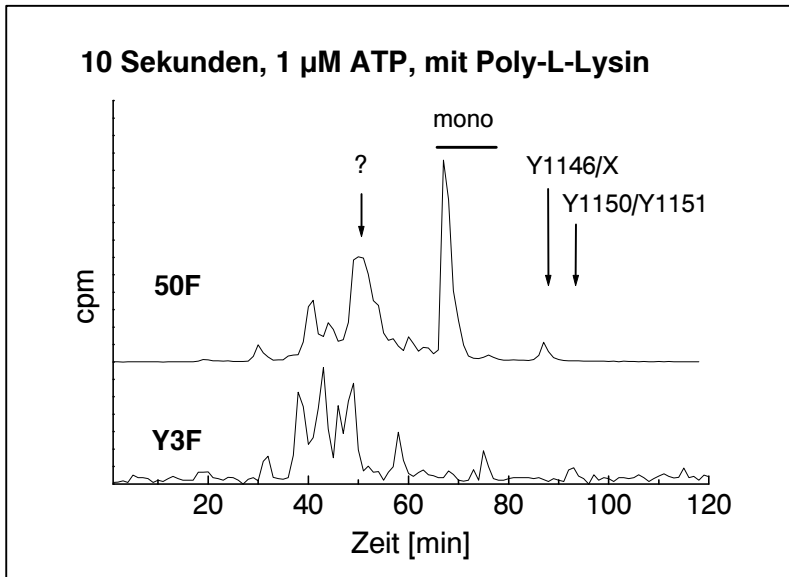
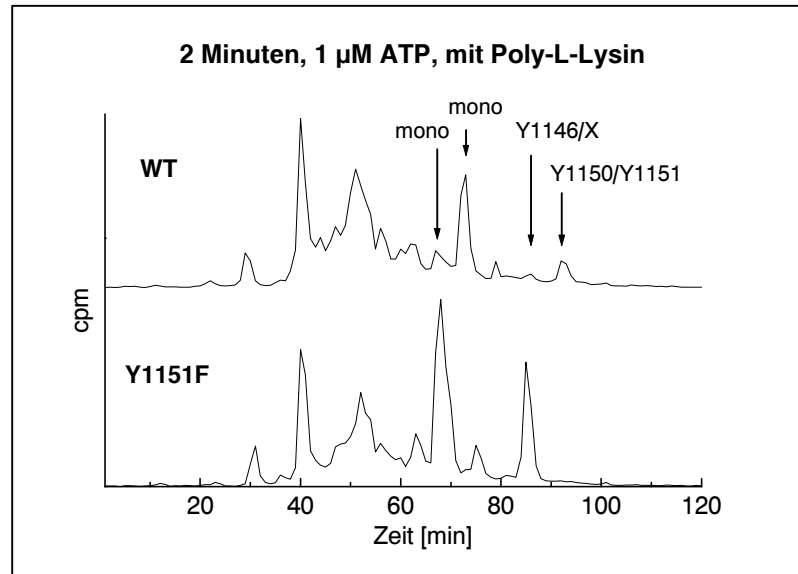


Abb. 22 Phosphopeptid-Kartierung in Anwesenheit von Poly-L-Lysin. Die Kinasen wurden 10 Sekunden mit 1 µM ATP autophosphoryliert.

Alle untersuchten Kinasen zeigten ohne Poly-L-Lysin ein ähnliches Profil mit einem dominierenden Signal, das eine Retentionszeit von 50 min aufwies. Das zugehörige Phosphopeptid ist unbekannt. Die Phosphopeptid-Kartierung der 46F wurde im Gegensatz zu den anderen per Radiometer erstellt und läßt, bedingt durch die verbesserte Auflösung, andeutungsweise eine Auftrennung des Hauptsignals in zwei Bestandteile erkennen. Bei der Y3F war das Hauptsignal verringert, was darauf hindeutet, daß im Hauptsignal der anderen Kinasen unter anderem ein Phosphopeptid des C-Terminus oder des Juxtamembranbereichs eluiert. Mit Retentionszeiten von 92 Minuten konnte die Bis-Form mit den phosphorylierten Tyrosinen 1150/1151 (WT, 46F und Y3F) und von 88 Minuten die Bis-Formen mit den Tyrosinen 1146/1150 (bei 51F) bzw. 1146/1151 (nur minimal ausgeprägt bei 50F) nachgewiesen werden. Bei den Signalen, die zwischen 66 und 74 Minuten eluierten, handelt es sich um Mono-Formen der Kinasedomäne. Für die Signale bei 62 Minuten ist wahrscheinlich eine Tyrosinphosphorylierung des Juxtamembranbereichs verantwortlich; interessanterweise ist diese bei 51F nicht detektierbar. Mit Poly-L-Lysin (Abb. 22) wiesen die untersuchten Kinasen ein vergleichbares Elutionsprofil wie ohne Polykation auf. Bei der Y3F waren keine neuen, signifikanten Signale zu detektieren. Die 50F zeigte eine starke Zunahme der monophosphorylierten Form der Kinasedomäne bei ansonsten vergleichbarer Signalverteilung.

Der Unterschied der Mono-Formen der Kinasedomäne wird besonders beim Vergleich zwischen Wildtyp und der 51F nach 2 Minuten Reaktionsdauer deutlich (Abb. 23). Der Wildtyp zeigte eine ausgeprägte Mono-Form mit einer Retentionszeit von 72 Minuten, während die der 51F nach 68 Minuten eluierte. Bei der 51F war eine deutliche Bis-Form der Kinasedomäne sichtbar, was die schnellere Phosphorylierung gegenüber dem Wildtyp erklären kann. Das Signal um 50 Minuten veränderte sich kaum, während bei 40 Minuten ein Signal entstand, dessen Herkunft ungeklärt ist.

Abb. 23 Phosphopeptid-Kartierung nach 2 Minuten Reaktionszeit. Die Kinasen wurden in Anwesenheit von Poly-L-Lysin mit 1 μ M ATP phosphoryliert.



5.2.3 Zeitverlauf der Besetzung

Abb. 24 verdeutlicht die zeitliche Besetzung der Phosphorylierungsstellen der Wildtyp-IRKD von 10 Sekunden bis 10 Minuten Reaktionszeit mit Poly-L-Lysin. Die Elutionsprofile wurden auf die tatsächlichen Einbauraten bezogen; zum besseren Vergleich wurden die Profile nach 10 Sekunden und 2 Minuten Reaktionsdauer 10fach überhöht dargestellt. Neben den oben beschriebenen Profilen ist die Kartierung der IRKD nach 10 Minuten Autophosphorylierung gezeigt. Zu diesem Zeitpunkt sind Phosphopeptide der bis- und trisphosphorylierten Form der Kinasedomäne und der bisphosphorylierte C-Terminus nachweisbar. Die Phosphatverteilung ähnelt der einer Kinase nach 10-30 Sekunden Autophosphorylierung mit 250 μ M ATP (Standardbedingungen). Bei einem durchschnittlichen Phosphateinbau von 1 Mol Phosphat pro Mol Kinase bedeutet die beobachtete Verteilung, daß einige Kinasen mehrere Mol Phosphat inkorporiert haben, während andere offensichtlich überhaupt nicht phosphoryliert wurden.

Mit der verwendeten Methodik ist eine eindeutige Bestimmung der ersten phosphorylierten Aminosäure nicht möglich gewesen. Da in der Kinasedomäne zuerst Y1150/Y1151 phosphoryliert werden, liegt die Vermutung nahe, daß Y1150 oder Y1151 die erste Phosphorylierungsstelle der Kinasedomäne ist. In der Phosphopeptid-Kartierung sind drei unterschiedlich eluierende Mono-Formen unterscheidbar (50F 66 min, 46F/51F 68 min, WT/Y3F 72 min, jeweils Retentionszeiten).

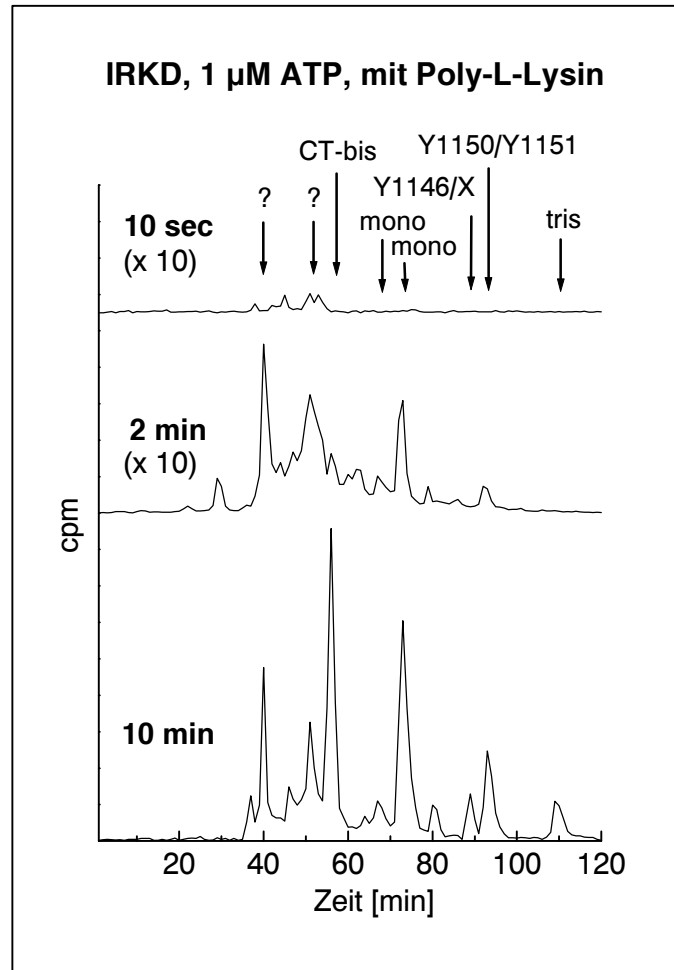


Abb. 24 Zeitliche Besetzung der Phosphorylierungsstellen. Die IRKD wurde in Anwesenheit von Poly-L-Lysin für 10 Sekunden bis 10 Minuten mit 1 μ M ATP phosphoryliert. Die Elutionsprofile nach 10 Sekunden und 2 Minuten sind 10fach vergrößert dargestellt.

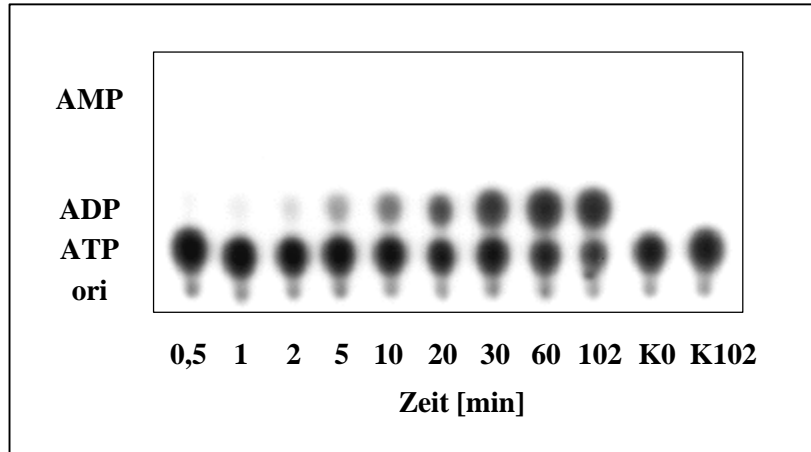
6 ATP-Umsatz

6.1 Lineare ADP-Bildung durch die IRKD nach der Aktivierung

Die lösliche Insulinrezeptorkinase weist einen höheren ATP-Umsatz auf, als aufgrund des Phosphateinbaus zu erwarten ist (Al-Hasani 1995, Tennagels 1998). Um den dafür verantwortlichen Mechanismus zu analysieren, wurden die ATP-Umsätze der IRKD-Varianten bestimmt (10.5). Dazu wurden Autophosphorylierungsreaktionen mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ durchgeführt (1 μM Kinase). $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ kann von der Kinase zu $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ADP}$ umgesetzt werden; diese beiden Nukleotidphosphate lassen sich dünnschichtchromatographisch trennen. In diesem Fall findet eine Phosphorylierung mit nicht markierten Phosphaten statt, da sämtliche Radioaktivität im ADP verbleibt. Die Menge des gebildeten ADP ist umgekehrt proportional zur abnehmenden ATP-Menge und somit ein direktes Maß für den ATP-Umsatz der Kinase. Um den Phosphateinbau in die Kinase zu bestimmen, wurden parallel dazu entweder Autophosphorylierungen mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ durchgeführt, oder es wurde ein Gemisch aus $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ und $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ in einer Reaktion benutzt.

Die Autophosphorylierungsreaktionen wurden über einen Zeitraum von 30 Sekunden bis 60 (maximal 105) Minuten durchgeführt. Aus den $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -Ansätzen wurde zu den Zeitpunkten 10 pmol Kinase in SDS-Probenpuffer gegeben und die Proben mittels SDS-PAGE getrennt. Die Radioaktivität der Kinasen wurden wie in 4.1 bestimmt. Für die Bestimmung des gebildeten ADP wurde 1 pmol Kinase aus den $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -Ansätzen in 100 μl 300 μM EDTA pH 8 (4 °C) gegeben, um die Reaktion zu stoppen. Als Kontrolle wurden 1 μl Ansatz ohne Kinase zu Versuchsbeginn und -ende entnommen, um die nicht enzymkatalysierte Hydrolyserate des ATP verfolgen zu können. Die gestoppten Ansätze wurden per Dünnschichtchromatographie getrennt und mittels Phospho-Imager-Analyse quantifiziert. In Abb. 25 ist die Autoradiographie einer Dünnschichtchromatographie (A) und sich daraus ergebende Verläufe (B) am Beispiel des Wildtypkinase dargestellt.

A



B

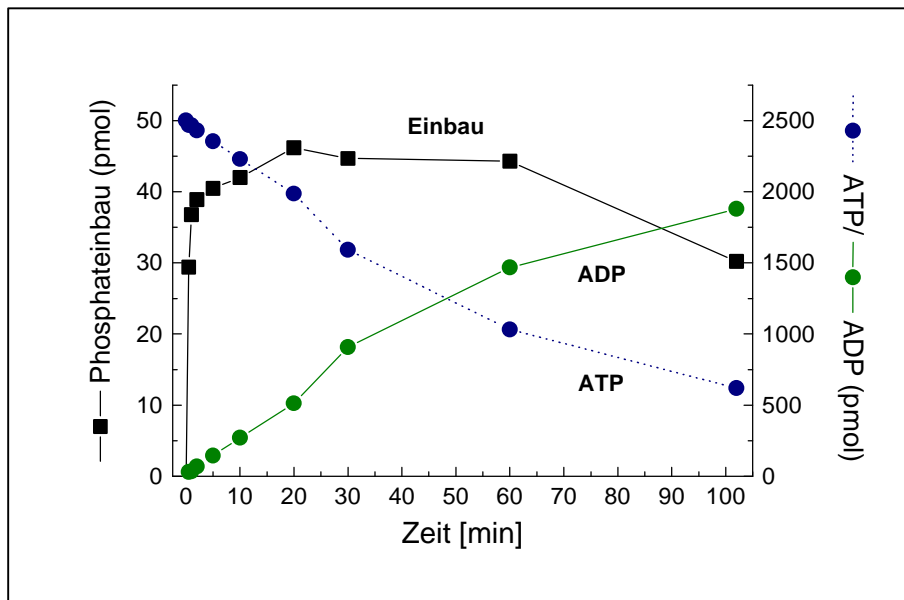


Abb. 25 ATP-Umsatz der Wildtyp-IRKD. **A** Dünnschichtchromatographische Auftrennung der α -markierten Adenosinnukleotide (Autoradiogramm nach 10.7.3). Untersucht wurden Zeitwerte von 0,5 bis 102 Minuten. K0, K102: Kontrollansätze ohne IRKD nach 0 bzw. 102 Minuten; ori: Auftragspunkt. **B** Graphische Darstellung des ATP-Umsatzes und der entsprechenden ADP-Bildung im Vergleich zur Phosphatinkorporation in die Kinase. Der Phosphateinbau wurde wie in 4.1 bestimmt. Zu beachten sind die unterschiedlichen Ordinaten für den Phosphateinbau und die ATP/ADP-Mengen.

In der Dünnschichtchromatographie ist die zeitabhängige Zunahme des gebildeten ADP zu verfolgen. In den Kontrollansätzen wurde nie mehr als 0,5 % spontane ATP-Hydrolyse in einer Stunde beobachtet. Berechnet man aus dem prozentualen ATP:ADP-Verhältnis die molaren Verhältnisse, so wird deutlich, daß die Kinase trotz maximalen Phosphateinbaus weiterhin ATP hydrolysiert. Sieht man von den frühen Zeitwerten ab, in denen wegen der niedrigen gebildeten ADP-Menge die Bestimmung mit einem

großen Fehler behaftet ist, erkennt man zwischen 5 und 30 Minuten eine annähernd lineare ADP-Bildung. Diese betrug im Falle der Wildtypkinase $59 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Im weiteren Verlauf flachte die Kurve ab, bis nach 102 Minuten von anfänglichen 2500 pmol ATP nur noch ca. 600 pmol vorhanden waren. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Al-Hasani (1995) und Tennagels (1998).

6.2 Ausschluß von Fremdaktivitäten

Um eine exogene ATPase ausschließen zu können, wurde ein ATP-Umsatz mit der kinaseinaktiven D1120A durchgeführt. Sollte sich eine mitgereinigte ATPase im Reaktionsansatz befinden, so sollte die Bildung von ADP zu verfolgen sein. Dies war nicht der Fall (Abb. 26), so daß die ATPase-Aktivität auf eine aktive Insulinrezeptorkinase zurückgeführt werden muß.

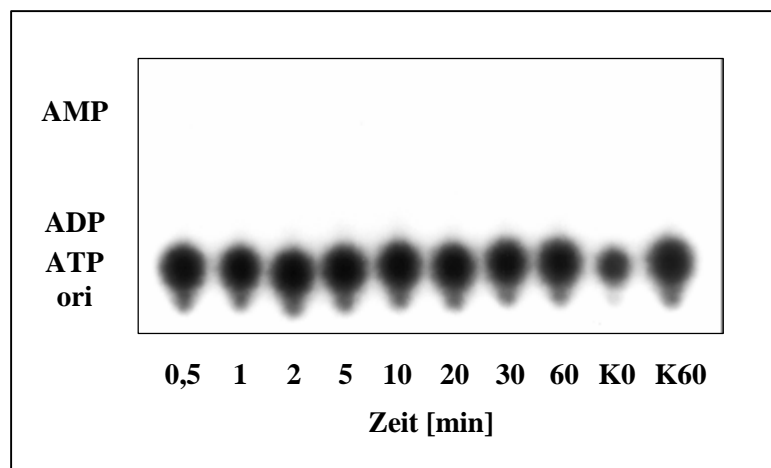


Abb. 26 Dünnschichtchromatographie des ATP-Umsatzes der D1120A (Autoradiogramm nach 10.7.3). Untersucht wurden Reaktionszeiten von 0,5 bis 60 Minuten. K0, K60: Kontrollansätze ohne D1120A nach 0 bzw. 60 Minuten; ori: Auftragspunkt.

Ein erhöhter ATP-Umsatz könnte auch auf eine exogene Phosphatase zurückzuführen sein. Diese würde kontinuierlich die IRKD dephosphorylieren, welche sich unter ATP-Verbrauch rephosphorylieren würde. Daher wurden ATP-Umsätze in Gegenwart des Phosphatase-Inhibitors Natrium-Orthovanadat und des Tyrosinkinase-Inhibitors Tyrphostin A47 (RG50864) durchgeführt. Vanadat inhibiert u.a. PTPasen ($K_i < 1 \mu\text{M}$), Na/K-ATPasen, saure und alkalische Phosphatasen und wurde in einer Konzentration von $150 \mu\text{M}$ eingesetzt (Swarup *et al.*, 1982; Seargeant und Stinson, 1979). Alkalische Phosphatase wurde in einem Vorversuch durch Vanadat stark gehemmt. Tyrphostin hemmt u. a. die Insulinrezeptorkinase ($\text{IC}_{50} = 640 \mu\text{M}$) und wurde in einer Endkonzentration von 1 mM verwendet (Levitzki und Gazit, 1995; Levitzki 1990). Die ATP-Umsätze wurden wie oben beschrieben mit der Wildtyp-IRKD durchgeführt. Nach

15 Minuten Reaktionszeit wurde der Ansatz gedrittelt; einem Drittel wurde 1/10 Volumen an Vanadat, einem zweiten 1/10 Volumen an Tyrphostin A47 zugegeben, der Rest diente als Kontrolle ohne Inhibitoren. Die Reaktion wurde weitere 30 Minuten verfolgt und wie oben ausgewertet. Abb. 27 stellt die graphische Auswertung dar. Zur vereinfachten Anschauung ist die Kurve des noch vorhandenen ATP nicht gezeigt.

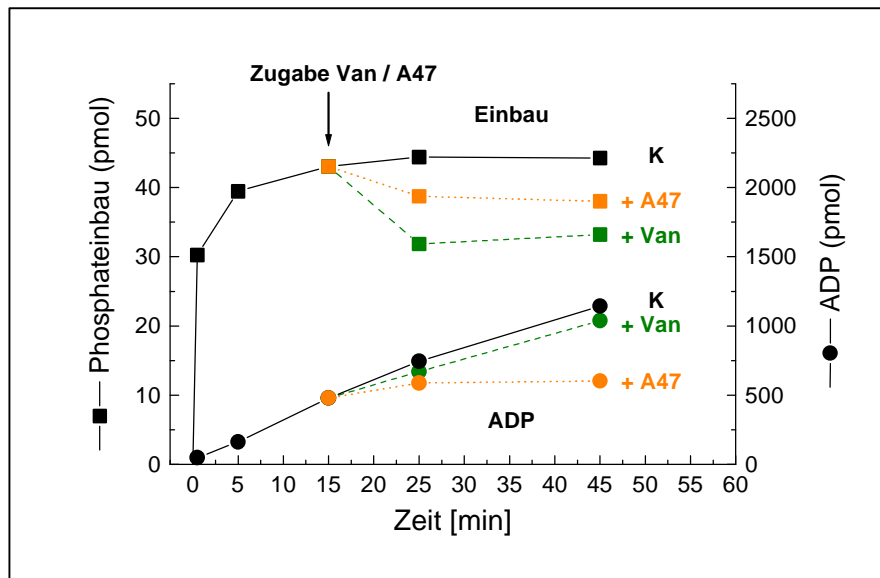


Abb. 27 Einfluß von Orthovanadat und Tyrphostin A47 auf die Autophosphorylierung und den ATP-Umsatz der IRKD. Die IRKD wurde unter Standardbedingungen für 0,5 bis 45 Minuten phosphoryliert. Nach 15 Minuten Reaktionszeit wurde Orthovanadat (Van) bzw. Tyrphostin A47 (A47) hinzugefügt und die Reaktion für weitere 20 Minuten verfolgt. Der Phosphatereinbau wurde wie in 4.1, die ADP-Bildung wie oben bestimmt. Zu beachten sind die unterschiedlichen Ordinaten. K: Kontrollansatz ohne Zusatz von Inhibitoren.

Ohne Zusatz von Inhibitoren (**K**) erreichte die Kinasen einen Phosphatereinbau von 4,5 mol/mol, der die Reaktion über konstant blieb. Es wurde kontinuierlich ADP gebildet; zwischen 5 und 25 Minuten betrug die ADP-Zunahme $64 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Die Zugabe von Vanadat (**+ Van**) führte zu keiner Beeinträchtigung der ADP-Bildung, eine exogene Phosphatase scheint also nicht für den beobachteten ATP-Umsatz verantwortlich zu sein. Erstaunlicherweise verlor die Kinase nach Vanadat-Zugabe annähernd 30 % an Radioaktivität, verblieb aber auf diesem Niveau.

Mit Tyrphostin A47 (**+ A47**) wurde die ADP-Bildung vollständig inhibiert, was für die Abhängigkeit der ADP-Bildung von der Kinaseaktivität spricht. Nach Tyrphostin-Zugabe verlor die Kinase etwa 13 % der inkorporierten Phosphate.

Der beobachtete ATP-Umsatz der IRKD ist folglich nicht auf exogene ATPasen oder Phosphatasen zurückzuführen und überdies abhängig von der Aktivität der Insulinrezeptorkinase.

6.3 Abhängigkeit von der ATP-Konzentration

Möglicherweise ist die ADP-Bildung abhängig von der eingesetzten ATP-Konzentration. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden zusätzlich analoge ATP-Umsätze mit 100 und 500 μM ATP (entsprechend einer Ausgangskonzentration von 1000 und 5000 pmol ATP) durchgeführt. Abb. 28 vergleicht die unter diesen Bedingungen durch die Wildtypkinase gebildeten ADP-Mengen. Im linearen Bereich zwischen 5 und 30 Minuten lagen diese annähernd gleich, während zu späteren Zeiten ein mehr oder weniger starkes Abflachen der Kurven zu erkennen ist. Dabei ist zu berücksichtigen, daß im Falle von 100 μM ATP die ATP-Menge nach 30 Minuten schon zu 77 % und nach 60 Minuten zu 95 % aufgebraucht war. Die Bildungsgeschwindigkeiten des ADP wurden mit 66 (100 μM), 59 (250 μM) und 82 (500 μM) $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ bestimmt. Der ATP-Umsatz war demnach kaum von der anfänglichen Konzentration des ATP abhängig.

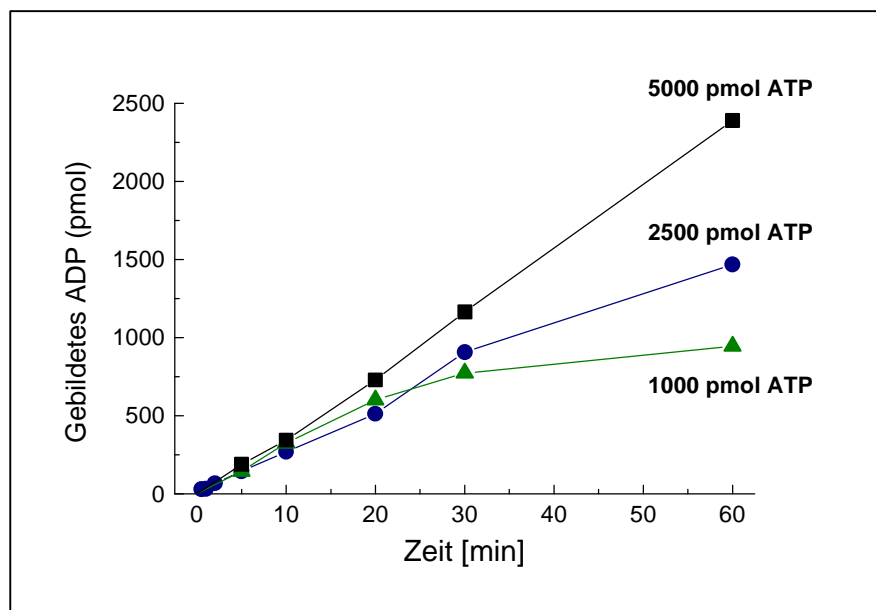


Abb. 28 Einfluß der ATP-Konzentration auf den ATP-Umsatz. Die Wildtyp-IRKD wurde unter Standardbedingungen mit 100, 250 bzw. 500 μM ATP für 0,5 bis 60 Minuten phosphoryliert. Die gebildete ADP-Menge wurde wie oben bestimmt.

6.4 Vergleich der ATP-Umsätze der mutierten Kinasen

Nach diesen Vorversuchen wurden vergleichbare ATP-Umsätze unter Standardbedingungen (250 μM ATP, 1 μM Kinase) mit mehreren IRKD-Derivaten durchgeführt. Verglichen wurden die Geschwindigkeiten der ADP-Bildung im linearen Bereich zwischen 5 und 30 Minuten sowie die gebildete ADP-Menge nach 60 Minuten. Abb. 29 zeigt die gewonnenen Daten.

Keine der eingeführten Mutationen beeinflusste den ATP-Umsatz der Kinase nachhaltig. Die Unterschiede zwischen niedrigstem und höchstem Wert liegen bei 9 % (Geschwindigkeit; A) bzw. 13 % (ADP nach 60 Minuten; B) und befinden sich damit im Fehlerbereich der Messungen. Der ATP-Umsatz ist demnach nicht von der Existenz einer einzelnen Tyrosinphosphorylierungsstelle abhängig, noch wird er von der Substitution der Serinphosphorylierungsstellen beeinflusst. Da dieser Versuchsansatz keine weiteren Aufschlüsse zum Mechanismus der transienten Phosphorylierung erbrachte, wurden Autophosphorylierungen unter Pulse-Chase- bzw. Pulse-Hot Chase-Bedingungen durchgeführt (Kap. 7).

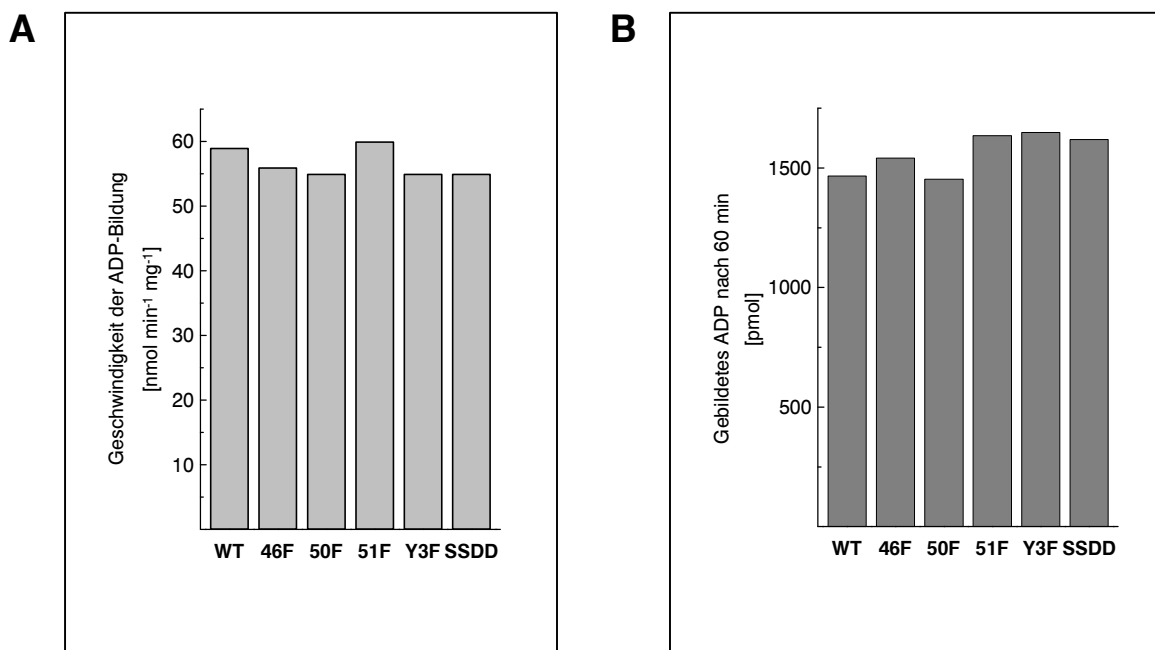


Abb. 29 ATP-Umsätze der untersuchten löslichen Insulinrezeptorkinasen. Die Umsätze wurden analog der IRKD mit 250 μM ATP unter Standardbedingungen durchgeführt. **A** Geschwindigkeit der ADP-Bildung im linearen Bereich zwischen 5 und 30 Minuten Reaktionszeit. **B** Menge des gebildeten ADP nach 60 Minuten.

7 Transiente Phosphorylierung

7.1 Phosphorylierung unter Pulse-Chase- und Pulse-Hot Chase-Bedingungen

Die lösliche Insulinrezeptorkinase unterliegt einer transienten Phosphorylierung. Um den Zusammenhang zwischen den konstanten ATP-Umsätzen und der transienten Phosphorylierung zu ermitteln, wurden Experimente unter Pulse-Chase- bzw. Pulse-Hot Chase-Bedingungen durchgeführt. Unter einer Pulse-Chase-Bedingung ist hier eine Autophosphorylierung mit markierten $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ zu verstehen, der zu einem gewissen Zeitpunkt ein 10facher Überschuß an nicht markiertem ATP (Chase) zugegeben wird. Entsprechend wird unter Pulse-Hot Chase-Bedingungen eine Autophosphorylierung mit nicht markiertem ATP durchgeführt, der nach einer bestimmten Zeit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (Hot Chase) hinzugefügt wird. Auf diese Weise ist es möglich, transiente Phosphorylierung der Kinase nachzuweisen und mit Hilfe der Phosphopeptid-Kartierung einzelne Aminosäurereste zu identifizieren, die in diesen Prozeß involviert sind.

Versuche von Al-Hasani (1995) und Tennagels (1998) zeigten, daß die IRKD unter Pulse-Chase-Bedingungen die Hälfte der inkorporierten Radioaktivität verliert. Analog wurde unter Pulse-Hot Chase-Bedingungen eine Zunahme an Radioaktivität im Enzym verzeichnet. Der Aus- bzw. Einbau betraf im Wildtyp vornehmlich die C-terminalen Tyrosine 1316 und 1322. Einen Verlust an Radioaktivität, der jedoch weniger stark ausgeprägt ist, beobachtet man auch bei einer Chase-Reaktion mit ADP (Tennagels 1998). Über eine durch ADP vermittelte Dephosphorylierung wird auch in der Literatur berichtet (Pike *et al.*, 1986; Cobb *et al.*, 1989; Argetsinger und Shafer, 1992). Um den Mechanismus, der diesen De- und Rephosphorylierungen zu Grunde liegt, näher betrachten zu können, wurde mit den IRKD-Konstrukten Autophosphorylierungsreaktionen unter Pulse-Chase- bzw. Pulse-Hot Chase-Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden die Kinasen ($1\ \mu\text{M}$) unter Standardbedingungen für 15 Minuten mit markiertem (Chase) oder nicht markiertem ATP (Hot Chase) autophosphoryliert. Zu diesem Zeitpunkt befand sich der Phosphat einbau aller Kinase in der Sättigung, und der ATP-Umsatz befand sich im linearen Bereich (s. 6.1). Für die Chase-Reaktion wurde der Ansatz ($10\ \text{pmol}$ Kinase) nach 15 Minuten mit einem 10fachen Überschuß an ATP oder ADP ($25\ \text{mM}$) versetzt. Nach insgesamt 30 Minuten Reaktionszeit wurden die Reaktionen in SDS-Probenpuffer gestoppt. Im Hot Chase-Experiment erfolgte nach 15 Minuten Autophosphorylierung die Zugabe von $5\text{-}20\ \mu\text{Ci}$ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, und nach 30 Minuten wurden die Reaktionen beendet. Die Radioaktivität der Kinasen wurden wie in 4.1 bestimmt. Tab. 4 listet die Einbauraten an Radioaktivität nach 15 und 30 Minuten auf. Für die Chase-Reaktionen sind in Klammern die prozentualen Verluste an Radioaktivität, bezogen auf den Pulse-Wert nach 30 Minuten, angegeben.

Dementsprechend geben die Prozentwerte bei der Hot Chase-Reaktion die Menge an Phosphat an, die im Vergleich zum Pulse-Wert nach 30 Minuten inkorporiert wurde.

Tab. 4 Übersicht über die Phosphat-Inkorporationen in die löslichen Insulinrezeptorkinasen unter Pulse-, Chase- und Hot Chase-Bedingungen. Die Kinasen wurden unter Standardbedingungen autophosphoryliert. Pulse 15/30 min: Einbau nach 15 bzw. 30 Minuten Autophosphorylierung; ATP-Chase 30 min: 15 Minuten Autophosphorylierung mit markiertem ATP und weitere 15 Minuten Reaktionszeit nach Zugabe eines Überschusses an ATP; ADP-Chase 30 min: wie ATP-Chase, aber mit Überschuß an ADP; Hot Chase 30 Minuten: 15 Minuten Autophosphorylierung mit nicht markiertem ATP und weitere 15 Minuten Reaktionszeit nach Zugabe von markiertem ATP. Die Werte in Klammern geben prozentual an, a) wie hoch der Verlust an Radioaktivität in der Chase-Reaktion war und b) welchen Anteil die Phosphatinkorporation in der Hot Chase-Reaktion erreichte; in allen Fällen sind diese Werte auf den Wert Pulse 30 min bezogen.

Kinase	Pulse 15 min (mol/mol)	Pulse 30 min (mol/mol)	ATP-Chase 30 min (mol/mol)	ADP-Chase 30 min (mol/mol)	Hot Chase 30 min (mol/mol)
WT	4,83	4,85	2,36 (51 %)	3,33 (31 %)	1,97 (41 %)
46F	3,38	3,15	1,72 (45 %)	2,01 (36 %)	1,82 (58 %)
50F	3,69	3,69	1,87 (49 %)	2,19 (41 %)	1,01 (27 %)
51F	4,15	3,61	2,21 (39 %)	2,34 (35 %)	1,60 (44 %)
Y3F	3,23	2,77	1,51 (45 %)	1,65 (40 %)	1,13 (41 %)
SSDD	3,72	2,92	1,73 (41 %)	n.b.	n.b.
CS	4,75	4,31	2,35 (45 %)	n.b.	n.b.
Δ CT*	2,74	2,75	1,78 (35 %)	1,96 (29 %)	1,06 (39 %)

Es ist zu erwähnen, daß einige IRKD-Mutanten nach 30 Minuten Reaktionszeit weniger Phosphateinbau aufwiesen als nach 15 Minuten. Diese Dephosphorylierung betrug jedoch nie mehr als 15 %. Eine Ausnahme stellte die SSDD dar, die in diesem Zeitraum bis zu 25 % der inkorporierten Radioaktivität verlor (vgl. 4.1, Tab. 2 und 4.2, Abb. 9). Die Phosphopeptid-Kartierung (4.3.5, Abb. 14) im Vergleich zur IRKD belegt, daß die Dephosphorylierung der SSDD vor allem die trisphosphorylierte Form der Kinasedomäne betraf.

Unter Pulse-Chase-Bedingungen mit 10fachem ATP-Überschuß wurden beim Wildtyp, 51F und CS ein Abfall der inkorporierten Radioaktivität auf 2,2-2,4 mol/mol beobachtet. Die Kinasen 46F, 50F, SSDD und Δ CT* erreichten ein Niveau von 1,7-1,8 mol/mol, und Y3F markierte mit 1,5 mol/mol den niedrigsten Wert an verbleibender Radioaktivität. Prozentual betrachtet lag der Verlust bei 45-51 %; 51F, SSDD und Δ CT* allerdings wiesen mit 35-41 % niedrigere Verlustraten auf. Mit einem Überschuß an ADP verloren die

Kinasen ebenfalls radioaktiv markiertes Phosphat, jedoch weniger als mit ATP (29-41 %). Während der Wildtyp noch über 3 mol/mol Phosphat aufwies, waren bei 46F, 50F, 51F und Δ CT* nur noch 2-2,3 mol/mol nachweisbar. Die niedrigste verbleibende Phosphatinkorporation war bei der Y3F mit 1,6-1,7 mol/mol zu verzeichnen. Auffällig ist, daß bei 51F, Y3F und Δ CT* der Verlust an Radioaktivität am wenigsten davon beeinflusst wurde, ob eine Chase-Reaktion mit ADP oder ATP durchgeführt wurde (maximal 6 % Unterschied); in diesen drei Fällen war die noch vorhandene Radioaktivität unter ADP-Chase- so hoch wie unter ATP-Chase-Bedingungen. Überraschenderweise verlor die Wildtypkinase bei einem Überschuß an nicht markiertem GTP ebenfalls Radioaktivität in der Höhe von 25-30 % (Daten nicht gezeigt).

Bei der Autophosphorylierung unter Hot Chase-Bedingungen, bei der im Gegensatz zur Chase-Reaktion keine Verschiebung der molaren ATP/ADP-Verhältnisse auftreten, inkorporierten alle untersuchten Kinasen Radioaktivität. Der Wildtyp, 46F und 51F zeigten Einbauraten von 1,6-2 mol/mol, während 50F, Y3F und Δ CT* mit 1,0-1,1 mol/mol deutlich weniger Radioaktivität inkorporierten (den beiden letzteren fehlen die C-terminalen Tyrosine). Prozentual bedeutet dies im Vergleich zur Pulse-Reaktion eine Phosphatinkorporation von 39-44 %. Während die 46F mit 58 % eine überdurchschnittliche hohe prozentuale Inkorporation aufwies, lag diese bei der 50F mit 27 % vergleichsweise niedrig.

7.2 Initialgeschwindigkeiten der Hot Chase-Reaktion

Ungewöhnlich erschien, daß sich bei der 50F gegenüber den anderen Monosubstitutionen der Kinasedomäne bei vergleichbaren Chase-Reaktionen in der Hot Chase-Reaktion ein merklich geringerer radioaktiver Einbau manifestierte. Möglicherweise führte diese Mutation zu einer verringerten Fähigkeit, die Kinase zu rephosphorylieren. Um weitere Einsicht in diesen Prozeß zu gewinnen, wurden die Initialgeschwindigkeiten des Phosphateinbaus in der Hot Chase-Reaktion bestimmt. Dazu wurden, analog zu 7.1, je 1 μ M Kinase 15 Minuten unter Standardbedingungen phosphoryliert und anschließend für 10 bzw. 30 Sekunden mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ versetzt. Die Quantifizierung der phosphorylierten Kinasen aus der sich anschließenden SDS-PAGE lieferte folgende Ergebnisse, die in Abb. 30 gezeigt sind.

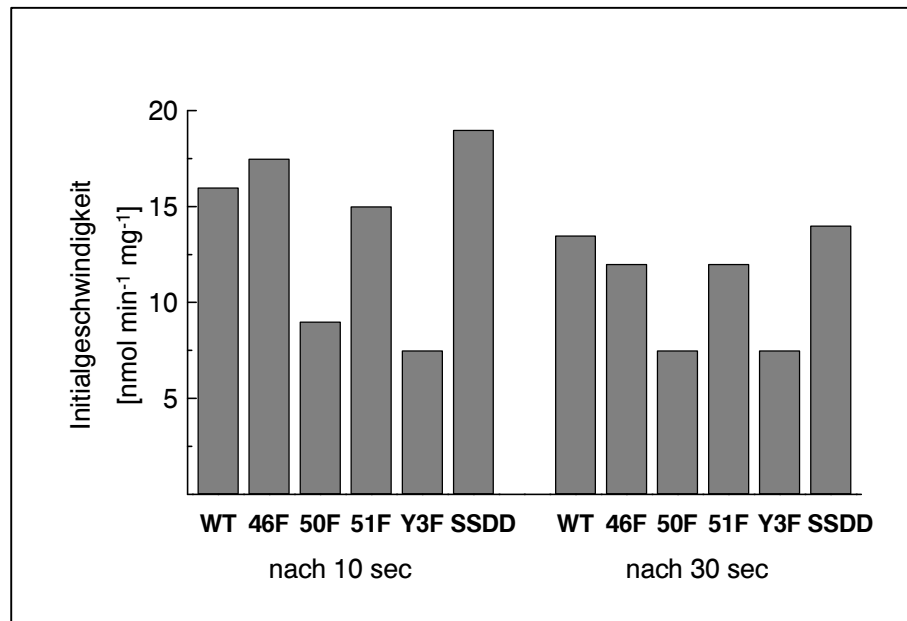


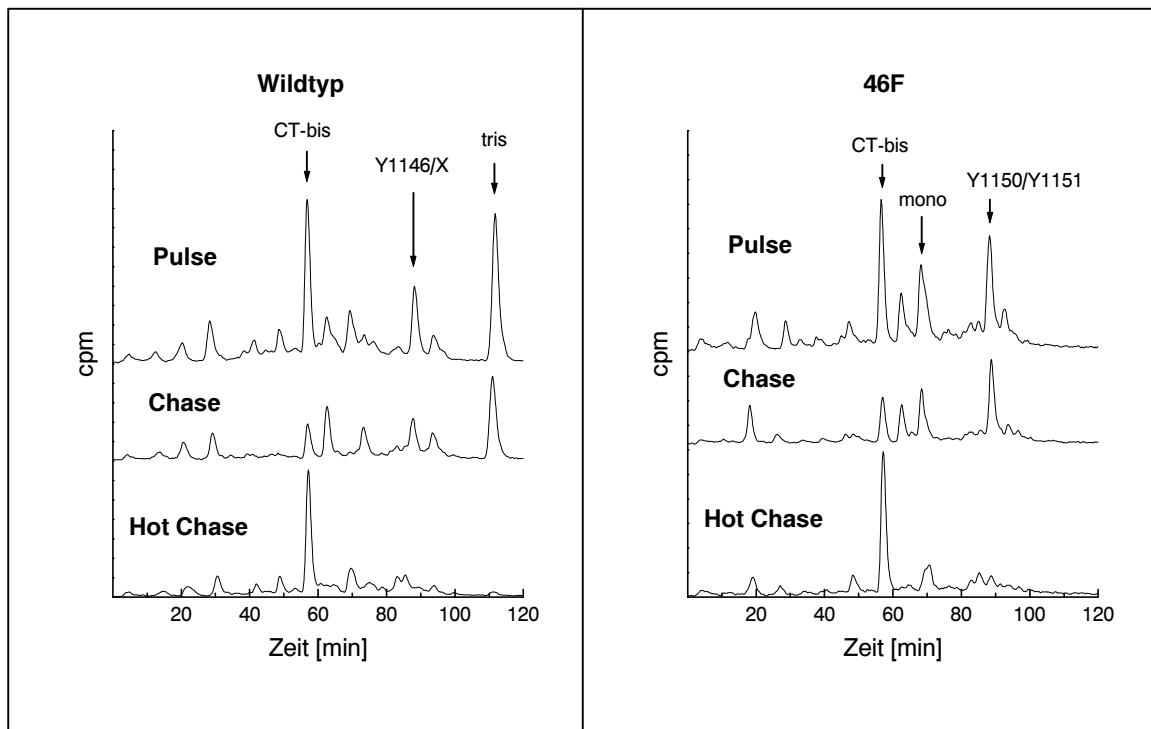
Abb. 30 Initialgeschwindigkeiten der Hot Chase-Reaktion. Die Kinasen wurden unter Standardbedingungen mit nicht markiertem ATP phosphoryliert. Nach 15 Minuten wurde markiertes ATP hinzugefügt und die Phosphat-Inkorporationen nach 10 und 30 Sekunden Reaktionszeit ermittelt.

Die Wildtyp-IRKD, 46F, 51F und SSDD lagen mit Geschwindigkeiten von 15-19 respektive 12-14 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (nach 10 bzw. 30 Sekunden Meßzeit) auf vergleichbarem Niveau. Sowohl für die Y3F als auch die 50F konnte eine um 50 % verringerte Geschwindigkeit ermittelt werden. Für die Y3F erscheint dies auf Grund der fehlenden Tyrosine im C-Terminus verständlich. Bei der 50F sind sowohl Initialgeschwindigkeit und als auch Phosphateinbau in der Hot Chase-Reaktion annähernd um 50 % erniedrigt. Der Aminosäurerest Y1150 ist folglich in den Prozeß der transienten Phosphorylierung involviert.

Vergleicht man die Initialgeschwindigkeiten der Hot-Chase-Reaktionen mit der Geschwindigkeit der ADP-Bildung (entsprechend der ATP-Hydrolyse) aus 6.4, so fällt die hohe Diskrepanz dieser Werte auf. Unter Hot-Chase-Bedingungen inkorporierten die Kinasen Phosphatreste initial mit einer Geschwindigkeit von 9-19 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, während im ATP-Umsatz Geschwindigkeiten von 55-60 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ für die ATP-Hydrolyse ermittelt wurden. Dies läßt nur den Schluß zu, daß mindestens zwei von drei ATP-Molekülen nicht zur Phosphorylierung der Kinase genutzt, sondern hydrolysiert werden. Diese Aussage gilt jedoch nur für den Zeitraum nach vollständiger Autophosphorylierung. Der initiale ATP-Umsatz entzieht sich der Analyse, so daß kein direkter Vergleich von ATP-Umsatz und Phosphatinkorporation während der initialen Autophosphorylierung möglich ist.

7.3 Lokalisierung der transienten Phosphorylierungsstellen

IRKD de- und rephosphoryliert die C-terminalen Tyrosine 1316 und 1322. Es stellte sich die Frage, in welche Phosphorylierungsstellen Kinasen ohne diese Tyrosine (Y3F, Δ CT, Δ CT*) noch Phosphat einzubauen vermögen. Desweiteren sollten Insulinrezeptorkinasen, denen für die De-/Rephosphorylierung essentielle Aminosäuren fehlen, die C-terminalen Tyrosine in der Chase-Reaktion nicht mehr dephosphorylieren und in der Hot Chase-Reaktion rephosphorylieren können. Zu diesen könnten Tyrosinautophosphorylierungsstellen ebenso gehören wie potentiell aktive Reste in Phosphatase-ähnlichen Motiven (s. 2.5). Um diese Fragen zu klären, wurden von den Kinasen (1 μ M) Autophosphorylierungsreaktionen unter Pulse-Chase- und Pulse-Hot Chase-Bedingungen durchgeführt (Standardbedingungen). Nach 15 Minuten Phosphorylierung wurden den Reaktionsansätzen unmarkiertes bzw. [γ - 32 P]ATP für weitere 15 Minuten zugefügt. Nach Auftrennung im SDS-PAGE und tryptischer Elution wurden von den Proben Phosphopeptid-Kartierungen erstellt. Das Kinasekonstrukt CS wurde bereits charakterisiert (Nölle 1995) und zeigte eine vergleichbare transiente Phosphorylierung der C-terminalen Tyrosine wie die Wildtyp-IRKD. Abb. 31 stellt die Chromatogramme der untersuchten Kinasen dar.



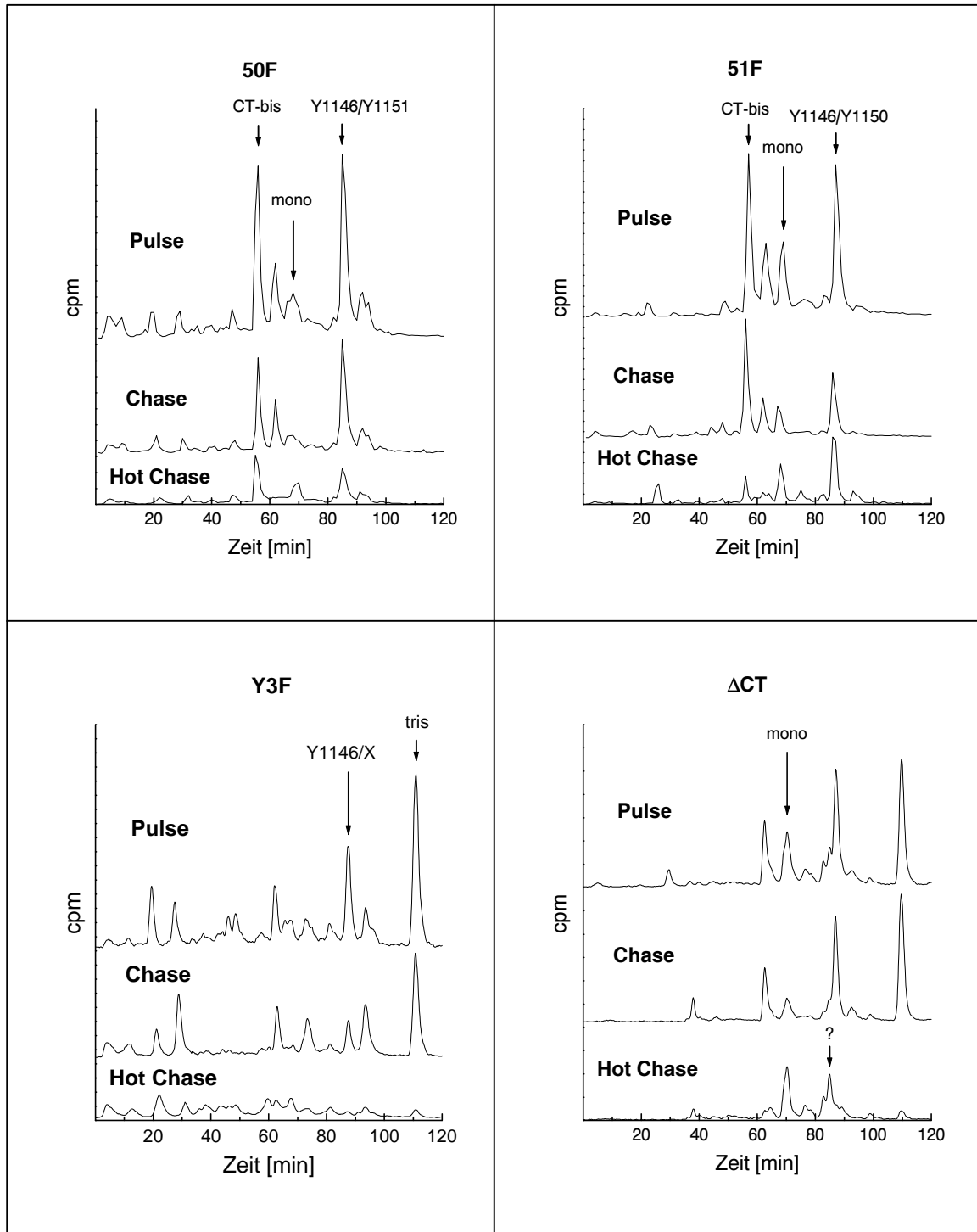


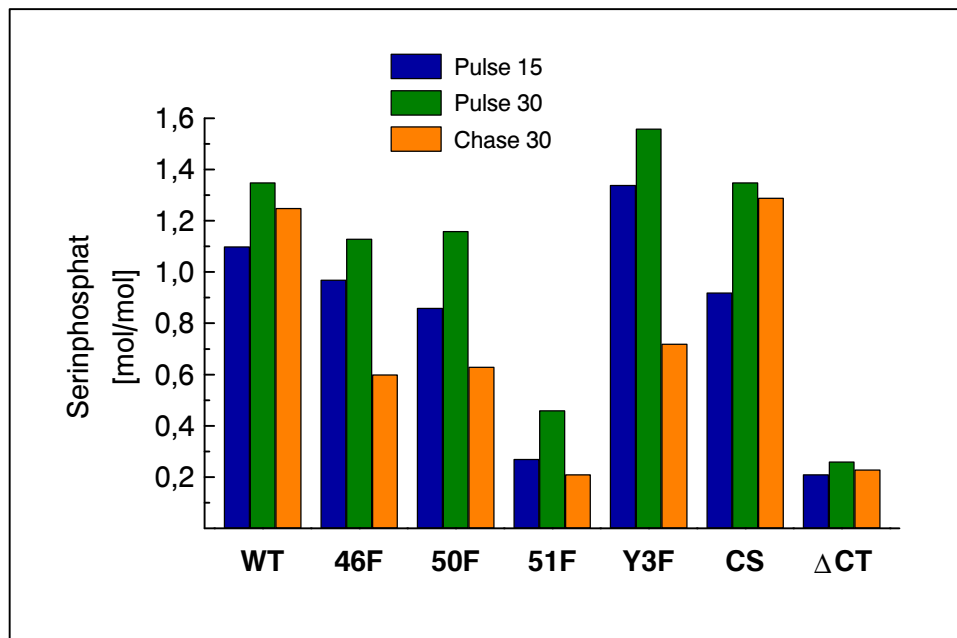
Abb. 31 (Diese und vorige Seite) Phosphopeptid-Kartierungen unter Pulse-, Chase- und Hot Chase-Bedingungen. Gezeigt sind die Elutionsprofile der phosphorylierten Kinasen nach 30 Minuten Autophosphorylierung (**Pulse**), 15 Minuten Autophosphorylierung mit markiertem ATP plus 15 Minuten Überschuß an nicht markiertem ATP (**Chase**) sowie 15 Minuten Autophosphorylierung mit nicht markiertem ATP plus 15 Minuten mit markiertem ATP (**Hot Chase**).

Sowohl der Wildtyp als auch die 46F zeigten Veränderungen in der Besetzung der C-terminalen Tyrosine: Unter Chase-Bedingungen war eine deutliche Verringerung der bisphosphorylierten Form des C-Terminus („CT-bis“) nachweisbar, unter Hot Chase-Bedingungen inkorporierte hauptsächlich diese radioaktive Phosphate. Waren die C-terminalen Tyrosine nicht vorhanden, zeigten sich stattdessen Veränderungen bei den Tyrosinen der Kinasedomäne: Die Δ CT wies sowohl in der Chase- als auch der Hot Chase-Reaktion eine Veränderung der monophosphorylierten Form auf. Die Y3F zeigte in der Chase-Reaktion vor allem eine Abnahme der tris- und der bisphosphorylierten Form, unter Hot Chase-Bedingungen wurden jedoch keine spezifischen Stellen markiert. Damit wird deutlich, daß unter Hot Chase-Bedingungen die Substitution von Y1316 und Y1322 gegen Phenylalanin nicht dieselbe Phosphatinkorporation ergibt wie bei Abwesenheit des C-Terminus.

Eine Überraschung stellten die Ergebnisse dar, die von der 50F und der 51F erhalten wurden. Die 50F verlor in der Chase-Reaktion Radioaktivität zu ungefähr gleichen Anteilen in den Phosphopeptiden mit Y1316/Y1322 und Y1146/Y1151 sowie in geringen Mengen in der monophosphorylierten Form der Kinasedomäne. Entsprechend waren diese Stellen unter Hot Chase-Bedingungen markiert. Die Kinase 51F war nicht mehr in der Lage, die C-terminalen Tyrosine in der Chase-Reaktion zu dephosphorylieren. Statt dessen erfolgten die Veränderungen an eingebauter Radioaktivität in der mono- und der bisphosphorylierten Form (Y1146/Y1150) der Kinasedomäne. An der De- und Rephosphorylierung sind demnach Y1150 und Y1151 beteiligt, wobei Y1151 im Unterschied zu Y1150 nach Austausch gegen Phenylalanin überhaupt keine Fähigkeit mehr besaß, Y1316/Y1322 transient zu phosphorylieren.

7.4 Serinphosphorylierung unter Chase-Bedingungen

Da die Fähigkeit einiger mutierter Insulinrezeptorkinasen in Bezug auf die Dephosphorylierung von Tyrosinen verändert war, wurde untersucht, inwieweit dies auch Serinphosphate betreffen könnte. Beim Wildtyp erfolgt der Verlust an Radioaktivität in der Chase-Reaktion nur auf Kosten der Tyrosinphosphorylierung (Al-Hasani 1995; Tennagels 1998). Da die quantitative Bestimmung von Serinphosphaten mittels Phosphopeptid-Kartierung wegen unterschiedlicher Wiederfindungsraten der Phosphopeptide problematisch ist, wurden die Proben dünnschichtchromatographisch auf ihren Serinphosphatanteil untersucht. In Abb. 32 sind die Anteile des Serinphosphats in der Autophosphorylierung nach 15 und 30 Minuten (Pulse 15 und 30) sowie in der Chase-Reaktion nach 30 Minuten (Chase 30; entspricht 15 Minuten Autophosphorylierung und anschließend für 15 Minuten ein Überschuß an nicht markiertem ATP) dargestellt.



WT: Tennagels 1998

Abb. 32 Anteile der Serinphosphorylierung unter Pulse- und Chase-Bedingungen. Die Proben der Autophosphorylierung (Standardbedingungen) nach 15 und 30 Minuten sowie der Chase-Reaktion nach 30 Minuten (15 Minuten Autophosphorylierung mit markiertem ATP plus 15 Minuten Überschuß an nicht markiertem ATP) wurden sauer hydrolysiert und dünnschichtchromatographisch analysiert.

Der Wildtyp, CS und Δ CT zeigten keinen Verlust an Radioaktivität in Serinresten während der Chase-Reaktion. Hingegen verloren die Kinasen 46F, 50F, 51F und Y3F erstaunlicherweise jeweils rund die Hälfte an inkorporierter Radioaktivität in der Chase-Reaktion, bezogen auf den Pulse-Wert nach 30 Minuten. Es scheint, daß neben Tyrosin- auch Serinphosphate einer transienten Phosphorylierung unterliegen können.

7.5 Lokalisierung der Phosphorylierungsstellen unter ADP-Chase-Bedingungen

Die transiente Phosphorylierung betrifft unter einem ATP-Überschuß in der Chase-Reaktion die C-terminalen Tyrosine bzw. bei einigen Mutanten die Hauptphosphorylierungsdomäne. Da die Kinasen auch bei einem Überschuß an ADP Radioaktivität verlieren, wurden von den Reaktionen unter ADP-Chase-Bedingungen nach 30 Minuten jeweils eine Phosphopeptid-Kartierung erstellt. Dadurch sollte geklärt werden, ob die ADP-vermittelte Dephosphorylierung der Kinase zum Verlust an Radioaktivität der Reste führt, die auch unter einem Überschuß an ATP dephosphorylieren, oder ob ein anderer Reaktionsweg wie beispielsweise eine Rückreaktion von ADP und Phosphoenzym zu ATP und Dephosphoenzym eine Rolle spielen könnte.

In Abb. 33 sind die Elutionsprofile dargestellt; zusätzlich ist das Profil einer für 30 Minuten autophosphorylierten IRKD („WT Pulse“) gezeigt. Beim Vergleich mit den Chromatogrammen der ATP-Chase-Reaktionen (Abb. 31) ergibt sich kein einheitliches Bild. Außer der Y3F zeigten die untersuchten Kinasen im Vergleich zum ATP-Chase im ADP-Chase ein höheres Signal, welches bei niedrigen Salzstärken eluierte (Retentionszeiten von 20-35 Minuten). Von diesem ist nicht bekannt, welchem Phosphopeptid es entspricht. Weiterhin veränderte sich uneinheitlich die Gesamtradioaktivität des Signal bei 62 Minuten, das wahrscheinlich einer phosphorylierten Form der Juxtamembrandomäne entspricht (8.3, Abb. 39). Die Dephosphorylierung der C-terminalen Tyrosine konnte ebenfalls beobachtet werden; im Unterschied zu ATP-Chase Bedingungen war der Verlust an Radioaktivität bei der 46F stärker und bei der 50F weniger stark ausgeprägt. Unter ADP-Chase-Bedingungen traten augenscheinlich qualitative und quantitative Veränderungen der Phosphorylierungsmuster auf, die darauf hindeuten, daß der Verlust in der Chase-Reaktion mit ADP einem anderen Mechanismus folgt als mit ATP.

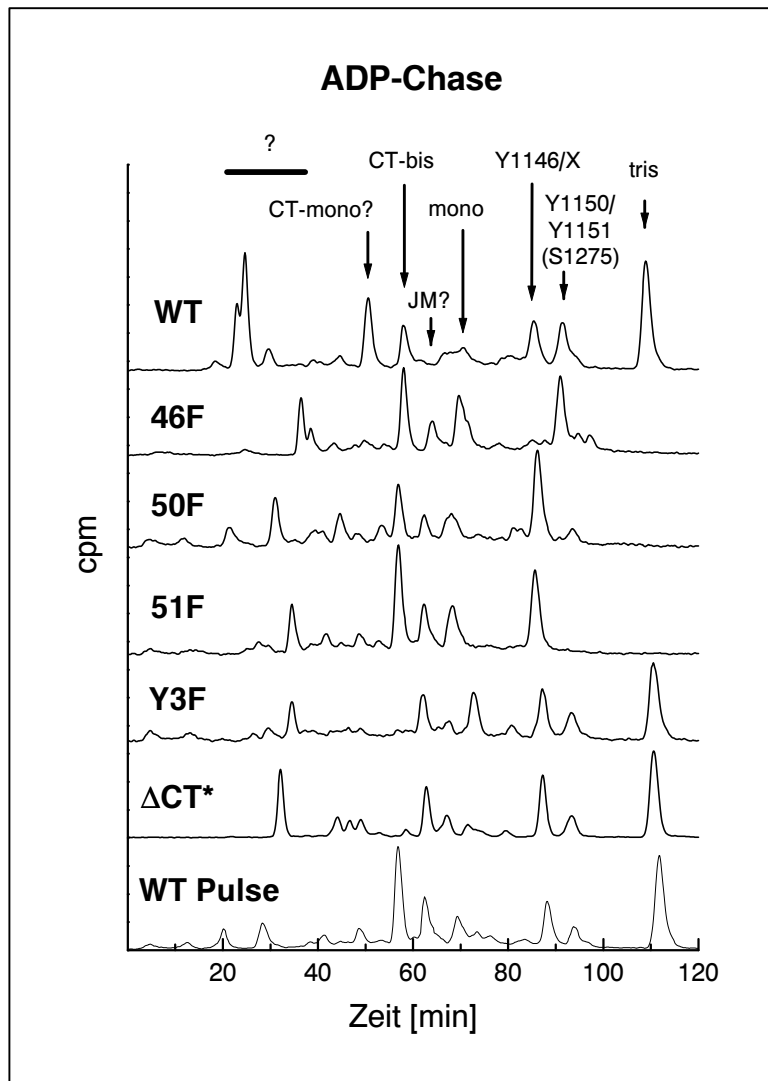


Abb. 33 Phosphopeptid-Kartierungen unter ADP-Chase-Bedingungen. Gezeigt sind die Elutionsprofile der Kinasen nach 15 Minuten Autophosphorylierung plus 15 Minuten Überschuß an nicht markiertem ADP. WT Pulse: Autophosphorylierte Wildtyp-IRKD (30 min).

8 Phosphattransfer auf exogene Substrate

Der Insulinrezeptor phosphoryliert *in vivo* und *in vitro* zahlreiche Substrate, die unter Bildung von Signalkomplexen der Weiterleitung des Insulinsignals dienen und zahlreiche zelluläre Effekte ausüben. Um mögliche Unterschiede in der Signalweiterleitung zu finden, wurde die Fähigkeit der mutierten Insulinrezeptorkinasen untersucht, Substrate zu phosphorylieren. Im Vordergrund standen dabei die Fragen, inwiefern die Transferaktivität der Enzyme beeinflusst ist, welche Rolle die Serinphosphorylierung bei der Signaltransduktion und der Aufrechterhaltung des Signals spielt und welche Bedeutung der transienten Phosphorylierung von Substraten zukommen könnte. Zunächst wurde ein synthetisches Substrat phosphoryliert, um die Transferaktivität der einzelnen Enzyme zu ermitteln. Anschließend wurden ausgewählte rekombinante Domänen und ein natürliches Substrat des Insulinrezeptors phosphoryliert. Schließlich wurden zwei kinasenaktive Rezeptorkinasen als Substrate einer aktiven Kinase eingesetzt.

8.1 Transferaktivität auf Poly(Glu:Tyr)_{4:1}

Zur Messung der Phosphotransferase-Aktivität der Kinase wurde das künstliche Kopolymer Poly(Glu:Tyr)_{4:1} (pEY) verwendet. Dazu wurden die Insulinrezeptorkinasen (1 μ M) entweder nicht oder für 0,5, 5 bzw. 30 Minuten unter Standardbedingungen autophosphoryliert. Anschließend wurden 20 μ M pEY (Endkonzentration 0,4 mg/ml; mittleres relatives Molekulargewicht 20.000) für 5 Minuten phosphoryliert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μ l Ansatz in 5 μ l 100 mM EDTA pH 8 abgestoppt. Die Proben wurden auf Whatman P-81-Papier gegeben und durch 10 % TCA/10 mM Natriumpyrophosphat präzipitiert. Die Radioaktivität der getrockneten Phosphozellulosepapierstücke wurde im β -Counter bestimmt. Die Initialgeschwindigkeiten der Kinasen wurden nach 30 Sekunden ermittelt.

Tab. 5 Phosphattransfer auf Poly(Glu:Tyr)_{4:1}. Die Kinasen wurden nicht (- VP) oder für 0,5 bis 30 Minuten unter Standardbedingungen vorphosphoryliert. Anschließend erfolgte für 5 Minuten die Phosphorylierung von Poly(Glu:Tyr)_{4:1}. Als Vergleich sind die Initialgeschwindigkeiten des Phosphateinbaus (bestimmt nach 30 Sekunden) angegeben. Unter optimaler Vorphosphorylierung ist der Zeitpunkt zu verstehen, nach der der Transfer auf das Substrat maximal war. Der durch die Wildtyp-IRKD vermittelte maximale Phosphattransfer von 257 nmol min⁻¹ mg⁻¹ wurde als 100 % gesetzt. V_{ini}: Initialgeschwindigkeit der Autophosphorylierung; pEY: Poly(Glu:Tyr)_{4:1}; VP: Vorphosphorylierung.

Kinase	V _{ini} (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	Transfer auf pEY (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)				% Aktivität nach optimaler VP
		- VP	+ 0,5	+ 5	+ 30	
WT	132	38	257	182	25	100
46F	113	11	157	135	21	61
50F	96	72	112	169	52	66
51F	128	53	154	141	65	60
SSDD	128	33	272	230	61	106
ΔCT*	21	11	22	91	100	39

Alle untersuchten Kinasen wiesen ohne Vorphosphorylierung eine basale Transferaktivität auf, die sich durch Vorphosphorylierung 2-14fach stimulieren ließ. Beim Wildtyp, 46F, 51F und SSDD wurde die höchste Aktivität nach 0,5 Minuten Vorphosphorylierung erreicht, 50F und ΔCT* benötigten 5 Minuten der Vorphosphorylierung zur maximalen Transferleistung. Setzt man die Aktivität nach optimaler Vorphosphorylierung der Wildtypkinase 100 %, so erreichte die SSDD die gleiche Aktivität, während bei den Monosubstitutionen der Kinasedomäne eine um 35-40 % verminderte Transferaktivität zu verzeichnen war. Die ΔCT* schließlich erreichte lediglich 40 % Transferleistung.

Der Wildtyp-IRKD und die SSDD besaßen nach 30 Minuten Vorphosphorylierung nur noch 10-20 % der maximalen Aktivität. Dies war nicht auf eine ATP-Verarmung zurückzuführen, da die Zugabe von frischem Kinasepuffer (mit 250 μM ATP, Ionen und Poly-L-Lysin) nach 30 Minuten Vorphosphorylierung den Phosphorylierungsstatus des pEY nur marginal beeinflusste. Gleiches konnte bei der Phosphorylierung eines Fusionsproteins des C-Terminus des Insulinrezeptors (GST-CT) durch IRKD und SSDD beobachtet werden: GST-CT wurde 2-3fach schwächer phosphoryliert, wenn die Kinase 30 Minuten vorphosphoryliert war, als ohne Vorphosphorylierung. Dieser Effekt war nicht durch eine ATP-Verarmung bedingt, da die Zugabe von frischem ATP den Einbau ins Substrat nur minimal erhöhte. Dieser zusätzliche Einbau war auffälligerweise auf Serinreste beschränkt (Anstieg von 1 % auf 8 %; Daten nicht gezeigt).

Auch die 46F, 50F und 51F wiesen nach 30 Minuten Vorphosphorylierung nur noch knapp 40 % der maximalen Transferaktivität auf. Völlig verändert hatte sich hingegen das Bild bei der Δ CT*. Nach 30 Minuten Vorphosphorylierung war dieser Kinase die gleiche Aktivität erhalten wie nach 5 Minuten, d. h. die Inhibition der Transferase fand bei der Δ CT* nicht mehr statt. Es scheint, daß der C-Terminus nach langen Autophosphorylierungszeiten einen inhibitorischen Effekt auf die Phosphorylierung exogener Substrate ausübt. Die Tatsache, daß die Substitution der Serinphosphorylierungsstellen gegen Aspartat keine Veränderung gegenüber dem Wildtyp zeigte, spricht jedoch gegen einen Einfluß der C-terminalen Serinphosphorylierung auf die Transferaktivität.

8.2 Phosphorylierung natürlicher Substrate

Es wurden verschiedene natürliche Substrate phosphoryliert. Diese umfaßten sowohl Fusionsproteine ausgewählter Bereiche des Insulinrezeptors, die die Autophosphorylierungsstellen beinhalten, wie auch rekombinante Fragmente natürlicher Substrate. Verwendet wurden GST-Fusionsproteine des Juxtamembranbereichs (G947-V1020, GST-JM, 34,2 kDa), der Kinasedomäne (F1139-M1180, GST-Ex20, 30,9 kDa) und des C-Terminus des Insulinrezeptors (N1249-S1343, GST-CT, 36,9 kDa), die mir freundlicherweise von N. Tennagels überlassen wurden. GST-CT besitzt den Aminosäureaustausch C1296S, da dieses Cystein eine hohe Reaktivität besitzt und zur Dimerisierung bei der Aufreinigung des GST-CT führt (Goder 1995). Zusätzlich wurde eine Variante des GST-CT verwendet, bei der die Tyrosine 1316 und 1322 gegen Phenylalanin ausgetauscht sind (GST-CTphe). Als natürliches Substrat wurde ein rekombinantes Fragment des humanen IRS-1 (Aminosäuren 516-777) als GST-Fusionsprotein benutzt (GST-IRS1, 54,2 kDa, freundlicherweise von S. Lehr zur Verfügung gestellt). Dieses enthält 12 Tyrosine, davon 5 in einem YxxM-Motiv, sowie 54 Serine/Threonine und wurde mir freundlicherweise von S. Parvaresh zur Verfügung gestellt. 4 Serine liegen unmittelbar hinter einer YxxM-Sequenz und scheinen *in vivo* die PI3K-Aktivität zu modulieren (Mothe und Van Obberghen, 1996). Ein weiteres Serin, S564, liegt in der Sequenz GGGSGG, welche an die Umgebung des S1309 der IRKD erinnert (GGSSLG). Von herausragender Bedeutung war die Frage, inwiefern sich die Substitutionen der löslichen Kinasen auf die Fähigkeit der Serinphosphorylierung exogener Substrate auswirkt.

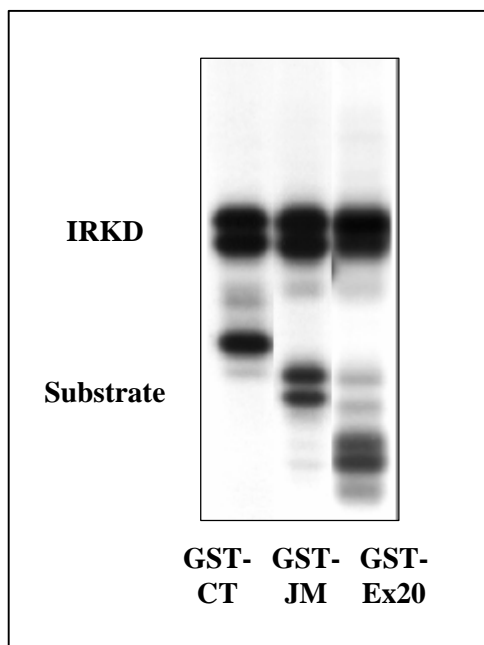
Die Substratphosphorylierungen wurden ohne Vorphosphorylierung der Kinasen durchgeführt. Dies entspricht eher der *in vivo* Situation, bei der wahrscheinlich immer Substrate zur Verfügung stehen, als der artifiziellen Situation einer vorphosphorylierten Kinase. Die Reaktionen wurden mit 1 μ M Kinase unter Standardbedingungen für 20 Minuten durchgeführt. Die Substratkonzentrationen wurden derart gewählt, daß sie sich im Bereich ihres K_M -Wertes bewegten (Tabelle 6; Müller 1996).

Tab. 6 K_M -Werte der GST-Insulinrezeptorpeptide zur IRKD (Müller 1996)

Substrat	K_M (μM)
GST-CT	6,1
GST-JM	10,5
GST-Ex20	2,8

Bei diesen Konzentrationen werden die Substrate außer an Tyrosin- auch an Serin-/Threoninresten phosphoryliert, hohe Substratkonzentrationen hingegen hemmen die Kinaseaktivität und führen ausschließlich zu einer Tyrosinphosphorylierung der Substrate (Tennagels 1998). Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Kinase gestartet. Nach der Reaktionszeit wurde die Ansätze in SDS-Probenpuffer gestoppt. Aus der getrockneten Gel der SDS-PAGE wurden die Kinase- und Substratbanden ausgeschnitten und im β -Counter analysiert. Die Substrate wurden dünnschichtchromatographisch und teilweise durch zweidimensionale Elektrophorese (Boyle *et al.*, 1991) auf die Zusammensetzung ihrer Phosphoaminosäuren hin untersucht.

Um vergleichbare Resultate zu erhalten, wurden die Substratphosphorylierungen jeweils im direkten Vergleich zur Reaktion mit der Wildtypkinase durchgeführt. Abb. 34 stellt ein repräsentatives Autoradiogramm phosphorylierter GST-Fusionsproteine dar.



Die typischerweise transferierten Phosphatmengen auf die Substrate nach 20 Minuten Phosphorylierung durch die IRKD (10 pmol) sind in Tabelle 7 gezeigt (bezogen auf 10 pmol Substrat).

Abb. 34 Phosphorylierung von GST-Fusionsproteinen durch die IRKD. Die Substrate GST-CT, GST-JM und GST-Ex20 wurden 20 Minuten durch die IRKD unter Standardbedingungen phosphoryliert. Konzentrationen der Substrate siehe Tab. 7. Phosphorylierung von GST-IRS1 siehe Abb. 40. Die Abbildung wurde aus mehreren Autoradiogrammen zusammengestellt.

Tab. 7 Phosphattransfer auf die untersuchten Substrate durch die IRKD. Beschreibung der Substrate siehe Text.

Substrat	Konzentration (μM)	Transferierte Phosphate (pmol)
GST-CT	5	12-16
GST-CTphe	5	1,5-2
GST-JM	5	4-6
GST-Ex20	2,5	2,5-5
GST-IRS1	2,5	15-25

Das Verhältnis von Kinase zu Substrat entsprach dabei 1:5 ($5 \mu\text{M}$) bzw. 1:2,5 ($2,5 \mu\text{M}$). In keinem Fall konnte eine vollständige Phosphorylierung der Substrate erzielt werden, wie sie auf Grund der Phosphorylierungsstellen zu erwarten gewesen wäre. Da die Einbauraten in die Substrate Schwankungen unterlagen, wurden die Meßwerte prozentual auf den jeweiligen Einbau in den Wildtyp bezogen, um direkte Vergleiche aller untersuchten Kinasen zu ermöglichen. Der Wildtyp wurde dabei als 100 % gesetzt.

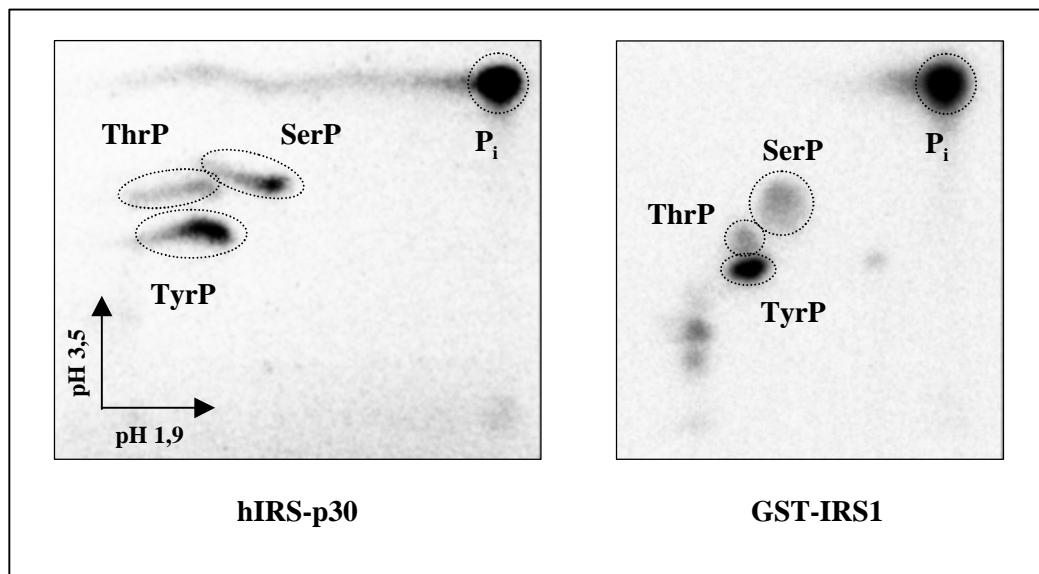
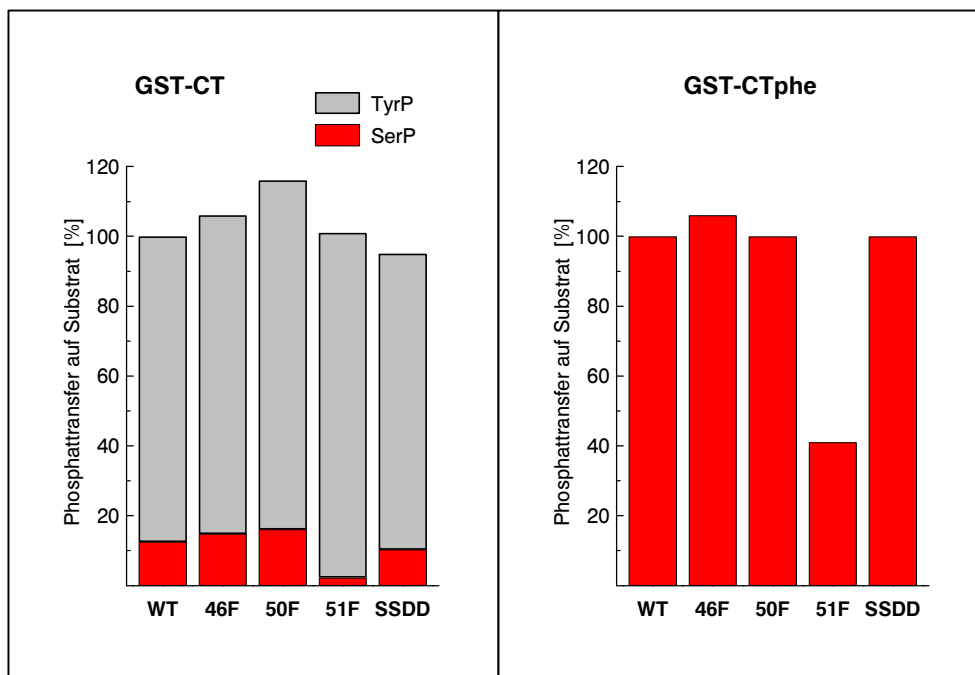


Abb. 35 Zweidimensionale Phosphoaminosäureanalyse der IRS-1-Fragmente. Je $5 \mu\text{M}$ hIRS-p30 und GST-IRS1 wurden für 20 Minuten durch die IRKD unter Standardbedingungen phosphoryliert. Die Phosphoaminosäuren wurden durch zweidimensionale Elektrophorese nach 10.7.2.2 aufgetrennt. Die Pfeile geben die Laufrichtungen bei den entsprechenden pH-Werten wieder. TyrP: Tyrosinphosphat; SerP: Serinphosphat; ThrP: Threoninphosphat; P_i : anorganisches Phosphat.

Neben Tyrosinphosphorylierung konnte Serinphosphorylierung detektiert werden. In GST-CT wurden dabei 10-15 % Serinphosphat erhalten, bei einer Konzentration von 2 μM (entspricht einem Verhältnis von Kinase zu Substrat von 1:2) sogar bis zu 35 %. GST-CTphe besitzt nur die beiden Serinautophosphorylierungsstellen. GST-JM inkorporierte ca. 5 % Phosphate in Serinreste, GST-IRS1 erreichte einen Serinphosphatanteil von 20-30 %. Zweidimensionale Elektrophorese zeigte, daß in diesem auch geringe Mengen an Threoninphosphat nachweisbar waren. Vergleiche mit dem IRS-1-Fragment ohne GST-Anteil (hIRS1-p30; Siemeister *et al.*, 1995) deuteten allerdings darauf hin, daß bei gleichen Substratkonzentrationen der Serin-/Threoninphosphatgehalt im GST-IRS1 merklich niedriger lag (5 μM GST-IRS1: 4 % Serin-, 1 % Threoninphosphat; 5 μM hIRS1-p30: 21 % Serin-, 4 % Threoninphosphat, Abb. 35). Zudem erreichte der Gesamteinbau nur die Hälfte. Daher wurde GST-IRS1 in einer Konzentration von 2,5 μM eingesetzt, so daß ein signifikanter Anteil an Serin-/Threoninphosphorylierung erzielt wurde. Möglicherweise behindert der GST-Anteil die Phosphorylierung des IRS-1-Fragments. Abb. 36 stellt graphisch den Phosphattransfer auf die Fusionsproteine dar (GST-IRS1 s. Abb. 41 A) und untergliedert in Tyrosin- und Serinphosphorylierung, soweit untersucht. Die transferierten Phosphate der IRKD dienen als Referenz und wurden als 100 % gesetzt.



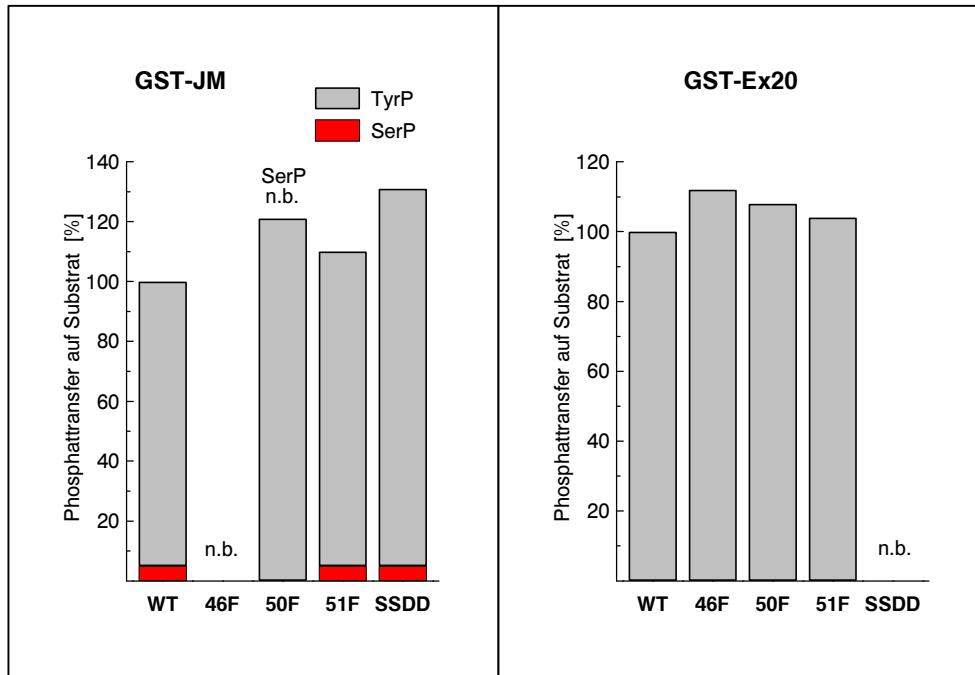


Abb. 36 (Diese und vorige Seite) Phosphorylierung der GST-Fusionsproteine durch lösliche Insulinrezeptorkinasen. GST-CT, GST-CTphe, GST-JM und GST-Ex20 wurden für 20 Minuten durch die Kinasen unter Standardbedingungen phosphoryliert. Die Phosphoaminosäurezusammensetzung wurde wie in 4.1 ermittelt. Der Phosphattransfer durch die IRKD wurde gleich 100 % gesetzt und die Transferraten der anderen Kinasen darauf bezogen. TyrP: Tyrosinphosphat; SerP: Serinphosphat; n.b.: nicht bestimmt.

GST-CT wurde von allen untersuchten Kinasen gleichermaßen phosphoryliert. Bei der Phosphoaminosäureanalyse zeigte sich jedoch, daß die 51F den C-Terminus nur mit stark verminderter Aktivität an Serinresten phosphorylierte (Abb. 37 A). Dies bestätigte sich bei der Phosphorylierung des C-Terminus ohne Tyrosinphosphorylierungsstellen (GST-CTphe). Dieser enthält nur die Autophosphorylierungsstellen S1275 und S1309 des Insulinrezeptors und wurde 2,5fach schlechter von 51F phosphoryliert (Abb. 37 B). Dieses Verhalten wurde bei Konzentrationen des GST-CTphe von 3 μ M und 9 μ M festgestellt. Dieser Befund unterstützt die Ergebnisse der Autophosphorylierung, in der 51F eine stark reduzierte Serinphosphorylierung der C-terminalen Serinreste zeigte (4.2).

Bei GST-JM und GST-Ex20 wurden keine Unterschiede in der Phosphorylierung festgestellt. GST-JM wurde von den untersuchten Kinasen an Serinresten phosphoryliert, wobei der Anteil jeweils 4-5 % der Gesamtphosphorylierung ausmachte.

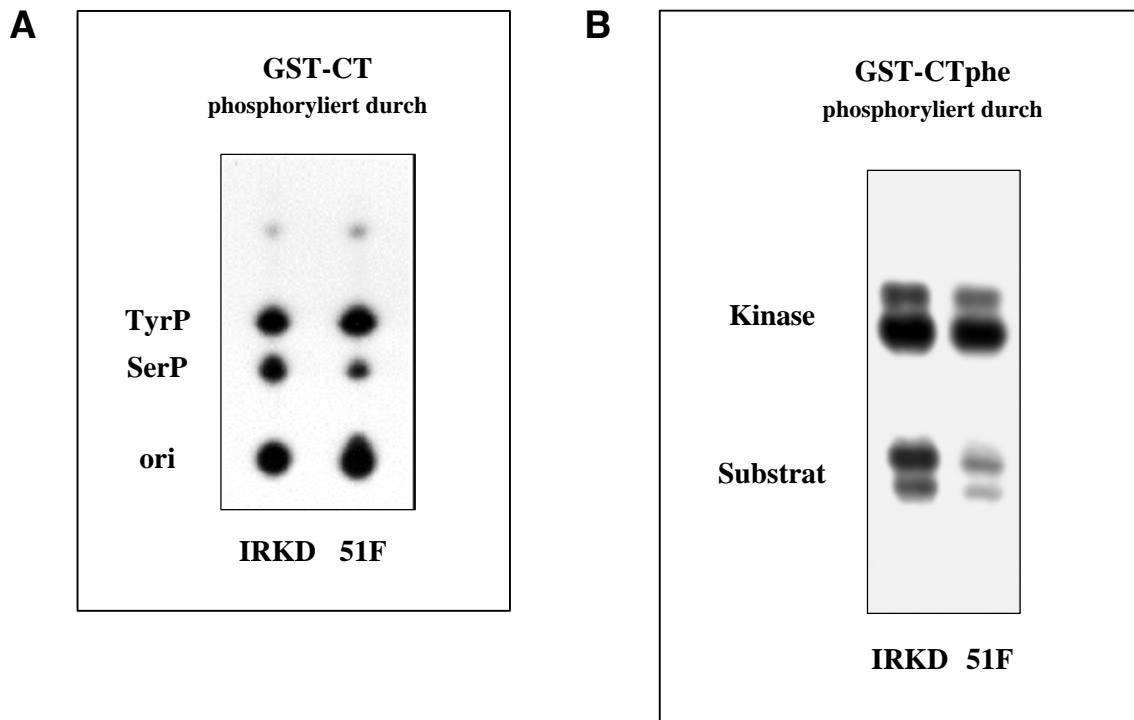
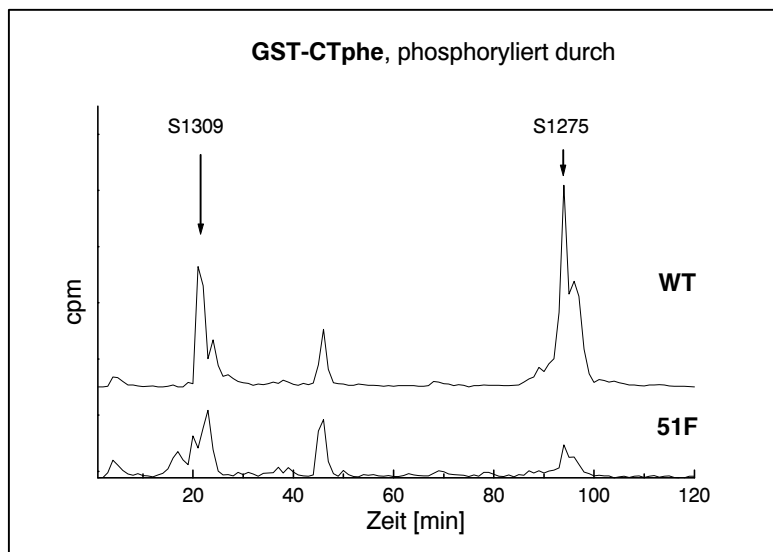


Abb. 37 Serinphosphorylierung des C-terminalen Peptids durch IRKD und 51F. **A** Phosphoaminosäureanalyse des GST-CT. 5 μ M GST-CT wurde 20 Minuten durch IRKD bzw. 51F unter Standardbedingungen phosphoryliert. Das Peptid wurde sauer hydrolysiert und dünnschichtchromatographisch analysiert. TyrP: Tyrosinphosphat; SerP: Serinphosphat; ori: Auftragspunkt. **B** Autoradiogramm der Phosphorylierung des GST-CTphe. 9 μ M GST-CTphe wurde 20 Minuten durch IRKD bzw. 51F phosphoryliert.

8.3 Phosphopeptid-Kartierung der phosphorylierten Substrate

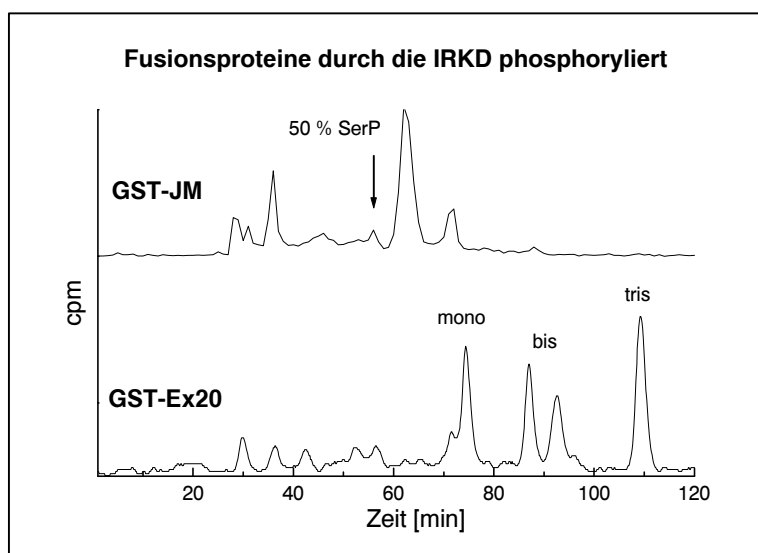
Um die möglicherweise unterschiedlichen Besetzungen der phosphorylierten Aminosäuren in den Substraten zu analysieren, wurden von phosphorylierten Substraten Phosphopeptid-Kartierungen erstellt. GST-CTphe, welches als Phosphorylierungsstellen nur die Serinreste 1275 und 1309 besitzt, zeigte im Chromatogramm, wenn es vom Wildtyp phosphoryliert wurde, die entsprechenden Phosphopeptide dieser Serine (Abb. 38). Bei einer Phosphorylierung durch die 51F hingegen reduzierten sich die Phosphosignale des S1309 leicht und des S1275 stark. Dies bestätigt wiederum die Analyse der Autophosphorylierung der 51F, bei der der Verlust an Serinphosphorylierung ebenfalls hauptsächlich auf eine reduzierte Phosphorylierung von S1275 zurückgeführt werden konnte (4.3.5).

Abb. 38 Phosphopeptid-Kartierung des GST-CTphe. 9 μM des Fusionsproteins wurde unter Standardbedingungen für 30 Minuten von der Wildtyp-IRKD bzw. 51F phosphoryliert.



Wurde GST-Ex20 durch die Kinasen 46F, 50F, 51F oder den Wildtyp phosphoryliert, ergaben sich vergleichbare Elutionsprofile. GST-Ex20 zeigte unter den hier verwendeten Bedingungen (2,5 μM Substrat, 30 Minuten Phosphorylierung) Signale der mono-, bis- und trisphosphorylierten Form der Kinasedomäne im Verhältnis von etwa 1:1,2:1 (WT, 51F) bzw. 1:1,6:1,4 (46F, 50F); Abb. 39 zeigt exemplarisch das durch die Wildtypkinase phosphorylierte GST-Ex20. Die Bis-Form teilte sich, analog zur Autophosphorylierung (4.3.2), jeweils in die Phosphopeptide mit Y1150/Y1151 und Y1146/X auf, wobei Y1146/X die ausgeprägtere Form war. Auch in der Mono-Form konnten ansatzweise zwei distinkte Signale unterschieden werden, deren Höhen im Verhältnis 1:3 bis 1:4 standen.

Abb. 39 Phosphopeptid-Kartierung von GST-JM und GST-Ex20. 5 μM GST-JM wurde 20 Minuten und 2,5 μM GST-Ex20 30 Minuten durch die IRKD unter Standardbedingungen phosphoryliert. Die Signale des GST-JM wurden entsalzt (10.8) und dünnschichtchromatographisch auf ihre Phosphoaminosäurezusammensetzung untersucht (10.7.2.1, Daten nicht gezeigt). SerP: Serinphosphat.



Die tryptische Spaltung der Juxtamembrandomäne erzeugt ein 38 Aminosäuren langes, hydrophobes Fragment, das alle drei potentiellen Tyrosinphosphorylierungsstellen 953, 960 und 972 beinhaltet. Die Phosphorylierung von Y960 gilt als gesichert, Y953 wird möglicherweise auch phosphoryliert (Kohanski 1993b). Bei der Sequenzierung der IRKD konnten keine Phosphopeptide des Juxtamembranbereichs identifiziert werden (Al-Hasani *et al.*, 1997). GST-JM zeigte nach Phosphorylierung durch den Wildtyp, 51F bzw. SSDD identische Profile, in denen ein Signal dominierte (Elutionszeit von 62 min; Abb. 39). Genauso wie das Signal nach 72 Minuten enthielt dieses reines Phosphotyrosin; die beiden stellen möglicherweise eine mono- und eine bisphosphorylierte Form der Juxtamembrandomäne dar. Das Signal bei 62 Minuten wurde auch im Chromatogramm phosphorylierter Kinasen identifiziert (vgl. 4.3, 5.2, 7.3), das Phosphopeptid bei Fraktion 72 wird in der Kinase möglicherweise von Mono-Formen der Kinasedomäne verdeckt. Nach 36 Minuten eluierte ein weiteres Signal; da es vergleichsweise schlecht an die Anionenaustauschsäule band, könnte es sich um ein anders gespaltenes Fragment handeln, das zusätzliche positive Ladungen trägt. Da GST-JM auch an Serinresten phosphoryliert wurde, wurden alle Signale der Kartierung auf Phosphoserin hin analysiert. Es wurde ein kleines Signal bei 57 Minuten gefunden, in dem 50 % Serinphosphatanteil nachweisbar waren. Da die beiden Signale bei 62 und 72 Minuten wahrscheinlich dem Fragment mit den Hauptphosphorylierungsstellen zugeordnet werden müssen und beide Signale nur an Tyrosinresten phosphoryliert waren, ist das Signal mit Serinphosphat vermutlich einem anderen tryptischen Peptid des Juxtamembranbereichs zuzuordnen. Eine theoretische Spaltung ergibt nur ein Fragment, welches einen Serinrest besitzt: ELGQGS*FGMVYEGNAR, wobei das mit * gekennzeichnete das Serin 994 ist. Dieses ist in die ATP-Bindung involviert und scheint die Autophosphorylierung zu beeinflussen (Strack *et al.*, 1997). Mit einer Phosphorylierung besitzt das Peptid eine Nettoladung von -3 und könnte durchaus die beobachtete Retentionszeit aufweisen.

8.4 Transiente Phosphorylierung von GST-IRS1

Die IRKD besitzt nicht nur die Fähigkeit, sich selber zu de- und rephosphorylieren, sondern auch transiente Phosphorylierungen an Substraten wie dem rekombinanten Fragment des humanen IRS-1 zu vermitteln (Tennagels 1998). Es ist denkbar, daß die eingeführten Aminosäuresubstitutionen der Kinasen diesen Prozeß beeinflussen könnten. Daher wurde mit GST-IRS1 Phosphorylierungen unter Pulse-Chase-Bedingungen durchgeführt. Dazu wurde 2,5 µM GST-IRS1 durch 1 µM Kinase für 15 Minuten unter Standardbedingungen phosphoryliert. Für die Chase-Reaktion wurde der Ansatz anschließend mit einem 10fachen Überschuß an ATP versetzt. Nach insgesamt 30 Minuten Reaktionszeit wurden die Reaktionen in SDS-Probenpuffer gestoppt. Die Radioaktivität der Kinasen und der Substrate wurden wie in 4.1 bestimmt. Abb. 40 zeigt ein repräsentatives Autoradiogramm. Nach 30 Minuten betrug die Abweichung der

Substratphosphorylierung gegenüber der nach 15 Minuten maximal 20 %. Wurde gleichzeitig mit dem Überschuß an ATP 50 mM EDTA hinzugefügt, betrug der Verlust an Radioaktivität im Substrat 10 % (Spur 4); die Dephosphorylierung der Substrate ist daher unbedingt abhängig von einer aktiven Kinase. Während nach 15 und 30 Minuten Autophosphorylierung IRKD und GST-IRS1 phosphoryliert vorlagen (Spuren 1 und 2), wurde in der Chase-Reaktion sowohl im Substrat als auch in der Kinase ein Verlust an Radioaktivität beobachtet (Spur 3). Die transiente Phosphorylierung des GST-IRS1 durch die IRKD bestätigte sich in einem analogen Versuch ohne Poly-L-Lysin (Spuren 4-7). Nach 30 Minuten waren im GST-IRS1 (2 μ M) 13 pmol Phosphate inkorporiert, was sich auch nach weiteren 30 Minuten nicht steigern ließ. Die Phosphorylierung bezog sich ausschließlich auf Tyrosinreste (Daten nicht gezeigt). In der Chase-Reaktion wurde ein Verlust an Radioaktivität von ca. 40 % verzeichnet. Die IRKD besitzt demnach auch ohne stimulierende Polykationen die Fähigkeit der Substratdephosphorylierung.

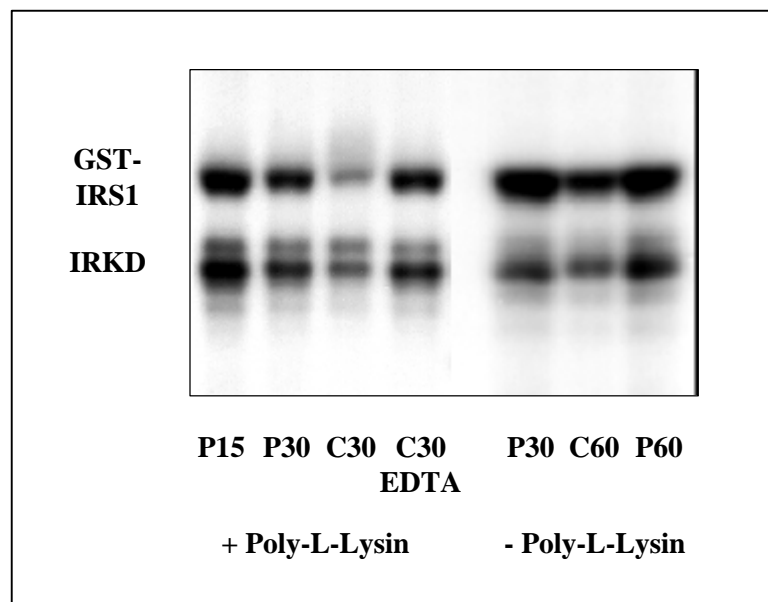


Abb. 40 Phosphorylierung von GST-IRS1 unter Pulse-Chase-Bedingungen. 2,5 bzw. 2 μ M GST-IRS1 wurde in An- (Spuren 1-4) oder Abwesenheit (Spuren 5-7) von Poly-L-Lysin durch die IRKD unter Standardbedingungen phosphoryliert. Mit Polykation wurde das Substrat 15 Minuten phosphoryliert und der Reaktionsansatz anschließend für weitere 15 Minuten mit einem Überschuß an nicht markiertem ATP inkubiert (**C30**); als Vergleich dienten die Phosphorylierungen nach 15 und 30 Minuten (**P15** und **P30**). Zusätzlich wurde eine Chase-Reaktion in Gegenwart von EDTA durchgeführt (**C30 EDTA**). Ohne Polykation wurde GST-IRS1 für 30 und 60 Minuten phosphoryliert (**P30** und **P60**); in der Chase-Reaktion wurde nach 30 Minuten Phosphorylierung der Überschuß an nicht markiertem ATP für weitere 30 Minuten hinzugefügt (**C60**).

Die transiente Phosphorylierung von GST-IRS1 wurde für die mutierten Insulinrezeptorkinasen analysiert. Abb. 41 faßt graphisch die ermittelten Werte des Phosphattransfers auf GST-IRS1 zusammen. Der Transfer der Wildtyp-IRKD auf GST-IRS1, der 15-25 pmol mit 20-30 % Serinphosphaten betrug, wurde als 100 % gesetzt. Sämtliche untersuchte Kinasen besaßen vergleichbare Aktivitäten, GST-IRS1 zu phosphorylieren (**A**). Im Hinblick auf die Serinphosphorylierung des GST-IRS1 ergaben sich keine auffälligen Unterschiede; auch 51F phosphorylierte GST-IRS1 vergleichbar an Serinresten, obwohl diese Mutante C-terminale Serinauto-phosphorylierungsstellen mit stark verminderter Aktivität besetzte.

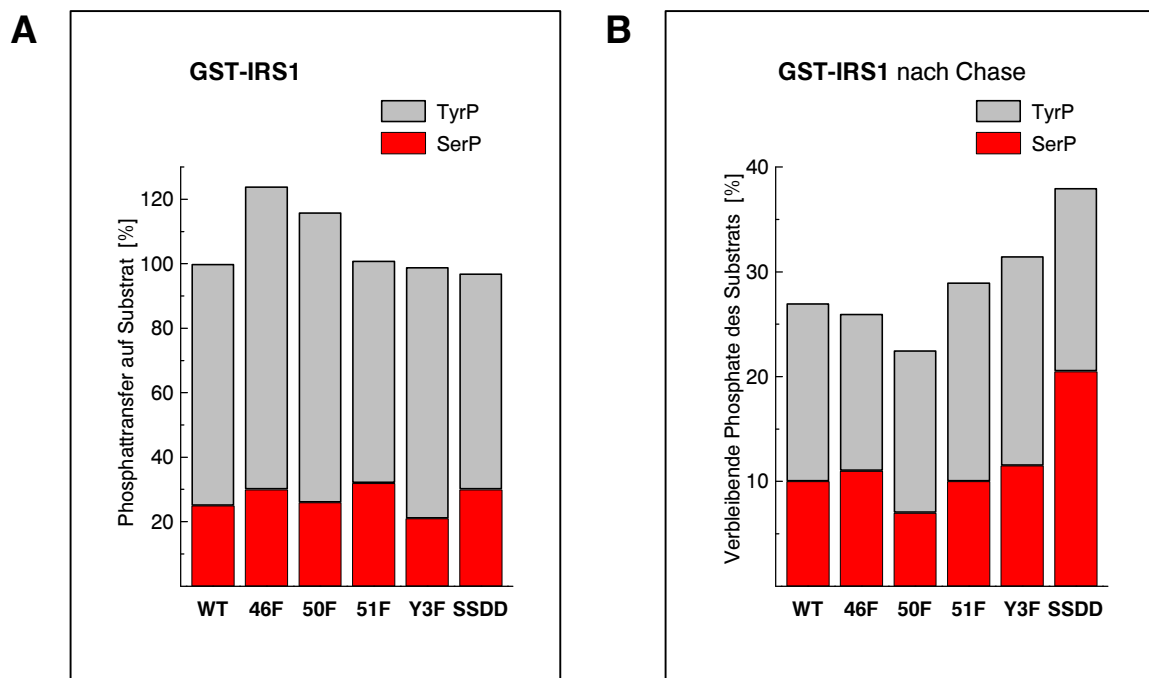


Abb. 41 Phosphorylierung des GST-IRS1 durch lösliche Insulinrezeptorkinasen. **A** Phosphattransfer auf GST-IRS1. 2,5 μ M Substrat wurde 20 Minuten durch die Kinasen unter Standardbedingungen phosphoryliert. Die Bestimmung der Phosphoaminosäuren erfolgte wie in 4.1.

B Verbleibende Phosphatinkorporation im GST-IRS1 nach der Chase-Reaktion. Das Substrat wurde 15 Minuten phosphoryliert und anschließend für 15 Minuten mit einem Überschuß an nicht markiertem ATP inkubiert. Phosphoaminosäureanalyse wie in 4.1. TyrP: Tyrosinphosphat; SerP: Serinphosphat.

Unter Chase-Bedingungen (**B**) verlor GST-IRS1 70-80 % Radioaktivität, was sowohl Tyrosin- als auch weniger stark Serinreste betraf (73-83 % zu 61-73 %). Bei der SSDD war überraschenderweise nur 60 % Verlust an Radioaktivität zu verzeichnen, was darauf zurückzuführen ist, daß - bei vergleichbarer Tyrosinphosphorylierung - der Verlust an Serinphosphaten um die Hälfte niedriger als beim Wildtyp war. Die C-terminale Serinphosphorylierung der Insulinrezeptorkinase könnte demnach die Fähigkeit reduzieren, GST-IRS1 an Serinresten zu dephosphorylieren. Versuche mit der Δ CT* und GST-IRS1

unter Pulse-Chase-Bedingungen zeigten, daß diese Mutante GST-IRS1 nur um 50-65 % zu dephosphorylieren vermag, unabhängig von einer Vorphosphorylierung des Enzyms; GST-IRS1 wurde mit Vorphosphorylierung wenig und ohne Vorphosphorylierung praktisch nicht an Serinresten phosphoryliert (Wieber 1998).

8.5 Kinetische Konstanten der Substratphosphorylierung: Der C-Terminus

Die Aminosäuresubstitution Y1151F führte zu einer reduzierten Serinphosphorylierung des C-Terminus sowohl während der Autophosphorylierung als auch in Phosphorylierung des C-Terminus als Substrat. Hingegen war die Fähigkeit, GST-IRS-1 an Serinresten zu phosphorylieren, nicht beeinträchtigt. Dies führte zur Vermutung, daß der C-Terminus eine schlechtere Affinität zur Kinasedomäne und/oder eine niedriger Maximalgeschwindigkeit besitzen könnte. Daher wurden von der 51F und im Vergleich dazu von 46F, 50F und SSDD K_M - und V_{MAX} -Werte für GST-CT ermittelt. Dazu wurden die Kinasen (1 μ M) unter Standardbedingungen für 5 Minuten vorphosphoryliert, um eine Inhibition der Autophosphorylierung zu vermeiden. Anschließend wurde GST-CT in Endkonzentrationen von 3,6 bis 24,3 μ M hinzugegeben. Nach 30 Sekunden wurde SDS-Probenpuffer in die Ansätze gegeben, die Proben mittels SDS-PAGE getrennt und die Radioaktivität der Banden im β -Counter bestimmt. Die Bestimmung der kinetischen Werte erfolgte mittels Lineweaver-Burk-, Hanes-, Eadie-Hofstee- und Parameter Space-Diagrammen sowie hyperbolischer Regressionsanalyse. Dazu wurde das Programm Hyper 1.1s benutzt (10.10.; Wilkinson, 1961; Duggleby 1981). Die erhaltenen Werte wurden gemittelt und sind in Tabelle 8 dargestellt; Abb. 42 zeigt das Autoradiogramm der phosphorylierten GST-CT und Abb. 43 die graphischen Auswertungen nach Lineweaver-Burk.

Tab. 8 K_M -Werte des GST-CT für die untersuchten Insulinrezeptorkinasen

Kinase	K_M (μ M)	V_{MAX} ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
46F	7,2	114
50F	6,8	109
51F	9,9	72
SSDD	10,9	138
WT	6,1 ^a	117 ^a
YY1316/1322FF	7,4 ^a	26 ^a

^a : Tennagels 1998

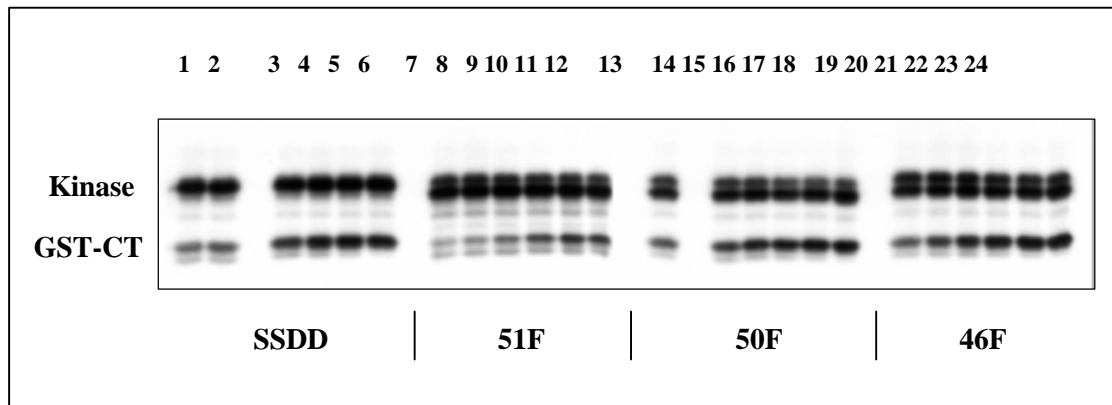


Abb. 42 Substratphosphorylierung des GST-CT zur Bestimmung des K_M . GST-CT (Spur 1: 3,6 μM , Spur 2: 5,0 μM , Spur 3: 7,2 μM , Spur 4: 11,4 μM , Spur 5: 17,1 μM , Spur 6: 24,3 μM ; entsprechend die Spuren 7-12, 13-18 und 19-24) wurde für 30 Sekunden unter Standardbedingungen durch 46F, 50F, 51F und SSDD phosphoryliert und mittels SDS-PAGE getrennt. Gezeigt ist das Autoradiogramm.

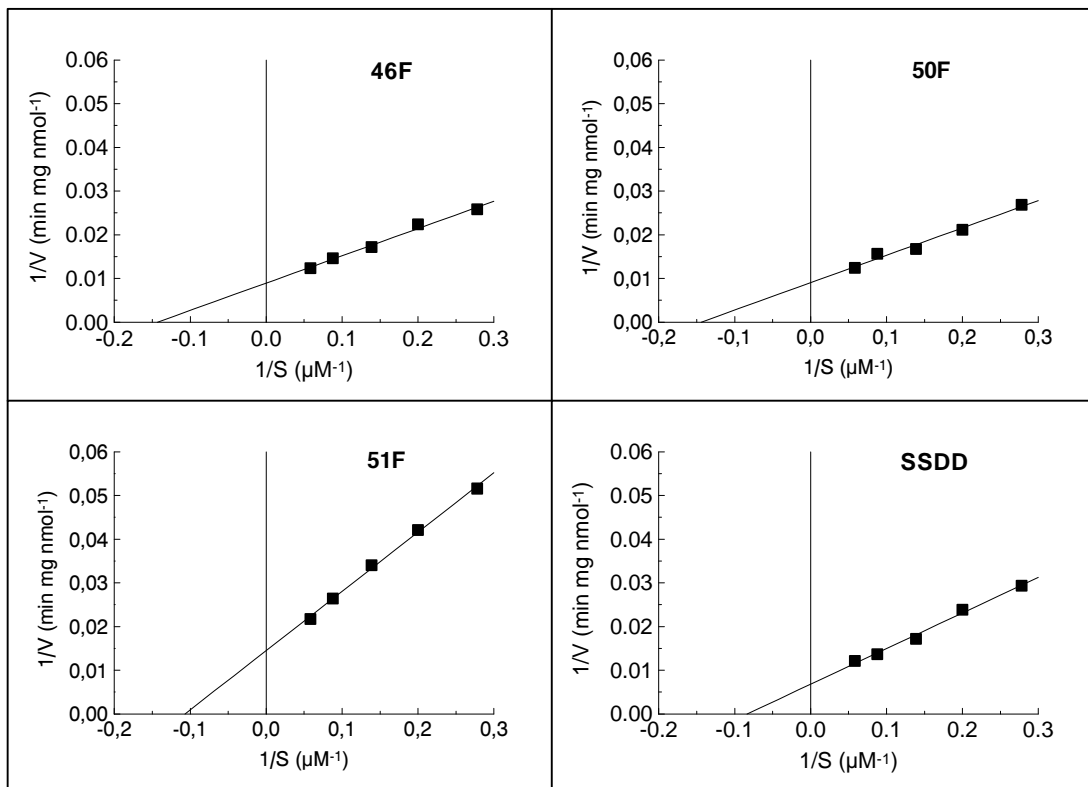


Abb. 43 Repräsentative graphische Auswertung der K_M -Bestimmung des GST-CT nach Lineweaver-Burk.

In der Tabelle sind ergänzend sind die Werte für den Wildtyp und YY1316/1322FF gezeigt (Tennagels 1998). 46F und 50F zeigten weder im K_M - noch im V_{MAX} -Wert Abweichungen vom Wildtyp. 51F und SSDD hingegen besaßen für GST-CT einen erhöhten K_M . Während SSDD auch einen leicht erhöhten V_{MAX} -Wert aufwies, war dieser bei 51F um 40 % verringert. Die Tatsache, daß sowohl K_M erhöht als auch V_{MAX} verringert ist, könnte die verringerte Phosphorylierung der Serinreste im C-Terminus bei 51F erklären. Auch die Mutante IRKD-YY1316/1322FF zeigte für das Substrat GST-CT einen stark verringerten V_{MAX} -Wert als der Wildtyp, jedoch keine Veränderung des K_M -Werts; der nicht an Tyrosinresten phosphorylierbare rezeptoreigene C-Terminus verhielt sich in diesem Fall wie ein Pseudosubstrat (Tennagels 1998).

8.6 Inaktive Kinasen als Substrate der Δ CT

8.6.1 Bestimmung des K_M -Wertes

Zwei kinaseinaktive Insulinrezeptorkinasen standen für Untersuchungen zur Verfügung. In der Kinase K1018A ist das für die ATP-Bindung essentielle Lysin 1018 substituiert (Al-Hasani *et al.*, 1997; Tennagels 1998). Bei der D1120A eliminierte die Substitution des Aspartats 1120 gegen Alanin die katalytische Base; die ATP-Bindung dieser Kinase sollte daher unverändert bleiben. In einer Autophosphorylierungsreaktion zeigte D1120 erwartungsgemäß keinerlei Aktivität (Keßler 1998). Da die Affinitäten einer inaktiven Kinase, die noch ATP zu binden vermag, zu ihrem aktiven Gegenstück bis dato unbekannt waren, wurden für kinetische Untersuchungen die D1120A und die K1018A als Substrate der aktiven Δ CT eingesetzt. Die inaktiven Kinasen ließen sich in der SDS-PAGE aufgrund der 8 kDa Größenunterschied leicht von der Δ CT separieren. Für die K1018 wurden bereits kinetische Konstanten als Substrat einer um eine Histidin-Markierung verlängerten IRKD (IRKD-HIS) ermittelt; dabei wurde ein K_M von 2,5 μ M und ein V_{MAX} von 150 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ bestimmt, woraus sich ein k_{cat} von 6,6 min^{-1} ergab (Tennagels 1998).

0,12-6,5 μ M D1120A bzw. K1018A wurden durch Δ CT für 30 Sekunden phosphoryliert. Der Versuch wurde mit Δ CT-Konzentrationen von 0,45 und 1 μ M durchgeführt. Um Inhibitionseffekte der Δ CT auszuschließen, wurde die Kinase für 5 Minuten unter Standardbedingungen vorphosphoryliert. Dann erfolgte die Zugabe des inaktiven Kinase zu entsprechenden Endkonzentration. Nach Beendigung der Reaktionen durch Zugabe von SDS-Probenpuffer und folgender SDS-PAGE wurden die phosphorylierten Banden aus dem Gel ausgeschnitten und im β -Counter analysiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Hyper (8.5; 10.10). Die gewonnenen Werte wurden gemittelt und sind in Tab. 9 aufgelistet, Abb. 44 zeigt exemplarische Auswertungen nach Lineweaver-Burk.

Tab. 9 Kinetische Konstanten inaktiver Kinasen als Substrat der Δ CT. Mittelwerte aus mehreren Messungen und Standardabweichungen.

Substrat	K_M (μ M)	V_{MAX} ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	k_{cat} (min^{-1})
D1120A	1,25 \pm 0,25	218 \pm 71	8,3 \pm 2,7
K1018A	1,23 \pm 0,27	216 \pm 118	8,2 \pm 4,5

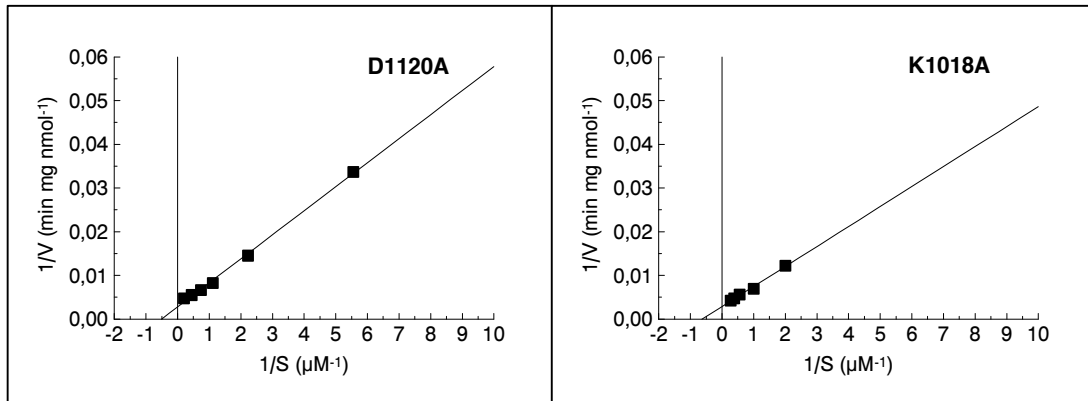


Abb. 44 Repräsentative graphische Auswertung der K_M -Bestimmung der D1120A und der K1018A nach Lineweaver-Burk.

Beide kinaseinaktiven Varianten verhalten sich als Substrate der Kinase Δ CT völlig identisch. Die Fähigkeit der D1120A, ATP binden und damit möglicherweise mit der aktiven Kinase um ATP kompetieren zu können, hatte weder auf die Affinität noch auf die Geschwindigkeit der Phosphorylierungsreaktion Auswirkungen. Offensichtlich führte eine ATP-Bindung nicht zu solchen Konformationsänderungen, die den kinetischen Ablauf der Autophosphorylierungsreaktion modulieren könnten. Gestützt wird diese These durch CD-spektroskopischen Untersuchungen (Keßler 1998). Danach unterliegt die IRKD Konformationsänderungen, die vor allem durch Metallionen (Mg^{2+} , Mn^{2+}) induziert werden konnten. ATP führte nur in Zusammenwirken mit Ionen zu meßbaren Veränderungen der Konformation, die sich in einer signifikanten Verringerung der α -helicalen Strukturen manifestierten.

Leichte Unterschiede zeigten sich im Vergleich der K1018A, wenn diese als Substrat der Δ CT oder der IRKD-HIS vorlag. Der K_M -Wert lag niedriger und die Maximalgeschwindigkeit höher, wenn die Δ CT der Katalysator war. Diese Beobachtung wird unterstrichen von der Tatsache, daß D1120A und K1018A klassische Michelis-Menten-Kinetiken zeigten, wenn sie als Substrate der Δ CT fungierten. Hingegen wurde für die K1018 als Substrat der IRKD-HIS eine sigmoidale Kurve ermittelt, was auf eine allosterische Regulation deutet (Tennagels 1998).

8.6.2 Serinphosphorylierung der D1120A

Es stellte sich die Frage, ob die kinaseinaktive D1120A durch die Δ CT auch an Serinresten phosphoryliert werden kann. Damit könnte entschieden werden, ob die Serinreste prinzipiell in trans für das aktive Enzym erreichbar sind, oder ob dieser Prozeß einem ausschließlichen cis-Mechanismus unterliegt. Dazu wurde 1 μ M D1120A durch 1 μ M Δ CT für 30 Minuten unter Standardbedingungen phosphoryliert. Die mittels SDS-PAGE getrennten Proben wurden aus dem Gel ausgeschnitten und im β -Counter quantifiziert. Für eine Phosphoaminosäure-Analyse und eine Phosphopeptid-Kartierung wurden die Kinasen tryptisch eluiert und im ersten Fall sauer hydrolysiert und durch Dünnschichtchromatographie analysiert.

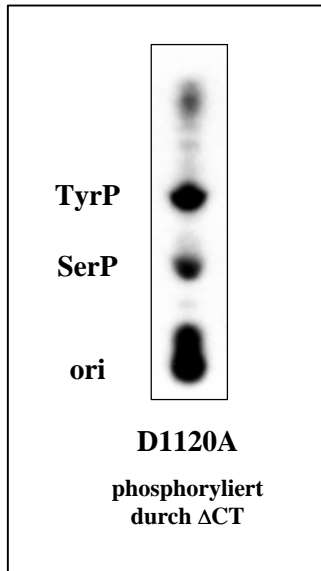


Abb. 45 Phosphoaminosäure-Analyse der kinaseinaktiven D1120A. Diese wurde als Substrat der Δ CT für 30 Minuten im Verhältnis 1:1 unter Standardbedingungen phosphoryliert. Die Analyse der Phosphoaminosäuren erfolgte wie in 4.1.

Für den Phosphateinbau ergaben sich 2,8 mol/mol für die Δ CT und 2,1 mol/mol für die D1120A. Während davon bei der Δ CT 0,1 mol/mol auf Serinreste entfielen, waren es bei der D1120A 0,45 mol/mol (21 %; Abb. 45). Der prozentuale Anteil an Serinphosphorylierung ist nahe dem der Wildtypkinase nach der Autophosphorylierung. Die Phosphopeptid-Kartierung der D1120A (Abb. 46) ließ ein Elutionsprofil erkennen, daß einer autophosphorylierten IRKD gleicht. Neben mono-, bis- und trisphosphorylierter Form der Hauptdomäne sind die Bis-Form des C-Terminus sowie die beiden Serinphosphorylierungsstellen nachweisbar. Damit wurde gezeigt, daß bei der D1120A neben den bekannten Tyrosinphosphorylierungsstellen auch die Serine 1275 und 1309 besetzt werden können. Dies deckt sich mit Untersuchungen von Tennagels (1998), der die Phosphorylierung der Serine 1275 und 1309 bei der kinaseinaktiven Form K1018A durch die aktive Insulinrezeptorkinase IRKD-HIS belegen konnte; der Phosphoserinanteil der K1018A lag ebenfalls bei rund 20 %. Auch bei der D1120A können folglich alle Autophosphorylierungsstellen in trans phosphoryliert werden. Für diesen Vorgang ist eine C-terminal verkürzte aktive Insulinrezeptorkinase ausreichend.

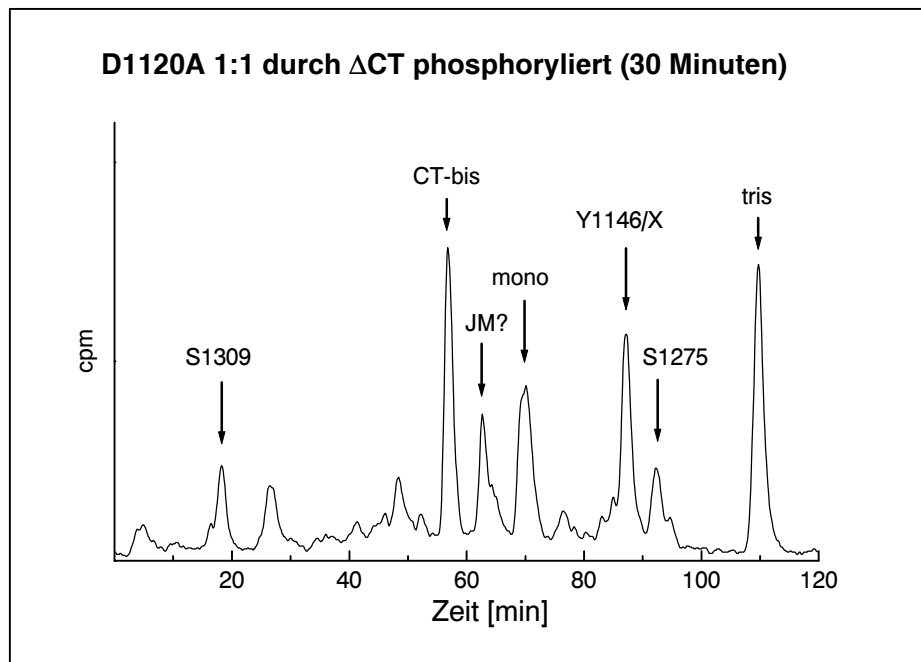


Abb. 46 Phosphopeptid-Kartierung der D1120A. Phosphorylierungsbedingungen wie in Abb. 45. JM: Juxtamembrandomäne.



9 Diskussion

9.1 Generierung, Expression und Reinigung der Kinasen

Ziel dieser Arbeit war es, die duale Aktivität der Insulinrezeptorkinase zu ergründen. Dazu wurden mehrere mutierte lösliche Kinasen konstruiert, welche mit Hilfe des Baculovirus-Systems exprimiert sowie biochemisch charakterisiert wurden. Die Mutagenese erfolgte mit dem QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene (10.2). Die eingeführten Mutationen wurden durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung verifiziert. Bei der Expression der rekombinanten Kinasen im Baculovirus-System konnten alle Konstrukte immunologisch mit Antikörpern gegen den C-Terminus und den Juxtamembranbereich des Insulinrezeptors nachgewiesen werden (3.2). Die optimale Expressiondauer wurde mit 55-65 Stunden bestimmt. Bei der anschließenden Aufarbeitung der Zellextrakte zeigte sich, daß die Mutante CHH bei der Ultrazentrifugation präzipitierte. Dieses Phänomen wurde auch bei einer anderen IRKD-Mutante beobachtet (IRKD-W1188S, Gerold 1995). Die Reste C1044H1045H1046 befinden sich in der Schleife zwischen der Helix α C und dem Faltblatt β 4 in der Nähe des katalytischen Zentrums; es ist zu vermuten, daß die Tripelsubstitution zu einer Konformationsänderung des Enzyms führte. Die übrigen IRKD-Konstrukte ließen sich mit dem beschriebenen Protokoll aufarbeiten und reinigen.

Zur Reinigung wurde ein etabliertes Protokoll (10.3.2), angelehnt an Villalba *et al.* (1989) und Al-Hasani (1995), auf eine Chromatographieranlage von Bio-Rad übertragen. Dieses Gerät erlaubt höhere Flußraten als ein FPLC-Gerät und damit eine schnellere und schonendere Reinigung des Enzyms. Die Chromatographiesäulen wurden bei 20 °C betrieben, da so eine verbesserte Auflösung gegenüber niedrigeren Temperaturen erzielt werden konnte. Weiterhin wurden die Flußrate und der Salzgradient auf den bestmöglichen Kompromiß zwischen Trennleistung und Zeitersparnis hin optimiert. Dadurch konnte auf eine Ammoniumsulfatfällung nach dem ersten Chromatographieschritt verzichtet werden. Nach dem zweiten Chromatographieschritt konnten zwei „Pools“ gereinigter Kinase unterschieden werden, wobei der erste „Pool“ eine höhere Reinheit aufwies. Im zweiten „Pool“, der bei niedrigeren Salzkonzentrationen eluierte, konnte eine Proteinbande nachgewiesen werden, die mit einem Antikörper gegen den Juxtamembranbereich des Insulinrezeptors reagierte. Es ist zu vermuten, daß es sich bei diesem Protein um ein Abbruchfragment der Insulinrezeptorkinase handelt, die C-terminal verkürzt ist. In Autophosphorylierungs-Experimenten wurde diese Bande nur schwach phosphoryliert (< 5 % im Vergleich zur intakten Kinase; Daten nicht gezeigt). Die zur Homogenität gereinigten Kinasen wiesen unter Berücksichtigung der Färbemethodik eine Reinheit von über 90 % auf (3.3). Die durchschnittliche Ausbeute von 0,6 mg hochreiner Kinase aus 2×10^8 infizierten Zellen (entsprechend 10-30 %

Ausbeute aus 2-6 mg vorhandener Kinase) liegt im Rahmen der beschriebenen Ausbeuten von 0,3-0,75 mg (Al-Hasani 1995, Tennagels 1998).

9.2 Auswirkungen der Substitutionen

9.2.1 Kinasedomäne

In der Kinasedomäne wurden die drei Tyrosine 1146, 1150 und 1151 jeweils gegen Phenylalanin ausgetauscht und die rekombinanten, monosubstituierten Proteine charakterisiert. In Autophosphorylierungsreaktionen wurden im Vergleich zum Wildtyp verringerte Phosphat-Inkorporationen und Initialgeschwindigkeiten festgestellt (4.1). Am stärksten war dieser Effekt bei 46F und 50F ausgeprägt, während die Substitution des Y1151 die geringsten Auswirkungen zeigte. Keines der Tyrosine war essentiell für die Autophosphorylierung der anderen. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch von anderen Autoren beschrieben (Zhang *et al.*, 1991; Wilden *et al.*, 1992a; Tavaré und Dickens, 1992; Dickens und Tavaré, 1992; Rafaeloff *et al.*, 1991). Bei der Transferaktivität auf exogene Substrate ergaben sich unterschiedliche Auswirkungen der Mutationen. Die Phosphorylierung des Kopolymers Poly(Glu:Tyr)_{4:1} (8.1) erfolgte bei allen drei Mutanten mit einer um 30-35 %igen verringerten Rate (IRKD: 257 nmol min⁻¹ mg⁻¹). Auffällig war dabei, daß die 50F länger vorphosphoryliert werden mußte als die anderen Kinasen, um die maximale Transferaktivität zu erreichen. Dies belegt eine wichtige Rolle dieses Aminosäurerests bei der Aktivierung der Kinase. In der Kristallstruktur kompetitiert Y1150 mit Proteinsubstraten um die Bindung im aktiven Zentrum und kann initial nicht in cis phosphoryliert werden (Hubbard *et al.*, 1994). Die Substitution gegen Phenylalanin sollte einen Pseudosubstrat schaffen; dieses sollte ebenfalls die exogene Substratbindung inhibieren, solange die Kinase nicht aktiviert wurde. Daher scheint es plausibel, daß die verlangsamte Aktivierung auf eine verzögerte Phosphorylierung von Y1146 und/oder Y1151 zurückzuführen ist, wodurch die Substratbindungsstelle freigelegt wird. Im Gegensatz zur Phosphorylierung von Poly(Glu:Tyr)_{4:1} wurde der Transfer auf ausgewählte rekombinante Domänen des Insulinrezeptors (GST-JM, GST-Ex20 und GST-CT) und ein rekombinantes Fragment des humanen IRS-1 (GST-IRS1) von den Monosubstitutionen nicht beeinflußt (8.3, 8.4). Dies deutet darauf hin, daß die Anwesenheit aller drei Tyrosine zwar für die schnelle Aktivierung der Kinase notwendig ist, aber nicht für die Phosphorylierung exogener Substrate. In der Literatur ist umstritten, ob alle drei Tyrosine für eine optimale Substratphosphorylierung nötig sind; Monosubstitutionen beeinflussten die Transferaktivität des Rezeptors nur in geringem Maße (Zhang *et al.*, 1991; Wilden *et al.*, 1990, 1992a und b; Murakami und Rosen, 1991; Ellis *et al.*, 1986; Yonezawa und Roth, 1991; White *et al.*, 1988b; Flores-Riveiros *et al.*, 1989; Dickens und Tavaré, 1992; Herrera und Rosen 1986; Tornqvist und Avruch, 1988). Dementsprechend ist umstritten, ob für die maximale Aktivierung des Insulinrezeptors

die bis- oder die trisphosphorylierte Kinasedomäne nötig ist (White und Kahn, 1989; Zhang *et al.*, 1991; Obermaier-Kusser *et al.*, 1989; Wei *et al.*, 1995).

Die IRKD autophosphorylierte sich an den Serinresten 1275 und 1309 (Al-Hasani *et al.*, 1997). Die Mutanten 46F und 50F zeigten keine Beeinträchtigung dieser Aktivität. Lediglich eine im Vergleich zum Wildtyp verzögert einsetzende Serinphosphorylierung konnte verzeichnet werden, was vermutlich auf die insgesamt verlangsamte Autophosphorylierung zurückzuführen ist (4.1, Tab. 2). In der Literatur wird berichtet, daß die Substitution Y1150F *in vivo* und *in vitro* eine leicht reduzierte Serinphosphorylierung und eine vollständige Inhibition der Threoninphosphorylierung des Insulinrezeptors zur Folge hatte (Tavaré und Dickens, 1991). Der Unterschied zu den in dieser Arbeit erhaltenen Resultaten ist möglicherweise durch die Aktivität exogener Serin-/Threoninkinasen bei Tavaré und Dickens zu begründen, die auch die Threoninphosphorylierung des Insulinrezeptors erklären würde. Die lösliche Insulinrezeptorkinase besaß keine nachweisbare Threoninphosphorylierung (Tennagels 1998).

Die Mutanten zeigten auch in Bezug auf exogene Substrate (GST-CT, GST-IRS1) eine gegenüber dem Wildtyp unveränderte Serinphosphorylierung.

Der Austausch des Y1151 gegen Phenylalanin führte zu einer stark reduzierten Phosphorylierung der Kinase an Serinresten, wobei sowohl der maximale Serinphosphatgehalt als auch der kinetische Verlauf betroffen waren (4.1, 4.2). Während die IRKD 1,3-1,6 mol Serinphosphate/mol Enzym mit einer Geschwindigkeit von 3-4 nmol min⁻¹ mg⁻¹ inkorporierte, betragen die Werte bei 51F 0,4-0,5 mol Serinphosphate/mol Enzym und 0,2-0,3 nmol min⁻¹ mg⁻¹. Feener *et al.* (1993) beobachteten ebenfalls, daß die Serinphosphorylierung des Rezeptors außerhalb der Juxtamembrandomäne auf die Existenz von Y1151 zurückzuführen war. Die Verminderung der Serinautophosphorylierung betraf die C-terminalen Serine 1275 und zu einem geringeren Ausmaß 1309. Dabei war die verminderte Aktivität unabhängig davon, ob die Serinphosphorylierungsstellen auf dem rezeptoreigenen oder einem exogenen C-Terminus lokalisiert waren (4.3.5, 8.3). Eine verringerte Affinität zum Peptid GST-CTphe im Vergleich zu GST-CT als Ursache für die verringerte Phosphorylierung des GST-CTphe durch die 51F kann ausgeschlossen werden, da die Wildtypkinase vergleichbare K_M-Werte für die beide Peptide zeigte (Tennagels 1998). Kinetische Untersuchungen legten dar, daß die 51F verringerte Affinitäten zu seinem C-Terminus als Substrat aufweist (8.5). Der K_M war erhöht und V_{MAX} erniedrigt, so daß offenkundig die kinetisch bevorzugte Tyrosinphosphorylierung des C-Terminus noch stattfinden konnte. Die Serinphosphorylierung hingegen, die auch auf dem rezeptoreigenen C-Terminus verringert war, wurde im Substrat reduziert. Gegen diese Interpretation scheint zu sprechen, daß die Mutante IRKD-YY1316/1322FF gleichfalls eine Verringerung des V_{MAX} (bei unverändertem K_M) gegenüber dem C-Terminus aufwies, dennoch zeigte sie eine normale Serinautophosphorylierung (Tennagels 1998). Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß der Austausch

dieser beiden C-terminalen Tyrosinphosphorylierungsstellen dazu führte, daß der rezeptoreigene C-Terminus sich wie ein Pseudosubstrat verhielt. Dadurch war der Zugang für den exogenen C-Terminus erschwert, was sich in einer verringerten Maximalgeschwindigkeit des Phosphattransfers manifestierte. Y1151 trägt in der Kristallstruktur durch Ausbildung zweier Wasserstoffbrücken maßgeblich zur Ausbildung und Stabilisierung der exponierten Aktivierungsschleife bei (Hubbard 1997). Die Substitution dieses Rests könnte die Konformation der Aktivierungsschleife destabilisieren und so zu einer Veränderung der Affinität zur C-terminalen Domänen führen. Konformationsänderungen der Kinasedomäne nach Autophosphorylierung wurden auch immunologisch belegt (Perlman *et al.*, 1989, Baron *et al.*, 1990 und 1992). Die Serinphosphorylierung anderer Substrate (GST-JM, GST-IRS1) blieb unverändert (8.3, 8.4). Für eine duale Spezifität der IRKD auf Substrate ist Y1151 demnach nicht essentiell.

Keine der Monosubstitutionen hatte einen meßbaren Einfluß auf den ATP-Umsatz der Kinasen. Mit Hilfe von Pulse-Chase- und Pulse-Hot Chase-Experimenten wurde untersucht, inwiefern die Mutationen sich auf die transiente Phosphorylierung der Kinasen auswirken (7.1, 7.2). Dabei ergaben sich keine eindeutigen Aussagen, so daß die IRKD-Konstrukte mit Hilfe der Phosphopeptid-Kartierung analysiert wurden (7.3). Diese belegten, daß 46F vergleichbar dem Wildtyp die C-terminalen Tyrosinreste 1316 und 1322 de- und rephosphoryliert. Dagegen scheinen sowohl Y1150 als auch Y1151 in den Mechanismus der transienten Phosphorylierung involviert zu sein. Beide wiesen eine um 50 % (50F) bzw. fast vollständig verringerte (51F) transiente Phosphorylierung des C-Terminus auf. Stattdessen wurden die verbliebenen Tyrosine der Kinasedomäne de- und rephosphoryliert. Bei 51F könnte man argumentieren, daß auch hier ein verringerte Affinität zum C-Terminus verantwortlich ist. Dies erscheint jedoch fraglich, da für die 50F dem Wildtyp vergleichbare kinetische Daten für den C-Terminus bestimmt werden konnten. Die Mutationen könnten in beiden Fällen eine Konformationsänderung der Aktivierungsschleife hervorrufen, die die De- und Rephosphorylierung beeinträchtigt. Möglicherweise müssen auch beide Tyrosine 1150 und 1151 vorhanden sein, um den C-Terminus transient zu phosphorylieren.

Ungeklärt bleibt die Beobachtung, daß die 50F sowohl initial als auch nach langen Zeiten eine um 50 % gegenüber der IRKD verringerte Rephosphorylierung erkennen ließ (Hot Chase initial: IRKD $\sim 15 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, 50F $\sim 8 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (7.2); Einbau Hot Chase 30 min: IRKD 2 mol/mol, 50F 1 mol/mol (7.1)). Eine Hypothese wäre, daß De- und Rephosphorylierung über verschiedene Reaktionswege verlaufen. Y1150 wäre demnach vor allem am Prozeß der Rephosphorylierung beteiligt. Wie weiter hinten beschrieben wird (9.5.3), könnte Y1150 kontinuierlich de- und rephosphoryliert werden, wobei dieser Vorgang mit dem der transienten Phosphorylierung der C-terminalen Tyrosine gekoppelt sein könnte.

Alle drei Monosubstitutionen verloren im Gegensatz zum Wildtyp auch Radioaktivität an Serinresten (7.4). Die Ursache hierfür ist unbekannt. Eine durch steigende Konzentrationen an ADP induzierte Rückreaktion erscheint unwahrscheinlich, da der ATP-Umsatz der Mutanten gegenüber dem Wildtyp unverändert war.

Bei der transienten Phosphorylierung von IRS-1 ergaben sich keine Unterschiede (8.4). Keines der drei Tyrosine scheint notwendig zu sein für die Dephosphorylierung exogener Substrate.

9.2.2 C-Terminus und Juxtamembrandomäne

Im C-Terminus befinden sich die Autophosphorylierungsstellen Y1316 und Y1322 sowie S1275 und S1309. In der Juxtamembrandomäne wird Y960 autophosphoryliert. Untersucht wurden Kinasen, denen die drei Tyrosinreste fehlen (Y3F), die beiden Serinreste gegen Aspartat substituiert sind (SSDD) sowie zwei Kinasen mit verkürztem C-Terminus (Δ CT, Δ CT*). Während bei der Δ CT sowohl Tyrosin- als auch Serinphosphorylierungsstellen im C-Terminus abwesend sind, ist bei der Δ CT* zusätzlich Y960 eliminiert („Core Kinase“). Die Serinautophosphorylierungsstellen wurden gegen Aspartat substituiert, um phosphorylierte Serine zu imitieren. In allen Fällen waren die drei Tyrosinreste der Kinasedomäne vorhanden.

Durch die fehlenden Tyrosinphosphorylierungsstellen wiesen Y3F und Δ CT/ Δ CT* einen gegenüber dem Wildtyp um 1-2,5 mol/mol verringerten Phosphateinbau auf (4.1). Δ CT/ Δ CT* inkorporierten dabei die gleichen Mengen an Radioaktivität und etwa 0,5 mol/mol weniger als die Y3F. Der Vergleich der Einbauraten der Δ CT zur Δ CT* und zur Y3F legt die Vermutung nahe, daß die Tyrosine im C-Terminus annähernd vollständig besetzt werden, während die Tyrosinphosphorylierung der Juxtamembrandomäne mit einer deutlich geringeren Effizienz stattfindet. Dies wird durch die Analyse der Phosphopeptid-Kartierungen unterstützt (4.3.4). Die Phosphorylierung eines Juxtamembranpeptids führte zur Identifizierung entsprechender Signale in der Kartierung. Das Hauptphosphosignal des möglichen Juxtamembranpeptids ist bei den autophosphorylierten Kinasen deutlich schwächer ausgeprägt als die Phosphorylierung der Tyrosine im C-Terminus. In der Literatur differieren die Phosphorylierungsraten dieses Bereichs von wenigen Prozenten bis zu einem Drittel der Gesamtphosphorylierung; es scheint, daß die Juxtamembranregion vom Holorezeptor stärker phosphoryliert wird als von der löslichen Insulinrezeptorkinase (Tavaré *et al.*, 1988; White *et al.*, 1988b; Tornqvist *et al.*, 1988; Issad *et al.*, 1991; Kayatz 1994; Feener *et al.*, 1993). Es ist zu ergänzen, daß das identifizierte Juxtamembransignal auch bei der Mutante Y3F vorkam, die kein Y960 mehr besitzt. Eine Erklärung liefert der Vergleich der Phosphopeptid-Kartierungen der Δ CT und der Δ CT*, die sich nur durch die Substitution des Y960F unterscheiden. Die Δ CT wies mehr Radioaktivität in dem vermuteten Juxtamembransignal auf als die Δ CT* (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, daß auch der Rest Y953 phosphoryliert

wird. Dieser befindet sich auf demselben tryptischen Peptid wie Y960 und sollte in der Kartierung zu einer identischen Retentionszeit führen. In der Literatur wird von der Autophosphorylierung des Y953 berichtet (Kohanski 1993b).

Der Austausch der beiden Serinautophosphorylierungsstellen bei der SSDD führte zu einer Reduktion der Phosphatinkorporation um 1 mol/mol (4.1, Tab. 2). Rechnerisch bedeutet dies, daß die beiden Reste durchschnittlich mit einer 50 %igen Effizienz besetzt werden. Die Initialgeschwindigkeit dieser Mutante war vergleichbar mit dem Wildtyp, während die Y3F 2fach langsamer war. Dies ist auf das Fehlen der C-terminalen Tyrosinreste zurückzuführen, die initial sehr schnell phosphoryliert werden und so erheblich zu der Initialgeschwindigkeit beitragen (4.1, 4.3.3). Der Verlust des C-Terminus führte zu einer dramatischen Verringerung der Initialgeschwindigkeit. Dieses Ergebnis war die Folge der fehlenden Aktivierung durch Poly-L-Lysin; ohne Polykation war die $\Delta CT/\Delta CT^*$ vergleichbar mit der Wildtypkinase (Wieber 1998).

Die Transferleistung der SSDD war auf Poly(Glu:Tyr)_{4:1}, Peptide des Insulinrezeptors (GST-CT, GST-CTphe, GST-JM) und GST-IRS1 übereinstimmend mit denen der IRKD (8). Dies spricht gegen die Hypothese, daß die Serinphosphorylierung des Rezeptors dessen Transferaktivität unmittelbar inhibiert. Auch die Y3F besaß die Fähigkeit, GST-IRS1 an Tyrosin- und Serinresten zu phosphorylieren (8.4). Die Mutante IRKD-YY1316/1322FF, die der Y3F ähnelt, zeigte bei gleichen Affinitäten wie die IRKD verringerte V_{MAX} -Werte zu den Peptiden mit dem C-Terminus (GST-CT) und der Kinasedomäne (GST-Ex20) (Tennagels 1998). Beim Austausch der Tyrosine 1316 und 1322 scheint der C-Terminus als Pseudosubstrat zu wirken und besetzt möglicherweise kontinuierlich das aktive Zentrum. In der Literatur wird beschrieben, daß in einigen Fällen mitogene Signalwege durch Substitution oder Deletion aktiviert wurden, während sich die Substratphosphorylierung kaum veränderte (Maegawa *et al.*, 1988; Thies *et al.*, 1989; Yamamoto-Honda, 1993; Myers *et al.*, 1991; Takata *et al.*, 1991 und 1992; Ando *et al.*, 1992). Der Verlust des C-Terminus bei der ΔCT^* führte zu einer veränderten Transferaktivität (8.1). Da die ΔCT^* eine verzögerte Autophosphorylierung zeigte, mußte diese Mutante länger phosphoryliert werden, um die maximale Aktivierung zu erreichen. Dies spiegelte sich auch bei der Substratphosphorylierung wider. Beim Phosphattransfer auf Poly(Glu:Tyr)_{4:1} wurde die höchste Aktivität nach 5 Minuten Vorphosphorylierung gemessen und wies eine 60 %ige Reduktion gegenüber der IRKD auf. Erstaunlicherweise wurde der Transfer nach langen Vorphosphorylierungszeiten nicht inhibiert: Während sich die Transferaktivität der IRKD von maximal 257 auf 25 nmol min⁻¹ mg⁻¹ nach 30 Minuten Vorphosphorylierung verringerte, blieb ΔCT^* mit 100 nmol min⁻¹ mg⁻¹ konstant (Tab. 5). Die C-terminale Domäne scheint nicht nur bei der Kinase-Aktivierung, sondern auch bei der Abschaltung der Kinase in Bezug auf die Substratphosphorylierung eine entscheidende Rolle zu spielen. Die ΔCT^* phosphorylierte GST-IRS1 nur mit verminderter Aktivität an Serinresten (Wieber 1998), doch sind weitere Untersuchungen zu dieser Frage nötig.

Die SSDD zeigte trotz Verlust der Serine 1275 und 1309 noch eine Serinphosphorylierung, deren Anteil etwa 25 % der des Wildtyps ausmachte (4.1, 4.2). Die Initialgeschwindigkeit dieser Serinphosphorylierung lag mit $0,3-0,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ um eine Größenordnung niedriger als bei der IRKD und damit auf vergleichbarer Höhe wie die der 51F. Die Phosphopeptid-Kartierung belegte den Verlust der Serinphosphorylierungsstellen und gab Hinweise auf die Phosphorylierung weiterer Serinreste (4.3.5). Dazu sind die Serine 1293/1294 im C-Terminus und 994 in der Juxtamembrandomäne zu zählen, deren Phosphorylierung in der Literatur beschrieben wurde (Lewis *et al.*, 1990a; Strack *et al.*, 1997). Die Serinreste 1293/1294 liegen nach tryptischer Spaltung auf dem Peptid SSHCQR, welches nach einfacher Phosphorylierung eine Nettoladung von 0 (pH 7) aufweisen und in der Phosphopeptid-Kartierung sehr früh eluieren sollte. Im Durchlauf wurde ein Signal mit 74 % Serinphosphat identifiziert, welches sowohl bei der Wildtypkinase als auch bei SSDD nachgewiesen werden konnte. Da die $\Delta\text{CT}/\Delta\text{CT}^*$ dieses Signal nicht besaß, könnte es die phosphorylierten Serinreste 1294/1294 repräsentieren. Untermuert wird dies durch die Beobachtung, daß die $\Delta\text{CT}/\Delta\text{CT}^*$ einen geringeren Anteil an Serinphosphat als die SSDD aufwies, die zusätzliche Serinphosphorylierung folglich im C-Terminus lokalisiert sein muß.

Das Peptid mit der Juxtamembrandomäne konnte ebenfalls an Serinresten phosphoryliert werden (8.3). Dies steht in Übereinstimmung mit der Literatur, die von einer Serinphosphorylierung dieses Bereichs berichtet (Feener *et al.*, 1993). In der Kartierung konnte ein Signal mit 50 % Serinphosphatanteil bestimmt werden (Abb. 39). Da die tyrosinphosphorylierten Hauptsignale einem einzigen Peptid zugeordnet werden können (QPDGPLGPLYASSNPEY*LSASDVFPCSVYVPDEWEVSR in der IRKD bzw. GIHGPLGPL·R im GST-JM; *Y960), verbleibt ein Peptid mit dem Serinrest 994* (ELGQGS*FGMVYEGNAR). Dieses hätte nach Phosphorylierung eine Nettoladung von -3 und sollte eine mittlere Retentionszeit besitzen. Dementsprechend könnte das identifizierte Phosphopeptid diesem Fragment entsprechen. S994 befindet sich in der glycinreichen Schleife (GQGS*FG) und ist in die ATP-Bindung involviert (Hubbard 1997). Ungewöhnlich ist, daß der Serinrest fast ausschließlich bei der Insulinrezeptor-Familie konserviert ist (Hanks und Hunter, 1995). Dies prädestiniert ihn für eine regulatorische Funktion. Denkbar wäre, daß durch die Phosphorylierung von S994 die ATP-Bindung geschwächt und eine Inhibition des Insulinsignal vermittelt würde. Wenn auch unwahrscheinlich, ist es nicht völlig auszuschließen, daß eine ungewöhnliche Spaltung des Trypsins ein verkürztes Fragment des Hauptsignals schaffen könnte. Auf diesem befinden sich die potentielle Serinphosphorylierungsstellen 955/956 (Liu und Roth, 1994c), die ebenfalls das beobachtete Signal erzeugen könnten. In der Phosphopeptid-Kartierung ist zu erkennen, daß die Fusionsproteine der Insulinrezeptor-Domänen an denselben Stellen wie die IRKD phosphoryliert werden (8.3; Tennagels 1998). Da das Phosphoserinpeptid der Juxtamembranregion sehr klein im Vergleich zu den ausgeprägten

Signalen der Tyrosinphosphorylierungsstellen ist, kann es im Elutionsprofil der IRKD nicht nachgewiesen werden.

Die Y3F zeigte eine dem Wildtyp vergleichbare Serinphosphorylierung (4.1, 4.2). Dies ist umso interessanter, als daß die IRKD auch ein C-terminales Peptid (GST-CTphe) ohne die Tyrosine 1316 und 1322 an den Serinresten 1275 und 1309 phosphoryliert konnte, ohne daß die Kinetik verändert war (Tennagels 1998). Die Phosphorylierung der C-terminalen Tyrosine ist somit keine Voraussetzung für die Besetzung der Serinreste.

Bei der SSDD wurde eine gegenüber dem Wildtyp um 30 % verringerte Halbwertszeit der Phosphorylierung ermittelt (6 s gegenüber 9 s der IRKD, 4.1). Dies war durch die schnelle Besetzung der Tyrosine 1316 und 1322 bedingt, wie die Phosphopeptid-Kartierung belegte (4.3.4). Im Gel der SDS-PAGE migrierte die SSDD in einer distinkten Bande, die annähernd der oberen Bande der IRKD entsprach; die Y3F hingegen wies nur die untere Bande auf (4.1, Abb. 6). Tyrosinphosphorylierung der Kinase führte zu einer apparenten Erhöhung des Molekulargewichts nach SDS-PAGE von 48 auf 51 kDa (Nölle 1995; Herrera *et al.*, 1988; Tennagels 1995), erklärt jedoch nicht die Kinasebande mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa. Diese könnte durch das Vorhandensein mehrerer negativer Ladungen infolge Tyrosin- und Serinphosphorylierung in der C-terminalen Domäne oder eine Konformationsänderung der Kinase hervorgerufen sein, an der der C-Terminus beteiligt ist. In beiden Fällen könnten Konformationsisomere entstehen, deren Fähigkeit zur SDS-Bindung reduziert ist und die dementsprechend eine apparente Molekulargewichtserhöhung aufweisen. In der Phosphopeptid-Kartierung der beiden Banden war als einziger Unterschied eine erhöhte Phosphorylierung des S1309 erkennbar (Nölle 1995). Gleichwohl kann dies nicht ausreichend sein, da die Mutante Y3F, die die Serine 1275 und 1309 besetzt, nur die untere Bande aufwies. Die SSDD besaß einen höheren K_M zum C-terminalen Peptid (GST-CT) besaß als der Wildtyp (8.5), was für eine Konformationsänderung der SSDD spricht. Durch einen erhöhten V_{MAX} ergab sich netto aber eine vergleichbare Transferleistung. Wahrscheinlich müssen Tyrosin- und Serinphosphorylierung im C-Terminus zusammenkommen, um die apparente Molekulargewichtsveränderung und möglicherweise eine Konformationsänderung auszulösen.

Die Kinasen SSDD und Y3F zeigten beim ATP-Umsatz keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp (6.4). Unter Pulse-Chase-Bedingungen zeigte die SSDD als auch die Y3F eine transiente Phosphorylierung, die prozentual mit der der IRKD übereinstimmt (7.1). Da die Y3F nicht die transienten Tyrosinreste 1316 und 1322 besitzt, mußten andere Stellen de- und rephosphoryliert worden sein. Mit Hilfe der Phosphopeptid-Kartierung konnten unter Chase-Bedingungen die Tyrosine der Kinasedomäne identifiziert werden (7.3). Demgegenüber steht die Analyse der Hot Chase-Reaktion, nach der keine Phosphorylierungsstelle durch eine signifikante Rephosphorylierung gekennzeichnet war. Diese widersprüchlichen Ergebnisse lassen sich durch die unterschiedlichen

ATP-Konzentrationen der Chase- und der Hot Chase-Reaktionen erklären. Unter Chase-Bedingungen wird die Konzentration des ATP um das 10fache erhöht; dies führt zur Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts in Richtung Phosphoenzym und ADP. Hingegen findet unter Hot Chase-Bedingungen keine Änderung der ATP-Konzentration statt. Es scheint daher plausibel, daß die transiente Phosphorylierung der Y3F unter Chase-Bedingungen durch hohe ATP-Konzentrationen bedingt ist; unter Hot Chase-Bedingungen findet eine unspezifische De- und Rephosphorylierung statt.

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang der Vergleich zur Δ CT (7.3, Abb. 31). Unter Chase-Bedingungen war gleichermaßen eine Dephosphorylierung der Tyrosine der Kinasedomäne nachweisbar. Im Gegensatz zur Y3F war dies aber auch in der Hot Chase-Reaktion zu erkennen. Auf dem C-Terminus befinden sich offenbar Sequenz- oder Strukturelemente, die die transiente Phosphorylierung modulieren können. Denkbar ist, daß die C-terminale Domäne bei der Y3F als Pseudosubstrat mit den Tyrosinen der Kinasedomäne um die Rephosphorylierung konkurriert, so daß diese nur schlecht besetzt werden. Bei Abwesenheit der C-terminalen Domäne erfolgt dementsprechend eine verstärkte transiente Phosphorylierung der Kinasedomäne. Eine weitere Erklärung wäre, daß die phosphorylierten Serinreste 1275 und 1309 bei der Y3F die transiente Phosphorylierung inhibieren. Da diese vergleichsweise langsam besetzt werden, stehen sie in der Chase- und Hot Chase-Reaktion partiell als Phosphorylierungsstellen zur Verfügung. Bei der Δ CT sind die Serinreste nicht vorhanden. Der potentielle Einfluß der C-terminalen Serinreste wird durch die Feststellung gestützt, daß die Y3F in der Chase-Reaktion in demselben Maße wie die Mutanten der Kinasedomäne Radioaktivität in den Serinresten verlor. Dieser Ausbau konnte bei der Δ CT nicht beobachtet werden, was darauf hindeutet, daß die dephosphorylierten Serinreste im C-Terminus lokalisiert sind.

Y3F und SSDD besaßen beide die Fähigkeit, GST-IRS1 in vergleichbarem Maße wie der Wildtyp zu dephosphorylieren (8.4). Transiente Phosphorylierungsstellen können sich demzufolge auch auf dem Substrat befinden und werden von einer aktiven Kinase ohne transiente Phosphorylierungsstellen bedient. Vermutlich ist primär die Existenz transienter Phosphorylierungsstellen ausschlaggebend und nicht deren Lokalisierung. Auch die Δ CT* war in der Lage, GST-IRS1 zu dephosphorylieren, wenn auch mit einer geringfügig verringerten Effizienz (Wieber 1998). Die für die transiente Phosphorylierung des Substrats verantwortlichen Elemente stammen folglich außerhalb des C-Terminus her. Auffällig erschien, daß die SSDD die Serinreste von GST-IRS1 nur um 35-40 % (IRKD und IRKD-Konstrukte: 61-73 %) dephosphorylierte (Abb. 41 B). Die Ursache hierfür ist ungeklärt. Wie oben dargelegt, führt die durch die Aspartatreste imitierte Serinphosphorylierung der Kinase möglicherweise zu einer Konformationsänderung der Kinase. Fraglich bleibt aber, warum der Wildtyp, der dieser Konformationsänderung nach Serinphosphorylierung ebenfalls unterliegen sollte, sich von der SSDD unterscheidet. Es ist vorstellbar, daß sich die Konformationsänderung der IRKD

im untersuchten Zeitraum nur bei einem Teil der Moleküle ereignet hat, worauf die beiden Kinasebanden der SDS-PAGE hindeuten. Die SSDD hingegen migrierte bereits nach wenigen Sekunden Autophosphorylierung in einer distinkten Bande.

9.2.3 Phosphatase-ähnliche Motive

Die ATPase- oder Phosphatase-Aktivität der IRKD könnte auf einen oder mehrere aktive Reste in Phosphatase-ähnlichen Motiven zurückzuführen sein. Der Insulinrezeptor besitzt zwei solche Motive zu Beginn der Kinasedomäne und im C-Terminus. Die Kinasen CHH und CS sollten daher Aufschluß über eine Beteiligung einer oder mehrerer dieser Reste geben. In Tyrosinphosphatasen erfolgt der katalytische Mechanismus über die Ausbildung eines Phosphocystein-Intermediats (Zhang und Dixon, 1994). Denkbar wäre auch ein über ein Phosphohistidin verlaufender Reaktionsmechanismus, vergleichbar den bakteriellen Phosphotransferase-Systemen (Egger *et al.*, 1997; Appleby *et al.*, 1996) und der Phospholipase D-Superfamilie (Gottlin *et al.*, 1998). Es gibt Hinweise, daß Tyrosinphosphorylierung den pK_a -Wert von Histidinen sowohl in Peptiden des Insulinrezeptors als auch in der löslichen Kinase erhöht (Chavanieu *et al.*, 1994).

Die Substitution von C1044H1045H1046 führte zu einem hohen Verlust an Enzym während der Aufreinigung. Möglicherweise wurde auf Grund der Lokalisation der Reste (vgl. 9.1) eine Konformationsänderung induziert, die zur Präzipitation der Kinase führte. Eine Charakterisierung und Bestimmung des Einflusses dieser Aminosäurereste war daher nicht möglich. Das C-terminale Cystein 1296 wies eine außergewöhnlich hohe Reaktivität auf (Goder 1995). Der Austausch C1296S änderte indes weder die Autophosphorylierung der Kinase noch die Fähigkeit zur Serinphosphorylierung (4.1, 4.2). Allenfalls eine geringfügig erniedrigte Initialgeschwindigkeit wurde beobachtet, die durch eine langsamere Besetzung der C-terminalen Tyrosine bedingt war (4.3.4). Die Phosphorylierung des neu geschaffenen S1296 ist im Hintergrund der Signale von S1275 und S1309 schwer analysierbar (Nölle 1995); sie scheint jedoch unwahrscheinlich, da die Substitution C1296T weder in der Kinase (IRKD-C1296T) noch im entsprechenden C-terminalen Peptid (GST-CT-C1296T) zu einer nachweisbaren Threoninphosphorylierung führte (Behle 1997). Unter Pulse-Chase-Bedingungen verhielt sich CS wie der Wildtyp, so daß ausgeschlossen werden kann, daß C1296 einen direkten Einfluß auf die transiente Phosphorylierung ausübt.

Phosphocysteine und Phosphohistidine sind nur schwer nachzuweisen, da sie instabil sind. Da Phosphohistidin im alkalischen Milieu eine vergleichsweise hohe Stabilität besitzt, wurde die unter Standardbedingungen autophosphorylierte IRKD einer alkalischen Hydrolyse (10.7.2) unterzogen. Bei einem pH von 14 wird die Phosphomonoesterbindung des Phosphoserins hydrolysiert, so daß in der sich anschließenden Dünnschichtchromatographie nur Tyrosinphosphat nachgewiesen wurde. Es ergaben sich dabei keine Hinweise auf andere Phosphoaminosäuren. Es ist allerdings fraglich, ob

die Methodik der Dünnschichtchromatographie ausreichend zum Nachweis von Histidin- oder Cysteinphosphaten ist. Ein zukünftiger Ansatz ist die Trennung der Phosphoaminosäuren mittels HPLC (Yan *et al.*, 1998). Dabei erscheint H1118 ein potentieller Kandidat zu sein, der in den katalytischen Mechanismus involviert sein könnte. Dieser Rest befindet sich in unmittelbarer Nähe zur katalytischen Base und ist in der Familie der Tyrosinkinase hochkonserviert; er findet sich zudem bei vielen Serin-/Threoninkinasen, ist dort aber teilweise gegen Tyrosin substituiert (Hanks und Hunter, 1995).

Ein weiterer Versuch, aktive Histidine der IRKD aufzufindig zu machen, erfolgte durch spektrometrische Messungen mit dem Phosphatdonor 2-Methoxybenzoylphosphat (2-MBP; 10.9). 2-MBP ist ein aromatisches Acylphosphat, das Phosphatasen und Histidinkinase als Substrat dienen kann (Paoli P. *et al.*, 1995; Schuster, persönliche Mitteilung). Die Hydrolyse von 2-MBP kann spektrometrisch verfolgt werden. Wenn bei der Insulinrezeptorkinase Histidine in den Mechanismus der Autophosphorylierung involviert sind, könnte das Enzym statt ATP auch 2-MBP als Phosphatdonor akzeptieren und hydrolysieren. Allerdings ist nicht bekannt, ob 2-MBP von der IRKD als Phosphatdonor akzeptiert wird. Während alkalische Phosphatase 2-MBP rasch umsetzte, war bei der IRKD unabhängig von der Gegenwart von ATP keine Hydrolyse von 2-MBP erkennbar (Daten nicht gezeigt).

9.2.4 Essentielle Reste (tote Kinasen)

Die Substitution essentieller Aminosäuren führte bei der Insulinrezeptorkinase zu inaktiven Enzymen (Chou *et al.*, 1987; McClain *et al.*, 1987; Al-Hasani *et al.*, 1997; Tennagels 1998). Üblicherweise wird dazu das für die ATP-Bindung invariante Lysin ausgetauscht, wodurch die Autophosphorylierung und damit die Aktivierung verhindert wird. Von Untersuchungen an Tyrosinphosphatasen ist aber bekannt, daß der Austausch essentieller Reste die Interaktionen zu Substraten schwächt. Als in dieser Hinsicht optimal für ein inaktives Enzym, das wie eine „Substratfalle“ wirkte, erwies sich der Austausch der katalytischen Säure (Flint *et al.*, 1997). Auf die Insulinrezeptorkinase übertragen, sollte der Austausch der katalytischen Base D1120 ein inaktives Enzym erzeugen, das noch ATP binden kann, auf dieser Reaktionsstufe aber „eingefroren“ wird (Keßler 1998). Ein solcher Zustand erscheint ideal für Untersuchungen des Reaktionsmechanismus der IRKD und bietet sich an für die Kristallstruktur einer inaktiven Kinase, die ATP gebunden hat. Eine über einen GST-Anteil dimerisierte IRKD-D1120A sollte dabei Aufschluß über cis-/trans-Prozesse geben. In der Literatur findet sich erstaunlicherweise keine Beschreibungen einer Insulinrezeptorkinase, der die katalytische Base fehlt.

Eine Autophosphorylierung bestätigte, daß die Substitution D1120A ein inaktives Enzym erzeugte. Die Affinität der D1120A zu einer aktiven Insulinrezeptorkinase lag im mikromolaren Bereich und unterschied sich nicht von der der K1018A (8.6.1). Die ATP-Bindung führt offenkundig zu keiner derartigen Konformationsänderung, als daß

die Interaktion zwischen der D1120 und aktiver Kinase verändert wäre. Veränderungen der Konformation scheinen eher durch Metallionen ausgelöst zu werden (Keßler 1998). Unterschiede ergaben sich aber in der Art der Kinetik, mit der die inaktiven Enzyme durch eine aktive Kinase unter stöchiometrischen Verhältnissen phosphoryliert wurden. K1018 wurde mit einer zeitlichen Verzögerung phosphoryliert, wodurch sich ein sigmoidaler Verlauf der Phosphatinkorporation in K1018A ergab (Tennagels 1998). Die D1120 zeigte eine Michaelis-Menten-Kinetik und erreichte eine Initialgeschwindigkeit des Phosphateinbaus, die vergleichbar der des aktiven Enzyms war; die aktive Kinase wurde dabei nicht durch die D1120A inhibiert (Keßler 1998). Die Art und Höhe der Phosphopeptide der aktiven Kinase waren dabei bis auf eine erhöhte monophosphorylierte Form der Kinasedomäne identisch mit denen einer autophosphorylierten Kinase (Daten nicht gezeigt). Der Austausch der katalytischen Base führte somit zu einer inaktiven Kinase, die ein „perfektes Substrat“ der Insulinrezeptorkinase darstellte.

Die kinaseinaktive K1018A konnte an allen bekannten Tyrosin- und Serinautophosphorylierungsstellen besetzt werden, wenn sie unter stöchiometrischen Bedingungen von einer aktiven Kinase phosphoryliert wurde (Tennagels 1998). Für die D1120A konnte dasselbe Resultat nachgewiesen werden; auch hier waren alle Stellen inklusive der Serinreste 1275 und 1309 in trans erreichbar (8.6.2). Dies bedeutet nicht, daß alle Phosphorylierungsstellen der Kinase bei der Autophosphorylierung der IRKD in trans besetzt werden müssen, doch kann ein exklusiver cis-Mechanismus verworfen werden. Für die initiale Autophosphorylierung müssen ATP-Bindung und katalytische Base auf einer Untereinheit intakt sein. Dies konnte durch eine Autophosphorylierung der K1018A und der D1120A gezeigt werden; ein gemischter Ansatz beider Enzyme führte zu keiner meßbaren Phosphatinkorporation (Daten nicht gezeigt).

9.3 Initiale Aktivierung der Insulinrezeptorkinase

9.3.1 Phosphorylierung unter äquimolaren ATP-Bedingungen

Um Details über den Mechanismus der initialen Autophosphorylierungsreaktion zu gewinnen, wurden Kurzzeitphosphorylierungen unter verlangsamten Reaktionsbedingungen durchgeführt („single turnover“). Durch Herabsetzen der ATP-Konzentration auf äquimolare Mengen zur Kinase konnte die Initialgeschwindigkeit der Reaktion um zwei bis drei Größenordnungen gesenkt werden (5.2). Unter diesen Bedingungen sollten kinetisch bevorzugte Hydroxylgruppen phosphoryliert werden (kinetische Kontrolle). Diese dürften die initial besetzten Reste darstellen. Anschließend könnte eine Umlagerung der Phosphatreste zum thermodynamisch stabileren Produkt erfolgen (thermodynamische Kontrolle).

In der Autophosphorylierung inkorporierte die Wildtyp-IRKD 1 mol/mol, was für eine vollständige Umsetzung des ATP spricht (5.2.1). Es war keine signifikante Rückreaktion

in Richtung Dephosphoenzym und ATP zu erkennen. Der Verlauf der Phosphatinkorporation war durch zwei Phasen gekennzeichnet. Zunächst erfolgte eine verzögerte Phosphatinkorporation, worauf sich eine schnellere Autophosphorylierung anschloß. Diese Beobachtung deutet auf eine langsame Besetzung einer oder mehrerer Stellen hin. Ab einem bestimmten Zeitpunkt zwischen 2 und 5 Minuten schien eine Aktivierung zu erfolgen, so daß sich der Phosphateinbau beschleunigte. Die Phosphopeptid-Kartierung des zeitlichen Verlaufs gab keinen klaren Aufschluß darüber, welche Reste eine beschleunigten Phosphatinkorporation fördern (5.2.3). Nach 2 Minuten Reaktionszeit, während der langsameren ersten Phase, waren drei Phosphopeptide nachweisbar, so die monophosphorylierte Form der Kinasedomäne und zwei unbekannte Signale. Teilweise war auch die bisphosphorylierte Form zu erkennen. Während das Elutionsprofil nach 2 Minuten dem nach 10 Sekunden ähnlich war, waren nach 10 Minuten deutliche Veränderungen sichtbar. Neben mono-, bis- und trisphosphorylierter Form der Kinasedomäne konnte auch die bisphosphorylierte Form des C-Terminus identifiziert werden. Während der Phosphateinbau durchschnittlich 1 mol/mol erreichte, deutet die Kartierung auf eine ungleichmäßige Phosphorylierung der vorhandenen Moleküle hin. Die Existenz bis- und trisphosphorylierter Peptide legt nahe, daß ein Teil der Enzyme mehrere Phosphatreste inkorporieren, während andere nicht oder nur marginal besetzt werden. Dies läßt sich als eine bevorzugte Autophosphorylierung derjenigen Moleküle deuten, die aktiviert wurden und dadurch kinetisch begünstigt phosphoryliert werden. Es ist denkbar, daß die Bis-Form der Kinasedomäne die Voraussetzung für die maximale Aktivierung der Kinase darstellen könnte. Erst nach deren Ausbildung konnte die Bis-Form des C-Terminus nachgewiesen werden. Da die Tris-Form der Kinasedomäne nach 10 Minuten nur einen geringen Anteil der inkorporierten Radioaktivität ausmachte, scheint diese nicht für die zweite Phase der schnelleren Autophosphorylierung verantwortlich zu sein. In der Literatur ist umstritten, ob für die maximale Aktivierung des Insulinrezeptors die bis- oder die trisphosphorylierte Kinasedomäne nötig ist (White und Kahn, 1989; Zhang *et al.*, 1991; Obermaier-Kusser *et al.*, 1989; Wei *et al.*, 1995). Zusammengefaßt deutet die Analyse der zeitlichen Besetzung auf eine langsame Phosphorylierung zweier Tyrosine der Kinasedomäne (und möglicherweise anderer unbekannter Reste) hin, gefolgt von der schnellen Phosphatinkorporation in den C-Terminus. Nicht ausgeschlossen werden kann allerdings, daß der C-Terminus zu frühen Zeiten monophosphoryliert vorliegt und eines der unbekanntes Signale repräsentiert.

Der biphasische Verlauf der Reaktion ist an die Existenz der drei Tyrosine der Kinasedomäne gebunden. Bei Austausch eines der Tyrosine verlief die Autophosphorylierung hyperbolisch, was zu einer beschleunigten Aktivierung der Kinasen führte (5.2.1). Die 51F wies nach 2 Minuten Reaktionszeit einen signifikanten Anteil an der Bis-Form der Kinasedomäne auf (5.2.2, Abb. 23). Dies könnte die schnellere Phosphatinkorporation in die 51F erklären und belegt den Einfluß der Bisphosphorylierung für die Aktivierung der Kinase. Auch in Abwesenheit von Poly-L-Lysin zeigten die Monosubstitutionen eine

höhere Aktivität als der Wildtyp. Die Mutante Δ CT wurde in An- und Abwesenheit von Polykationen gleich phosphoryliert; auf diesen Umstand wird weiter unten eingegangen (5.2.1, Abb. 20).

9.3.2 Reihenfolge der Besetzung

Um die initiale Phosphorylierungsstelle zu bestimmen, wurden Phosphopeptid-Kartierungen der Kinasen nach 10 Sekunden erstellt. Dabei dominierte bei allen Kinasen ein Hauptsignal, wobei das zugehörige Phosphopeptid unbekannt ist (5.2.2). Es könnte eine monophosphorylierte, anders gespaltene Form der Kinasedomäne darstellen. In der Kinasedomäne folgen auf Y1151 R1152 und K1153 sowie K1156. Die Phosphorylierung von Y1151 könnte die Spaltung hinter R1152 verhindern, so daß hinter K1153 oder K1156 gespalten und verlängerte Peptide mit einer oder mehreren zusätzlichen positiven Ladungen entstehen würden. Dies wurde bei tryptischen Spaltungen einer löslichen Insulinrezeptorkinase beobachtet (Kohanski 1993b). Tabelle 10 listet derartige Phosphopeptide der Kinasedomäne und deren Nettoladung nach Phosphorylierung eines Tyrosinrests bei neutralem pH auf.

Tab. 10 Tryptische Peptide der Kinasedomäne

Peptid	Nettoladung nach einfacher Phosphorylierung
DIYETDYR	-4
DIYETDYRK	-3
DIYETDYRKGGK	-2

Der Unterschied der Retentionszeiten von Mono- zu Bis-Form bzw. Bis- zu Tris-Form betrug 20 Minuten bei einem ab der 50. Minute konstant steigendem Salzgradienten. Die Einführung einer negativen Ladung führt dementsprechend zu einer verzögerten Elution, die 10 Minuten ausmacht. Die Mono-Form der Kinasedomäne eluierte bei 70 Minuten; daher sind anders gespaltene Phosphopeptide der Mono-Form mit zusätzlichen positiven Ladungen nach etwa 50 und 60 Minuten Retentionszeit zu erwarten. Möglicherweise besteht das unbekannte Hauptsignal mit einer Retentionszeit von 50 Minuten aus zwei Komponenten. Bei der Y3F war dieses Signal schwächer ausgeprägt. Somit könnte die Phosphorylierung eines Tyrosinrests im C-Terminus oder des Y960 im Juxtamembranbereich das beobachtete Signal mit erklären. Endgültige Klarheit würde die Sequenzierung des Phosphopeptids schaffen.

Mehrere diverse Monoformen der Kinasedomäne konnten identifiziert werden. Die Zuordnung zu den drei Tyrosinen 1146, 1150 und 1151 war jedoch nicht eindeutig, so daß keine Entscheidung über den zuerst phosphorylierten Rest der Kinasedomäne getroffen werden konnte. Mit Hilfe der mutierten Insulinrezeptorkinasen konnte aber die

zeitlich erste Bis-Form der Kinasedomäne dokumentiert werden. Demnach werden zunächst Y1150 und Y1151 phosphoryliert; zu späteren Zeitpunkten ist eine Bis-Form mit besetztem Y1146 und Y1150 oder Y1151 nachweisbar. Die Existenz zweier Bis-Formen konnte mehrfach verifiziert werden: (1) Die Phosphorylierung eines rekombinanten Peptids mit den drei Tyrosinen der Kinasedomäne (GST-Ex20) führte zur Ausbildung beider Signale der Bis-Formen. (2) Autophosphorylierungen von 1:1-Gemischen je zwei der Kinasen 46F, 50F und 51F führte nur bei 50F/51F zu einer Bis-Form (1146/X); bei Anwesenheit von 46F waren zwei Bis-Formen zu erkennen (1150/1151 und 1146/X) (Daten nicht gezeigt). (3) Die Phosphorylierung des GST-Ex20 mit der Substitution Y1146F führte zu derselben Verschiebung des Signals der Bis-Form Y1150/Y1151 wie bei der Kinase 46F (Daten nicht gezeigt).

In der Literatur wird als erster phosphorylierter Rest der Kinasedomäne Y1146 oder Y1150 diskutiert, wobei die Reihenfolge unklar ist (Stadtmauer und Rosen, 1986; Levine *et al.*, 1991; Ellis und Levine, 1991; Tavaré und Dickens, 1991; Dickens und Tavaré, 1992; Wei *et al.*, 1995). Beim Nachweis der Bis-Formen sind die unterschiedlichen Reaktionsbedingungen der verschiedenen Arbeitsgruppen zu beachten. Diese sind nach langen Reaktionszeiten bestimmt worden, so daß bei voll aktivierten Kinasen die Form 1146/X zu erwarten ist. Bei der vorliegenden Literatur wurde bei löslichen Insulinrezeptorkinasen ohne Polykationen phosphoryliert. Unter diesen Bedingungen ist bei der IRKD auch nach langen Phosphorylierungszeiten nur die Bis-Form Y1150/Y1151 detektierbar (Tenagels 1998). In Übereinstimmung dazu finden Kohanski (1993b) und Wei *et al.* (1995) nach langen Reaktionszeiten die Form Y1150/1151. Bei Untersuchungen am Holo-rezeptor *in vitro* wurden hingegen verschiedene Bis-Formen gefunden. Tornqvist *et al.* (1987) wiesen nach 30-40 Minuten Autophosphorylierung des humanen Rezeptors die Bis-Form Y1146/Y1151 und zu einem geringeren Anteil Y1146/Y1150 nach. Interessanterweise lagen 20-25 % des Y1150 nicht phosphoryliert vor, möglicherweise durch eine Inhibition des besetzten Y1151. Flores-Riveiros *et al.* (1989) analysierten den Insulinrezeptor aus Maus und machten nach 15 Minuten Autophosphorylierung die Bis-Formen Y1146/X und Y1150/1151 im Verhältnis 3:1 aus. Diese Ergebnisse stützen die Beobachtung eines Wechsels zweier bisphosphorylierter Formen der Kinasedomäne. Scheinbare Diskrepanzen ergaben sich jedoch beim Vergleich zur C-terminal verkürzten Kinase von Wei *et al.* (1995) bei frühen Zeiten der Autophosphorylierung. Die Autoren beschreiben die initiale Phosphorylierung von Y1150, gefolgt von Y1146. Diese Kinase entspricht in etwa der Mutante Δ CT; in der zeitabhängigen Analyse der Autophosphorylierung verhielt diese sich anders als die IRKD (4.3.4). So erschienen beide Bis-Formen zum gleichen Zeitpunkt, was den Schluß nahe legt, daß die Δ CT einer andere zeitliche Besetzung der Tyrosinreste unterliegt. Nach 10 Sekunden Autophosphorylierung unter Standardbedingungen (250 μ M ATP) ähnelte die Besetzung der Δ CT der der IRKD nach 10 Sekunden unter äquimolaren ATP-Konzentrationen. Dies ist ein Beleg dafür, daß die Besetzung mit 1 μ M ATP keine artifiziellen Phosphorylierungsstellen erzeugt, die nur

unter diesen Bedingungen bevorzugt wären. Unterstützt wird dies durch die Beobachtung, daß mit 1 μM ATP nach längeren Zeiten ein Phosphorylierungsmuster auftrat, das dem einer unter Standardbedingungen autophosphorylierten Kinase ähnelt, welche durch hohe Konzentrationen an Substrat inhibiert wird (Tennagels 1998). Das „Einfrieren“ der Reaktion durch eine ATP-Konzentration weit unter dem K_M führte somit zur vergleichbaren Besetzung der Reste (vorwiegend Mono-Form der Kinasedomäne und Bis-Form des C-Terminus) wie die Inhibition durch Substrate in Konzentrationen vom 5-10fachen des K_M .

Die Bis-Formen der Kinasedomäne wurden unterschiedlich schnell erzeugt und scheinen verschiedene Stabilität zu besitzen (4.3.3). Y1146/1151 (50F) und Y1150/Y1151 (46F) unterlagen einer vergleichsweise langsamen Phosphorylierung, was die verringerten Initialgeschwindigkeiten erklärt. Die höhere Geschwindigkeit des Phosphateinbaus der 51F liegt in der schnellen Besetzung von Y1146/Y1150 begründet. Es erscheint erstaunlich, daß gerade eine Bis-Form ohne Y1151 besonders bevorzugt wird. Y1151 trägt in der Kristallstruktur erheblich zur Stabilität der phosphorylierten Aktivierungsschleife bei (Hubbard 1997). Es ist denkbar, daß die Besetzung von Y1146/Y1150 eine alternative Konformation der Aktivierungsschleife stabilisiert, die eine hohe Aktivität der Kinase gewährleistet. Für eine andere Konformation der Aktivierungsschleife spricht auch, daß 51F eine verringerte Affinität zum C-Terminus zeigte.

9.3.3 Einfluß von Poly-L-Lysin

Über die Frage eines cis- oder trans-Mechanismus wird kontrovers diskutiert (Cobb *et al.*, 1989; Herrera *et al.*, 1988; Villalba *et al.*, 1989; Kohanski 1993a; Wei *et al.*, 1995). Neuere Arbeiten von Cann und Kohanski (1998) deuten auf eine cis-Phosphorylierung der Juxtamembrandomäne, wohingegen die anderen Reste in trans besetzt werden sollen. Die Autoren der Kristallstruktur der nicht phosphorylierten Kinase schlagen eine initiale trans-Phosphorylierung von Y1150 vor (Hubbard *et al.*, 1994).

Poly-L-Lysin erhöht bei der IRKD die Initialgeschwindigkeit um den Faktor 10-20 und steigerte den maximalen Phosphateinbau um das 2-3fache (Al-Hasani 1995; Tennagels 1998; Rosen und Lebowitz, 1988). In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit Poly-L-Lysin die initiale Autophosphorylierung bei verschiedenen Kinasekonstrukten aktiviert. Interessanterweise führte der Verlust der C-terminalen Domäne dazu, daß Poly-L-Lysin die Initialgeschwindigkeit der Autophosphorylierung nicht mehr erhöhte. Dies konnte sowohl unter Standardbedingungen als auch bei äquimolaren ATP-Konzentrationen festgestellt werden (5.1, 5.2.1). Die einfachste Erklärung hierfür ist eine direkte Interaktion von Poly-L-Lysin mit dem C-Terminus. Dies wird unterstützt von der Mutante Y3F, die die C-terminale Domäne ohne Tyrosinautophosphorylierungsstellen besitzt, aber dennoch durch Polykationen aktivierbar war (5.1, 5.2.1). Monosubstitutionen der Kinasedomäne führten jeweils zu einer leicht erhöhten

Basalaktivität (ohne Poly-L-Lysin); unter niedrigen ATP-Konzentrationen wurde auch erheblich mehr Phosphatinkorporation in diese Mutanten verzeichnet als in den Wildtyp. Dies könnte bedeuten, daß Poly-L-Lysin auch mit der katalytischen Domäne Wechselwirkungen eingeht. Diese Daten liefern Evidenzen für eine zweifache Wirkung von Poly-L-Lysin: Zum einen moduliert das Polykation die C-terminale Domäne, was entscheidend für die initiale Aktivierung ist. Die Flexibilität des C-Terminus könnte erhöht sein, so daß dieser leichter ins aktive Zentrum reichen könnte. Zum anderen könnte die Erhöhung der Phosphatinkorporation durch die Bindung an die negativ geladene, phosphorylierte Kinasedomäne erfolgen. Unklar ist, ob und bei welchem der beiden Reaktionsschritte eine Di-/Oligomerisierung der Kinasmoleküle vonstatten geht. Es ist nicht auszuschließen, daß die lösliche Kinase in Lösung auch ohne Polykationen als Dimer vorliegen kann. Erkenntnisse hierzu ergaben sich aus einer Phosphorylierung der K1018A durch eine aktive Kinase in Abwesenheit von Poly-L-Lysin. K1018A inkorporierte an denselben Stellen Radioaktivität wie eine aktive Kinase, die in Abwesenheit von Poly-L-Lysin autophosphoryliert wurde (Tennagels 1998). Die Konzentrationsabhängigkeit der Autophosphorylierungsreaktion führte bei einigen Arbeitsgruppen zu einem linearen Verlauf, während andere einen Einfluß der Kinasekonzentration beschrieben (Cobb *et al.*, 1989; Herrera *et al.*, 1988; Villalba *et al.*, 1989; Kohanski 1993a; Wei *et al.*, 1995).

Die genaue Rolle des C-Terminus und der Juxtamembrandomäne bei der Aktivierung der Kinase ist in der Literatur wenig untersucht. Möglicherweise existiert eine basale Form der Kinase, die ATP binden kann; deren Aktivierung soll durch die Juxtamembrandomäne in der Nähe des aktiven Zentrums inhibiert werden (Cann und Kohanski, 1997; Bishop *et al.*, 1998). Eine Deletionsmutante, der einige Reste um Y960 fehlen, wies einen erhöhten K_M für ATP auf (Backer *et al.*, 1991a). Der Juxtamembranbereich scheint zumindest in der Nähe der ATP-Bindungsstelle lokalisiert zu sein. Ob die C-terminale Domäne sich bei der nicht aktivierten Kinase in der Nähe des aktiven Zentrums oder außerhalb befindet, ist nicht bekannt. Die lösliche Insulinrezeptorkinase und die C-terminal verkürzte Kinase besitzen denselben K_M für ATP (Wei *et al.*, 1995); dieser wird für den Insulinrezeptor und die Wildtypkinase mit 100-200 μM bei Anwesenheit von Magnesiumionen angegeben (Kwok *et al.*, 1986; Wei *et al.*, 1995; Al-Hasani 1995; Tennagels 1998). In Anwesenheit von Substraten ist der K_M bei der verkürzten Kinase jedoch drastisch erniedrigt (Quirk *et al.*, 1995). Die C-terminale Domäne spielt somit nicht nur bei der Aktivierung eine wichtige Rolle, sondern scheint auch bei der Modulation der Substratphosphorylierung exogener Substrate beteiligt zu sein.

Der initiale Autophosphorylierung führte in An- und Abwesenheit von Poly-L-Lysin zur Besetzung identischer Stellen (5.2.2). Dieses Ergebnis lieferte keinen eindeutigen Hinweis darauf, ob dieser Schritt in *cis* oder in *trans* ablief. Nach Hubbard *et al.* (1994) soll die initiale Phosphorylierung von Y1150 in *trans* ablaufen. Die hier erhaltenen Resultate deuten darauf hin, daß die erste Besetzung in *cis* möglich ist. Es scheint jedoch

eine Phosphorylierung in trans bevorzugt zu sein, da mit Poly-L-Lysin ein erhöhter Phosphat einbau in dieselben Peptide wie in Abwesenheit des Polykations verzeichnet wurde. Der Einfluß von Poly-L-Lysin bei der Di-/Oligomerisierung von Kinasen wird belegt durch Untersuchungen an einer durch GST künstlich dimerisierten IGF1-Rezeptorkinase (Baer, persönliche Mitteilung). Dieses Enzym wies ohne Polykation eine nur geringfügig verringerte Autophosphorylierung (initial und Gesamteinbau) wie mit Poly-L-Lysin auf.

9.4. Schlußfolgerungen für die Serinphosphorylierung

9.4.1 Die Serinkinase ist eine intrinsische Aktivität der IRKD

Die Insulinrezeptor ist eine Rezeptortyrosinkinase. Neben der Besetzung von Tyrosinresten ist aber auch eine Serinphosphorylierung des Enzyms nachweisbar. Dies betrifft, unabhängig vom Reinigungsgrad, sowohl den Holorezeptor (Lewis *et al.*, 1990a; Heidenreich *et al.*, 1994) als auch die lösliche Insulinrezeptorkinase (Baltensperger *et al.*, 1992; Tauer *et al.*, 1996; Al-Hasani *et al.*, 1997). Gegen eine assoziierte Serinkinase sprechen mehrere Gründe: (1) Die kinaseinaktive K1018A zeigte *in vitro* keinerlei Phosphorylierung (Al-Hasani *et al.*, 1997). Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß die Serinphosphorylierungsstellen bei einer inaktiven Kinase verborgen und so nicht für eine exogene Kinase erreichbar sind. (2) Die Serinautophosphorylierungsstellen 1275 und 1309 konnten bei der löslichen Kinase wie auch beim Holorezeptor *in vitro* besetzt werden (Al-Hasani *et al.*, 1997). Es erscheint unwahrscheinlich, aus humaner Plazenta einer Serinkinase mitgereinigt zu haben, die dieselben Reste phosphoryliert wie eine aus Insektenzellen, zumal die Reinigungswege verschieden sind. (3) Teilweise Inhibition der Tyrosinkinase-Aktivität durch hohe Konzentrationen an exogenem Substrat führte zur vollständigen Hemmung der Serinkinase-Aktivität (Tennagels 1998). (4) Eine Serinphosphorylierung ist unter stöchiometrischen Verhältnissen auch bei Substraten der Insulinrezeptorkinase zu beobachten (Tennagels 1998). (5) Der überzeugendste Beweis ist aber der teilweise Verlust der Serinautophosphorylierung durch die Substitution Y1151F. Diese Kinase zeigte eine Tyrosinkinase-Aktivität, die gegenüber dem Wildtyp nur geringfügig verändert war. Die Phosphorylierung der Serinreste 1309 und vor allem 1275 war deutlich reduziert, unabhängig davon, ob diese Reste auf dem rezeptoreigenen oder einem exogenen C-Terminus lokalisiert sind. Dies kann nicht durch eine exogene Serinkinase erklärt werden. Der Insulinrezeptor stellt somit auf Grund der Phosphorylierung rezeptoreigener als auch substratgebundener Serinreste eine Kinase mit dualer Spezifität dar (Lindberg *et al.*, 1992).

9.4.2 Hinweise auf weitere Serinautophosphorylierungsstellen

Dünnschichtchromatographische Analysen des Phosphoaminosäuregehalts der IRKD ergaben nach 30 Minuten Autophosphorylierung einen Serinphosphatanteil von 25-35 %

(4.1, Tab. 2, Abb. 7). In der Phosphopeptid-Kartierung konnten 17 % Serinphosphate in distinkten Signalen identifiziert werden (4.3.5). Beim Vergleich dieser Werte ist zu berücksichtigen, daß die Wiederfindungsraten der Phosphopeptide bei der Kartierung unterschiedlich sind. Zudem enthalten diverse Signale Serinphosphate bis zu einem Anteil von 5 % (Daten nicht gezeigt), so daß der Gesamtanteil an Serinphosphorylierung höher als 17 % liegen dürfte. Der Austausch der Serinreste 1275 und 1309 führte zum Nachweis weiterer Serinphosphorylierung, die noch 25-30 % Anteil des Wildtyps erreichte und 10fach langsamer ablief. S1275 und S1309 scheinen demnach Hauptphosphorylierungsstellen auszumachen. Die restliche Serinphosphorylierung scheint sich in der C-terminalen Domäne und in der Juxtamembranregion zu ereignen. Im Durchlauf der Phosphopeptid-Kartierung wurde ein phosphoserinhaltiges Signal identifiziert, das nicht bei der Δ CT nachzuweisen war. Dieses Signal könnte das Peptid SSHCQR mit den Serinresten 1293/1294 darstellen, welche als weitere Phosphorylierungsstellen beschrieben wurden (Lewis *et al.*, 1990a). Die Phosphorylierung eines Peptids mit der Juxtamembranregion des Insulinrezeptors zeigte, daß auch dort Serinphosphorylierung stattfindet. Diese könnte S994 betreffen, das *in vivo* nach Austausch zu einer erhöhten Autophosphorylierung des Rezeptors führte (Strack *et al.*, 1997). Da S994 in die ATP-Bindung involviert ist, könnte dessen Phosphorylierung die ATP-Bindung schwächen und so einen Mechanismus zur Modulation des Insulinsignals darstellen.

9.4.3 Der Mechanismus der Serinphosphorylierung

Der Mechanismus, mit dem eine Tyrosinkinase auch aliphatische Reste zu phosphorylieren vermag, ist ungeklärt. Tyrosine werden vom Insulinrezeptor bevorzugt in der Sequenz YxxM phosphoryliert, wobei N-terminal vom Tyrosin saure Reste die Erkennung fördern (Songyang *et al.*, 1995; Kreegipuu *et al.*, 1998). Beim Vergleich der Serinreste 1275 und 1309 ergibt sich die unspezifische Konsensussequenz (A/G)xxSxx(hydrophob); diese findet sich auch bei S994, aber nicht bei S1293/S1294. Es scheint, daß die Erkennung wenig vom Aminosäurekontext abhängig ist; wahrscheinlich ist die räumliche Anordnung der Umgebung und/oder die räumliche Nähe des Serins zu einem Tyrosinrest in einem YxxM-Motiv entscheidend. Letzteres konnte für die Phosphorylierung von Serinresten im IRS-1 gezeigt werden (Mothe und Van Obberghen, 1996). Von den phosphorylierten Serinresten des Insulinrezeptors hingegen befindet sich nur S1309 in der Nähe eines autophosphorylierten Tyrosins, welches in der Sequenz YEEH lokalisiert ist.

Auch die Kristallstruktur der löslichen Insulinrezeptorkinase lieferte keine mechanistischen Erklärungen (Hubbard 1997). Im Gegenteil ähneln sich Tyrosin- und Serin-/Threoninkinasen in der Gesamtstruktur und in der Ausbildung der phosphorylierten Aktivierungsschleife sehr; nur im Detail zeigen sich Unterschiede (s. 2.2.2). In der Literatur werden zahlreiche Kinasen mit dualer Spezifität beschrieben, von denen die MAP-Kinase-Kinase die bekannteste ist (Marshall 1994). Dieses Enzym phosphoryliert die

MAP-Kinase an einen Tyrosinrest und mit zeitlicher Verzögerung an einem Threoninrest. Dies erfolgt wahrscheinlich in einem distributiven Mechanismus, bei dem zunächst die Tyrosinphosphorylierung erfolgt (Ferrell und Bhatt, 1997). Nach Abdissoziation und erneuter Assoziation wird dann der Threoninrest besetzt. Casein Kinase II (CKII) aus Hefe zeigt in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen eine Serin-/Threoninkinase-Aktivität bei der Autophosphorylierung und der Phosphorylierung exogener Substrate (Chardot *et al.*, 1995). Mn^{2+} -Ionen rufen eine duale Spezifität der CKII hervor durch Inhibition der Serin-/Threoninkinase- und Förderung der Tyrosinkinaseaktivität. Vergleichbares wurde für die Phosphorylase Kinase beobachtet (Yuan *et al.*, 1993). Während Mg^{2+} die Serinphosphorylierung aktivierte, inhibierte Mn^{2+} diese und begünstigte die Tyrosinkinaseaktivität. Die Autoren erklären dies mit zwei verschiedenen Konformationen des aktiven Zentrums, wobei eine durch Bindung des divalenten Kations an eine zweite Metallbindungsstelle stabilisiert werden soll. Mindestens zwei weitere Kinasen, die Pyruvatkinase (Baek und Nowak, 1982) und die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (Lee *et al.*, 1981), benötigen zwei divalente Kationen für die volle Aktivität. Während Mg^{2+} ein Kosubstrat des Nukleotids bildet, besitzt das zweite Kation, ein Übergangsmetall, eine separate Bindungsstelle. Für Metallionen ist auch gezeigt, daß diese in unterschiedlichem Maße den pK_a des β -Phosphats eines Nukleotids beeinflussen können. Im Falle des GTP-spaltenden Proteins $p21^{ras}$ erhöhte Mn^{2+} im Vergleich zu Mg^{2+} den pK_a und beschleunigte so die GTP-Hydrolyse (Schweins *et al.*, 1997).

Die autophosphorylierte Insulinrezeptorkinase wies mit Mg^{2+} einen höheren Anteil an phosphorylierten Serinresten auf als in Anwesenheit von Mn^{2+} (Tennagels, 1998). Dabei zeigte das Enzym im Gel einer SDS-PAGE mit Mg^{2+} wesentlich schneller die obere Bande als mit zusätzlichem Mn^{2+} ; nach 20 Minuten war keine untere Bande mehr detektierbar (Tennagels, persönliche Mitteilung). Geht man davon aus, daß die obere Bande durch eine Konformationsänderung vor allem der C-terminalen Domäne bedingt ist, erscheint es plausibel, daß im C-Terminus eine Metallbindungsstelle existieren könnte, deren Besetzung die Konformation der Kinase beeinflusst. Dafür spricht auch, daß Poly-L-Lysin den aktivierenden Effekt von Mn^{2+} aufheben kann, möglicherweise durch Okkupation dieser Bindungsstelle (Rosen und Lebowitz, 1988).

Weitere Hinweise zum mechanistischen Ablauf der Reaktion dualer Kinasen lieferten Untersuchungen der Proteintyrosinkinase $pp60^{c-src}$ (Lee *et al.*, 1994). Dieses Enzym vermochte ein Peptid an einem Serinrest zu phosphorylieren. Dabei scheint weniger eine erhöhte Flexibilität des aktiven Zentrums eine Rolle zu spielen, wie kinetische Analysen belegten. Die Autoren schlagen ein Modell vor, nach dem Substrate verschiedene Positionen auf der Enzymoberfläche einnehmen können und so die optimale Ausrichtung durch fluktuierende Interaktionen mit der Kinase erreichen.

Die Phosphatgruppe, die auf einen Serinrest übertragen wird, könnte neben ATP auch von einem Tyrosinrest übertragen werden. Für die Insulinrezeptorkinase gibt es jedoch

keine Hinweise darauf, daß die durch Dephosphorylierung transienter Tyrosinphosphate entstehende Phosphatgruppe auf Serinreste transferiert wird. Die Mutante Y3F, bei der die transienten Tyrosine 1316 und 1322 substituiert sind, autophosphorylierte Serinreste wie der Wildtyp. Die IRKD wies bei konstantem Phosphateinbau zu späteren Zeitpunkten mehr Serinphosphate auf als zu frühen. Dieser Verlust an Radioaktivität in Tyrosinrest ist wahrscheinlich auf eine Dephosphorylierung der Tyrosine und nicht auf einen Phosphattransfer von Tyrosin- auf Serinreste zurückzuführen, wie die Analyse der Autophosphorylierungen der 50F und der SSDD zeigte (4.2). Diese beiden IRKD-Konstrukte zeigten keinerlei Korrelation zwischen Dephosphorylierung der Tyrosinreste und Zunahme der Serinphosphorylierung. Der ausgeprägte Verlust an Radioaktivität der Tyrosinphosphat bei der SSDD könnte in dem Sinne interpretiert werden, daß die Tyrosindepheosphorylierung durch Serinphosphorylierung (und eine dadurch möglicherweise induzierte Konformationsänderung) begünstigt wird. Die Serinphosphorylierung wäre dann nicht die Folge, sondern eine Ursache der Dephosphorylierung der C-terminalen Tyrosine.

Ob bei der Serinphosphorylierung ein intermediäres Produkt wie ein Histidinphosphat partizipiert, ist nicht bekannt. Dieses Intermediat könnte den Transfer sowohl auf Tyrosin- als auch Serinreste katalysieren. Evidenzen für ein Intermediat ergeben sich aus Untersuchungen der transienten Phosphorylierung (s. 9.5).

9.4.4 Bedeutung für die Signaltransduktion

Wird IRS-1 an Serin-/Threoninresten phosphoryliert, erfolgt *in vivo* eine Inhibition des Insulinsignals (Sun *et al.*, 1992; Tanti *et al.*, 1994; Feinstein *et al.*, 1993; Hotamisligil *et al.*, 1994 und 1995). Für den Insulinrezeptor könnte Serinautophosphorylierung ebenfalls ein Mechanismus zur homologen Desensibilisierung darstellen. Eine direkte Verringerung der Transferaktivität der Insulinrezeptorkinase durch Serinphosphorylierung ist allerdings nicht gegeben, wie die unveränderte Aktivität der SSDD belegt. Diese Mutante wurde schneller als die IRKD an Y1316 und Y1322 phosphoryliert; die negativen Ladungen der Aspartate führen initial zu einer Aktivierung der Autophosphorylierung. Nach langen Autophosphorylierungszeiten ist die Transferaktivität von der IRKD und der SSDD, aber nicht von der Δ CT verringert. Die C-terminale Domäne scheint für die Inhibition des Signals entscheidend zu sein. Da die Serinphosphorylierung nicht unmittelbar zur Abschaltung des Signals führt, ist eher eine Konformationsänderung zu vermuten, an der die C-terminale Domäne beteiligt ist. Diese Konformationsänderung scheint unter anderem durch die Phosphorylierung von S1275 und S1309 hervorgerufen zu werden. Möglich wäre auch die Abschwächung der Interaktionen von SH2-Proteinen, die an das C-terminale Tyrosin 1322 binden, durch die Serinautophosphorylierung (SH2-Protein-Interaktion: $K_d \sim 0,1-1,0 \mu\text{M}$; Kuriyan und Cowburn, 1997). In der Literatur häufen sich indessen die Hinweise darauf, daß SH2-Proteine *in vivo* mehr indirekt über IRS-Proteine mit dem Insulinrezeptor als direkt mit

den phosphorylierten Tyrosinen der C-terminalen Domäne assoziieren (Backer *et al.*, 1991a und 1992b; Murakami und Rosen, 1991; Myers Jr *et al.*, 1994; Staubs *et al.*, 1994; Levy-Toledano *et al.*, 1994; Van Horn *et al.*, 1994). Da die Phosphorylierung der Reste S1275 und S1309 auch *in vivo* nachgewiesen werden konnte (Tennagels 1998), könnte die duale Aktivität des Insulinrezeptors eine wichtige Rolle bei der Insulinsignal-Weiterleitung und dessen Inhibition spielen.

9.5 Schlußfolgerungen für die transiente Phosphorylierung

9.5.1 ATPase-Aktivität

Die Insulinrezeptorkinase unterlag einer transienten Phosphorylierung vor allem der Tyrosine 1316 und 1322 (7.3). Parallel dazu wurde ein erhöhter ATP-Umsatz gemessen, der bei allen untersuchten Kinasen gleich war und unter Standardreaktionsbedingungen zwischen 5 und 30 Minuten linear verlief (6.1, 6.4). Die Anwesenheit exogener ATPasen und Phosphatasen konnte durch den Einsatz von Orthovanadat und den ATP-Umsatz der kinaseinaktiven D1120A ausgeschlossen werden (6.3). Gegen eine mitgereinigte Phosphatase sprechen auch die Untersuchungen mit dem Phosphatase-Substrat 2-MBP (9.2.3, 10.9). Tyrphostin A 47 hemmte den ATP-Umsatz, was die Abhängigkeit dieser Reaktion von einer aktiven Kinase belegt.

Im Bereich des linearen ATP-Umsatzes wurde die Geschwindigkeit der ADP-Bildung errechnet (6.1). Die Geschwindigkeit der transienten Phosphorylierung wurde durch Messen der Initialgeschwindigkeit der Rephosphorylierung in der Hot Chase-Reaktion bestimmt (7.2). Der Vergleich der Geschwindigkeiten ergab eine mindestens dreifach höhere Rate des ATP-Umsatzes, als Phosphate in die Kinase inkorporiert wurden. Nur ein kleiner Teil der Phosphatreste werden demzufolge auf transiente Phosphorylierungsstellen transferiert, während mindestens 2 von 3 ATP-Molekülen hydrolysiert werden. Dies wird durch die Analysen von Al-Hasani *et al.* (1994) unterstützt, die die Freisetzung von anorganischem Phosphat beobachteten. Diese ATPase-Aktivität ist mit $60 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, ähnlich wie bei der cAPK (Mendelow *et al.*, 1993; Yoon und Cook, 1987; Lee *et al.*, 1994), vergleichsweise schwach ausgeprägt (Phosphatasen $10\text{-}100 \text{ }\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, Flint *et al.*, 1997) und bei Anwesenheit von Substraten fast gänzlich unterdrückt (Al-Hasani *et al.*, 1994; Koch 1998)

Der ATP-Umsatz erwies sich im Bereich von $100\text{-}500 \text{ }\mu\text{M}$ ATP als unabhängig von der Nukleotidkonzentration. Es scheint so, als wäre die ATP-Bindung bei $100 \text{ }\mu\text{M}$ schon gesättigt, was durch folgende Überlegungen belegt wird: (1) Der K_M für Magnesium-ATP wird mit $100\text{-}200 \text{ }\mu\text{M}$ angegeben (s. 9.3.3), für Mangan-ATP ergab sich eine 10fach erhöhte Affinität (Kwok *et al.*, 1986). Die Standardbedingungen für die IRKD beinhaltet gleiche Mengen an Mg^{2+} und Mn^{2+} , so daß hier der K_M niedriger als für Magnesium-ATP liegen dürfte. (2) Die Bestimmung der K_M -Werte erfolgt zumeist nach 30 Sekunden

Reaktionszeit. Die Initialgeschwindigkeiten des Phosphateinbaus bei der Autophosphorylierung lagen nach 10 Sekunden Reaktionszeit 2,2-2,6fach höher als nach 30 Sekunden. Es ist zu vermuten, daß sich bei der Bestimmung des K_M für ATP, gemessen nach 10 Sekunden Autophosphorylierungsreaktion, niedrigere Werte ergeben würden.

Erstaunlich ist, daß keine der untersuchten Mutationen, die teilweise den K_M für ATP beeinflussen (Backer *et al.*, 1991a; Cann und Kohanski, 1997; Conn, persönliche Mitteilung), einen Einfluß auf die Rate der ADP-Bildung hatte. Die ATP-Bindung kann daher nicht der geschwindigkeitsbestimmende Reaktionsschritt sein. Vielmehr scheint die Spaltung oder die ADP-Freisetzung die Reaktion zu limitieren.

9.5.2 De- und Rephosphorylierungsprozesse

Bei der IRKD wurden Y1316 und Y1322 transient phosphoryliert. An diesem Mechanismus waren Y1150 und Y1151 beteiligt; beide Substitutionen beeinflussten die De- und Rephosphorylierung der C-terminalen Tyrosine (7.3). C1296 aus einem Phosphatase-ähnlichen Motiv hingegen war ohne Auswirkungen austauschbar. Eine schlechtere Affinität der C-terminalen Domäne bei der 51F kann dabei nicht als Erklärung dienen (s. o.). Denkbar sind zwei Auswirkungen bei 50F und 51F. Die Mutationen könnten Konformationsänderungen der Aktivierungsschleife hervorrufen, die zwar nicht die Affinität zum C-Terminus verändern, den phosphorylierten C-Terminus aber räumlich verändert im aktiven Zentrum positioniert. In diesem Fall würden Y1316 und Y1322 noch phosphoryliert, aber nicht mehr dephosphoryliert; der Einfluß von Y1150 und Y1151 wäre indirekter Natur. Es ist aber auch eine direkte Beteiligung der Tyrosine der Kinasedomäne vorstellbar. Die beiden benachbarten Tyrosine könnten sich ein Proton teilen und eine Art „Charge Relais System“ darstellen (Klein *et al.*, 1984; Klein *et al.*, 1986). Beide Tyrosine wären nötig, um die Dephosphorylierung des C-Terminus zu katalysieren.

Unter ADP-Chase-Bedingungen fand im Vergleich zur Reaktion unter ATP-Chase-Bedingungen eine qualitative und quantitative Veränderung der phosphorylierten Reste statt. Dies deutet darauf hin, daß die transiente Phosphorylierung der Kinase nicht einfach eine Dephosphorylierung ist, die durch die Akkumulation des ADP angetrieben wird. Möglicherweise liegt der transienten Phosphorylierung ein bisher nicht identifiziertes Intermediat zu Grunde, beispielsweise ein Histidinphosphat. Dieses könnte nicht nur den Phosphattransfer auf Tyrosin- und Serinreste bewerkstelligen, sondern auch an der Dephosphorylierung partizipieren. Wie oben beschrieben, könnte das zentrale, hochkonservierte H1118 dieses Intermediat ausbilden und mit den aktivierten Tyrosinen 1150/1151 interagieren. Weitere Evidenzen für ein Intermediat ergaben sich der Dephosphorylierung des GST-IRS1 unter ATP-Chase-Bedingungen. Keine der substituierten Reste erwies sich für den Verlust der Radioaktivität im Substrat als essentiell. Die Dephosphorylierung vom GST-IRS1 konnte auch in Abwesenheit von Poly-L-Lysin festgestellt werden und war an eine aktive Kinase gebunden, da EDTA den Vorgang

stoppte. Die C-terminale Domäne des Insulinrezeptors erwies sich nicht als wesentlich für die transiente Phosphorylierung des Substrats, könnte aber diese Reaktion modulieren. Dies wird belegt durch die verringerte Dephosphorylierung vom GST-IRS1 durch die Δ CT; zudem verlor GST-IRS1 weniger Radioaktivität in Serinresten, wenn die SSDD der Katalysator war.

Ungeklärt ist die Beobachtung, daß die IRKD nach Zugabe von Vanadat 30 % an Radioaktivität verlor, während der ATP-Umsatz unbeeinflusst blieb (6.2). Auch Tennagels (persönliche Mitteilung) beobachtete unter bestimmten Bedingungen (langsame Entfernung der Ionen) eine Dephosphorylierung der IRKD, deren Ursache ungeklärt ist. Wurde eine Chase-Reaktion mit einem Überschuß an GTP durchgeführt, verlor die IRKD ebenfalls 25-30 % der inkorporierten Phosphate. Allerdings ist dies weniger auf eine spezifische Bindung des GTP an die Kinase zurückzuführen, da diese in einer Autophosphorylierungsreaktion mit 250 μ M [γ - 32 P]GTP nur einen Einbau von 0,04 mol/mol (30 Minuten) erreichte und in der Initialgeschwindigkeit des Phosphateinbaus mindestens drei Größenordnungen unter der ATP-vermittelten lag (Daten nicht gezeigt). Es ist nicht anzunehmen, daß die Dephosphorylierung auf die hohe GTP-Konzentration (2,5 mM) der Chase-Reaktion zurückzuführen ist. Diese liegt näher am K_M für GTP als in der Autophosphorylierung mit GTP, doch ist damit kaum mehr als 0,4 mol/mol Einbau zu erwarten. Da GTP einen schlechteren Phosphatdonor für die IRKD darstellt, scheint nach der verzeichneten Dephosphorylierung des Enzyms keine Rephosphorylierung mehr möglich.

Über die Funktion der transienten Phosphorylierung kann nur spekuliert werden. Beim Zwei-Komponenten-System (Histidyl-Aspartyl-Relais) in Pro- und Eukaryoten könnte die transiente Ausbildung von instabilen Histidin- und Aspartatphosphaten dem „Umschalten“ zwischen zwei Konformationen dienen (Bourret *et al.*, 1989). Auf den Insulinrezeptor übertragen, könnten die C-terminalen Tyrosine als instabile Phosphorylierungsstellen betrachtet werden. Ihre De- und Rephosphorylierung könnte möglicherweise die Konformation der C-terminalen Domäne steuern. Es ist denkbar, daß die transiente Phosphorylierung als eine Art „Motor“ dient, um den C-Terminus ins aktive Zentrum hinein und/oder aus ihm heraus zu führen.

9.5.3 Transiente Phosphorylierung von Y1150/Y1151

Wird die transiente Phosphorylierung der Tyrosine 1316 und 1322 durch Substitutionen von Y1150 und Y1151 verringert, so wurde stattdessen eine De- und Rephosphorylierung der Kinasedomäne festgestellt (7.3). Mindestens eines der drei Tyrosine unterliegt offenbar ebenfalls einer transienten Phosphorylierung. Die IRKD besetzte zunächst Y1150/Y1151, während zu späteren Zeiten nur die Bis-Form Y1146/X nachzuweisen war. Auch unter Kurzzeit-Hot Chase-Experimenten bestätigte sich dies. Dazu wurde die IRKD für 10-20 Sekunden vorphosphoryliert und anschließend für 10-25 Sekunden

markiertes ATP hinzugefügt (Daten nicht gezeigt). Zu allen Zeiten wurde als Bis-Form jeweils nur Y1150/Y1151 markiert. Zwei Erklärungen bieten sich dafür an: Alle Bis-Formen Y1150/Y1151 werden durch Besetzung des Y1146 zur Tris-Form, welche stabil ist; die nur partiell oder nicht phosphorylierte Kinasedomäne wird anschließend aus nicht bekannten Gründen statt an Y1150/Y1151 an Y1146/X phosphoryliert. Es scheint nicht plausibel, wieso die Präferenz im Verlaufe der Autophosphorylierung wechseln sollte. Eine zweite Interpretation setzt ein Gleichgewicht zwischen bis- und trisphosphorylierter Form der Kinasedomäne voraus. Nach Erreichen der Tris-Form erfolgt eine kontinuierliche De- und Rephosphorylierung eines Tyrosinrestes. Da die Bis-Form zu späten Zeiten das phosphorylierte Y1146 enthält, muß das transiente Tyrosin Y1150 oder Y1151 sein. Unter den Bedingungen der Kurzzeit-Hot Chase-Versuche hieße das, daß mit nicht markiertem Phosphat besetztes Y1150 oder Y1151 dephosphoryliert und im Anschluß daran mit markiertem ATP rephosphoryliert würde; genau dies wurde beobachtet. Tornqvist *et al.* (1987) beschreiben eine nur partielle Besetzung des Y1150 im autophosphorylierten Rezeptor. Die Substitution des Y1151 führte zu einem marginal verringerten Phosphateinbau in die Kinase, was für eine nur partielle Besetzung dieses Restes in der Wildtypkinase spricht. Die Sequenzierung der Bis-Form Y1146/X sollte Aufschluß über den Phosphorylierungsstatus der Kinasedomäne und Einblick in der Mechanismus der transienten Phosphorylierung gewähren.

9.5.4 Ausblick

Die Mutationsanalyse der löslichen Insulinrezeptorkinase zur Analyse der dualen Aktivität war erforderlich, da die Daten der Literatur zumeist nur die Tyrosinphosphorylierung abdeckten und teilweise widersprüchlichen Ergebnissen lieferten. Die in dieser Arbeit durchgeführte *in vitro*-Untersuchung erlaubte einen direkten Vergleich der Auswirkungen der Aminosäuresubstitutionen bzw. Deletionen. In der Kinasedomäne führte die Substitution von Y1151 erstmalig zu einer Trennung der Tyrosin- von der Serinautophosphorylierung und einer veränderten transienten Phosphorylierung. Die Beobachtung, daß die dualspezifische Phosphorylierung von IRS-1 von keiner Mutation beeinflusst wurde, führte zu der Erkenntnis, daß sich der duale Mechanismus der IRKD nicht auf einen einzelnen Aminosäurerest reduzieren läßt. Möglicherweise reflektiert dieses Ergebnis unterschiedliche biologische Funktionen der Serinphosphorylierung am IRS-1 und der Serinautophosphorylierung der Kinase.

Duale Aktivitäten finden sich auch bei anderen Rezeptortyrosinkinasen wie dem IGF1R, dem EGFR und dem TrkB-R (Magg 1997; Affüpper 1998; Beemelmans 1997). Um dieses möglicherweise ubiquitäre Phänomen aufzuklären, sind weitere Untersuchungen nötig. Insbesondere bieten sich Mutanten für die Kristallstrukturanalyse an, denen die katalytische Base fehlt. Auf diese Weise werden multiple Phosphorylierungszustände vermieden, und Interaktionen zwischen dem Enzym und Substraten (ATP, Peptide) sind uneingeschränkt der Analyse zugänglich.

10 Methoden

10.1 Molekularbiologische Methoden

Folgende molekularbiologischen Methoden wurden gemäß Standardprotokollen nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt: Agarose-Gelelektrophorese, Fällung von DNA, Restriktionsendonukleolytische Spaltung, Ligation, Konzentrationsbestimmung von DNA. Plasmid-„Mini“-Präparationen für Restriktionsanalysen erfolgten nach Zhou *et al.* (1990) bzw. mit dem Qiagen-Kitsystem nach Herstellerangaben.

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem QiaExII-Kitsystem (Qiagen) oder dem Sephaglas™ BandPrep Kit (Pharmacia Biotech).

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Methode von Sanger *et al.* (1977). Dabei wurde das Standardprotokoll für Sequenzierung doppelsträngiger DNA aus dem T7-Sequencing™ Kit der Firma Pharmacia Biotech verwendet. Die Sequenzierungsansätze wurden mit Hilfe eines 5,5 %igen Acrylamidgels (Acryl-/N,N'-Methylbisacrylamid 19:1)/8 M Harnstoff/1 × TBE (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,0) bei 60 W aufgetrennt. Durch Zugabe eines halben Volumenanteils an 3 M Natriumacetat, pH 5 zum unteren Elektrodenpuffer 45 min nach dem letzten Probenauftrag wurde eine Kompaktierung der unteren Banden erreicht.

Zellen des *E. coli* Stammes DH5 α wurden bei 37 °C in Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) und auf LB-Agarplatten kultiviert (Sambrook *et al.*, 1989).

Kompetente Bakterien wurden nach Chung *et al.* (1989) mit TSS Puffer (85 % LB-Medium, 10 % (w/v) Polyethylenglykol, 5 % (v/v) DMSO, 50 mM MgCl₂, pH 6,5) hergestellt und bei -80 °C gelagert.

Die Transformation von Bakterienzellen erfolgte durch Hitzeschock (1,5 min, 42 °C).

Die Kultivierung von *E. coli* DH5 α und *E. coli* XL2-Blue in Luria-Bertani-LB Medium und LB-Agarplatten wurde nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

10.2 Konstruktion der Transfervektoren der pVL-IRKD-Derivate

Als Ausgangsvektor diente der Vektor pUC-IRKD, der die kodierende Sequenz für die cytoplasmatische Untereinheit des Insulinrezeptors trägt (Arg941-Ser1343, Tennagels 1995). Für die Generierung der pUC-IRKD-Derivate mit den Substitutionen Y1150F, Y1151F, SS1275/1309DD und CHH1044/1045/1046TRQ wurde das QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene verwendet. Dazu wurden die unter 11.4.3 beschriebenen, PAGE-gereinigten Oligonukleotidprimer verwendet, die zu den entsprechenden Aminosäureaustauschen führen. Neben den substituierten Basen für die Mutagenesereaktion tragen die Oligonukleotide stille Mutationen, die zur Erzeugung jeweils einer weiteren Schnittstelle führt. Diese kann genutzt werden, um die

erhaltenen Plasmid-Derivate durch Restriktionsanalyse hinsichtlich der eingeführten Mutation zu überprüfen.

Das Verfahren basiert auf einer PCR-ähnlichen Mutagenese. Dazu wird der Ausgangsvektor (hier: 20 ng) zusammen mit einem Überschuß der entsprechenden Oligonukleotiden in einer PCR mit 12-14 Zyklen eingesetzt und der Reaktionsansatz anschließend durch einen Restriktionsansatz mit der Endonuklease Dpn I inkubiert. Dpn I spaltet spezifisch methylierte und hemimethylierte parentale DNA, nur neusynthetisierte Moleküle bleiben erhalten. Diese, die gewünschte Mutation enthaltenden zirkulären Plasmide mit Einzelstrangbrüchen werden im nächsten Schritt in *E. coli* XL2-Blue ultrakompetente Zellen transformiert. Durch die niedrige Fehlerrate beim Nukleotideinbau der Pfu DNA-Polymerase (Cline *et al.*, 1996) und eine niedrige Zyklenzahl wird eine hohe Mutationseffizienz erreicht (bis 98 %) und gleichzeitig die Möglichkeit zufälliger Mutationen während der Reaktion verringert. Die Polymerase-Reaktion und die Transformation ultrakompetenter *E. coli* XL2-Blue Zellen erfolgten nach den Angaben des Herstellers mit 1 µl Ansatz in 35 µl Bakterien. Nach Durchführung der Mutagenesereaktion wurde die Plasmid-DNA der erhaltenen Klone hinsichtlich ihrer neuen Restriktionsschnittstelle überprüft und die Einführung der Mutationen durch DNA-Sequenzierung nach Sanger *et al.* (1977) verifiziert.

Ein Restriktionsschnitt mit Bam HI und Pst I führt beim 4075 Bp großen pUC-IRKD-Vektor zu einem 2668 Bp-Fragment und einem 1407 Bp großen Fragment, welches die cDNA der IRKD besitzt. Werden diese zusätzlich an den neu inserierten Schnittstellen gespalten, führt dies zu charakteristischen Fragmentlängen: pUC-IRKD-Y1150F und pUC-IRKD-Y1151F mit Eco RV 2668, 782 und 625 Bp; pUC-IRKD-SS1275/1309DD mit Bam HI 2668, 1114 und 293 Bp bzw. mit Sac I (ohne Bam HI) 2653, 1039 und 383 Bp; pUC-IRKD-CHH1044/1045/1046TRQ mit Mlu I 2668, 1082, 325 Bp; pUC-IRKD-D1120A mit Sac I (ohne Bam HI) 2653, 856 und 566 Bp. Diese können im Agarosegel eindeutig identifiziert werden.

Bei IRKD-SS1275/1309DD wurden die beiden Mutationen nacheinander eingeführt. Die sequenzierte DNA der Klone wurde jeweils mit Bam HI und Pst I aus dem pUC19-Vektor isoliert und in den Bam HI/Pst I linearisierten Transfervektor pVL1393 subkloniert. Zur Kontrolle der Klonierung wurden die pVL-IRKD-Vektoren mit Bam HI, Pst I und den entsprechenden Restriktionsenzymen der eingeführten Schnittstellen geschnitten.

Das Derivat pVL-IRKD-C1296S wurde durch Ligation des mutierten Insulinrezeptor-C-Terminus aus pGEX-3X (Goder 1995) in pUC-IRKD und anschließende Subklonierung mittels Bam HI/Pst I-Schnitten gewonnen (Nölle 1995).

10.3 Expression und Reinigung der löslichen Insulinrezeptorkinase IRKD und ihrer Varianten

10.3.1 Expression im Baculovirus-Expressionssystem

10.3.1.1 Zellkultur

Die Kultivierung von *Spodoptera frugiperda* (Sf9) Zellen erfolgte in Grace's Insektenmedium (10 % fötales Kälberserum (hitzeinaktiviert, v/v), 50 µg/ml Gentamicinsulfat, 2,5 µg/ml Amphotericin B) als Suspensionskultur oder in Gewebekulturflaschen bei 27 °C. Um eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml Kulturmedium zu gewährleisten, wurde dreimal pro Woche passagiert. Die Herstellung und Lagerung von gefrorenen Sf9-Zellen erfolgte nach Summers und Smith (1987). Eine aufgetaute Zellcharge wurde nicht länger als drei Monate verwendet. Infektionen wurden ausschließlich mit Kulturen durchgeführt, deren Generationszeit 18-24 h betrug und eine Vitalität von > 97 % aufwiesen. Die Kotransfektion von Transfervektor und AcNPV-DNA, die Isolation rekombinanter Baculoviren durch Plaque-Assay, Virusamplifikation, Titerbestimmung und Bestimmung des Expressionsmaximums erfolgte nach Summers und Smith (1987) und den Herstellerangaben des verwendeten BaculoGold™ Transfection Kit (PharminGen).

10.3.1.2 Infektion, Proteinexpression und Ernte von Sf9-Zellen

Für die Proteinexpression der löslichen Kinasen wurden Sf9-Zellen mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 5-10 für 55-65 h infiziert. MOI bezeichnet die Anzahl der Plaquebildenden Einheiten (*plaque forming units, pfu*) pro Zelle.

- Sf9-Zellen (1×10^6 Zellen/ml) aus Suspensionskultur abzentrifugieren ($1000 \times g$, 27 °C)
- Zellsediment in virushaltigem Medium resuspendieren (1×10^7 Zellen/ml, MOI 5-10)
- Inkubation bei 27 °C für 1 h
- Zugabe von neuem Medium (1×10^6 Zellen/ml) und für 55-65 h inkubieren
- Zellen abzentrifugieren ($10000 \times g$, 4 °C, 10 min)
- Zellpellet in PBS-Lösung resuspendieren und erneut abzentrifugieren ($10000 \times g$, 10 min, 4 °C)

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

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

- Aufschlußpuffer: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 0,25 M Saccharose, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin
- Zellen in Aufschlußpuffer resuspendieren (10^7 Zellen/ml)
- 3×5 sec sonifizieren (100 Watt, auf Eis)

- unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation entfernen (10 min, 10000 × g)
- Überstand abnehmen (auf Eis lagern)
- Pellet in Aufschlußpuffer resuspendieren (10^7 Zellen/ml) und zentrifugieren (10 min, 10000 × g)
- Überstände vereinigen, erneute Zugabe von 1 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin und 45 min bei 120000 × g zentrifugieren
- Überstand abnehmen und Proteinbestimmung durchführen.

Das erhaltene Lysat enthielt durchschnittlich 1,5-2,5 mg Protein/ml und wurde in Aliquots von 5-8 ml nach Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert oder direkt weiterverwendet.

10.3.2 Reinigung der löslichen Insulinrezeptorkinase

Die Reinigung der Rezeptorkinase und ihrer verschiedenen Varianten erfolgte in Anlehnung an Villalba *et al.* (1989) und Al-Hasani (1995). Dabei werden zwei aufeinanderfolgende chromatographische Verfahren, Anionenaustausch- und hydrophobe Interaktionschromatographie, angewandt. Die Anionenaustauschchromatographie erfolgte mit einer 1 ml ResourceQ-Säule (Pharmacia Biotech), die hydrophobe Interaktionschromatographie mit einer 1 ml Phenyl-Sepharose Fast Flow (High Sub)-Säule (Pharmacia Biotech) in Verbindung mit einer BioLogic Chromatographieanlage (Bio-Rad). Die Vorschrift für die nachfolgende Reinigung gilt für cytosolischen Überstand aus $6-7 \times 10^7$ Zellen (8 ml, ca. 15 mg Protein) bei 20 °C.

10.3.2.1 Anionenaustauschchromatographie

- Chromatographie-Puffer:

Puffer A: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 mM DTT

Puffer B: 50 mM Tris /HCl, pH 7,5, 1 M NaCl, 1 mM DTT

- Zell-Lysat auf 0,1 M NaCl einstellen, filtrieren (0,45 µM Filter) und 5 min (5000 × g, 4 °C) zentrifugieren
- Säule (Resource Q) mit 10 ml 10 % Puffer B äquilibrieren, Flußrate 2 ml/min
- Probe in Probenschleife geben
- Gradient starten: 8 ml Probeninjektion, 7 ml Säule waschen mit 10 % Puffer B, linearer Gradienten 10-30 % B in 12 ml, Flußrate wie beim Probenauftrag
- Fraktionen von 0,5 ml sammeln und die die Kinase enthaltenen Fraktionen vereinigen, Zugabe von 1 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin

Die löslichen Kinasen eluierten bei ca. 23 % Puffer B (0,2 M NaCl), 26 mS/cm von der Säule.

10.3.2.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie mit Phenyl-Sepharose

- Chromatographie-Puffer:

Puffer A: 50 mM Tris /HCl, pH 7,5, 1 mM DTT

Puffer B: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 20 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (% Sättigung), 0,25 M NaCl, 1 mM DTT

- Säule mit 10 ml Puffer B äquilibrieren, Flußrate 1 ml/min
- Probe (aus Anionenaustauschchromatographie) mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auf 20 % Sättigung einstellen
- Probe in Probenschleife geben
- Gradient starten: 3 ml Probeninjektion, 2 ml Säule waschen mit 100 % Puffer B, Stufengradient 2 ml 50 % B, 4 ml 25 % B, 4 ml 10 % B, 6 ml 0 % B, Flußrate wie beim Probenauftrag
- Fraktionen von 1 ml sammeln und die die Kinase enthaltenen Fraktionen vereinigen
- Fraktionen im Mikrokonzentrator (Centricon™ C30) einengen und dreimal mit 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 mM DTT waschen
- auf 0,5-1,5 mg/ml konzentrieren und à 5-10 µl aliquotieren
- SDS-PAGE zur Reinheitskontrolle, Proteinbestimmung und Kinaseaktivitätstest durchführen

Die gereinigten Kinasen wurden schockgefroren bei -80 °C gelagert.

10.4 Protein-Biochemische Methoden

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

10.4.1 Transfer und immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membran

Der Transfer von Proteinen erfolgte im Semi-Trockenblot-Verfahren nach der SDS-PAGE auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF, 0,22 µm) mit kontinuierlichem Puffersystem oder durch manuellen Transfer nach Plekhanov (1996). Vor dem Proteintransfer wurde die Membran für 10 sec in Methanol aktiviert und anschließend in Blotpuffer äquilibriert.

- Blotpuffer: 50 mM Tris, 40 mM Glycin.

Im Semi-Trockenblot-Verfahren erfolgte der Transfer je nach Molekulargewicht des zu analysierenden Proteins für 20-40 min bei einer Stromstärke von 1 mA/cm².

Beim manuellen Verfahren erfolgte der Transfer durch Auflage der PVDF-Membran auf das SDS-Gel und anschließender Ausübung eines gleichmäßigen Druckes.

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

▪ Puffer:

TBS: 150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 7,4

TBST: TBS mit 0,1 % (v/v) Tween 20 (Polyoxyethylsorbitmonolaureat)

PBS: 140 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 3 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,2

▪ Antikörper:

α-GST-CT: polyklonaler Antikörper gegen GST-CT aus Kaninchen

α-GST-JM: polyklonaler Antikörper gegen GST-JM aus Kaninchen

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

- PVDF-Membran in PBS waschen
- PVDF-Membran 60 min blocken in 1 % (w/v) Rinderserumalbumin (BSA) in PBS
- 2 × 3 min waschen mit TBST
- Membran 1 h mit ersten Antikörper inkubieren
- 5 × 5 min waschen mit TBST
- Membran 1 h mit zweiten Antikörper inkubieren
- 5 × 5 min in TBST waschen
- PVDF-Membran mit 5 ml Entwicklungspuffer überschichten, bis Banden sichtbar, stoppen in H₂O

▪ Entwicklungspuffer:

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

33 µl NBT: 50 mg/ml in 70 % (v/v) Dimethylformamid

16 µl BCIP: 50 mg/ml in 100 % (v/v) Dimethylformamid

α-GST-CT und α-GST-JM wurden 1:1000 in TBS mit 1 % BSA, GαR-AP nach Herstellerangaben 1:2000-1:3000 in TBS mit 1 % BSA verdünnt.

10.4.2 Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen wurden nach Minamide und Bamberg (1990, Coomassie Spot-Test) oder nach einer modifizierten Methode nach Bradford (1976), modifiziert nach Rylatt und Parish (1982), in einer 96 Loch-Mikrotiterplatte durchgeführt. Als Eichprotein wurde Rinderserumalbumin (BSA) verwendet.

10.4.2.1 Coomassie Spot-Test

- Färbelösung: 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 10 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure
- Entfärbelösung: 10 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure
- 1 µl der zu analysierenden Probe auf Filterpapier (Munktell Grade F1) pipettieren
- 1 µl der Standard-Eichreihe (BSA: 0,1-5 µg/µl) auf Filterpapier pipettieren
- Papier trocknen und mit Färbelösung bedecken
- Papier solange entfärben, bis der Hintergrund weiß ist

Die Auswertung erfolgte über den optischen Vergleich der Farbintensitäten von Eichreihe und Probe. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,1 µg/µl.

10.4.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

- Färbelösung: 1,9 % (w/v) Perchlorsäure, 0,06 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250
- 100 µl verdünnter Probe in eine Mikrotiterplatte vorlegen
- Zugabe von 100 µl Färbelösung und 5 min inkubieren
- Messen der Färbung bei einer Wellenlänge von 595 nm (Referenzwellenlänge 405 nm)

Anhand einer Eichreihe aus 0,2-2 µg BSA/100 µl wird die Proteinkonzentration der Probe ermittelt.

10.5 Phosphorylierungsreaktionen

Die Reaktionsansätze für die Phosphorylierungsreaktionen der IRKD und ihrer Varianten hatten unter Standardbedingungen folgende Zusammensetzung:

1 µM Kinase, 1 µM Poly-L-Lysin (15-30 kDa), 250 µM [γ -³²P]ATP, 5 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 1 mg/ml protease- und phosphatasefreies BSA Fraktion V in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5. Die Reaktionen wurden bei Raumtemperatur (19-26 °C) durch Zugabe des Enzyms gestartet und durch Zufügen von reduzierendem SDS-Probenpuffer beendet. Die Ansätze für Substratphosphorylierungen entsprachen den Ansätzen der Autophosphorylierung. Für die Bestimmung des ATP-Umsatzes wurde zusätzlich 1 µCi [α -³²P]ATP eingesetzt.

Unter Chase-Bedingungen wurde nach einer bestimmten Zeit der Autophosphorylierungsansatz in 1/10 Volumen 25 mM ATP, pH 7,5 gegeben und so die spezifische Aktivität verdünnt. Entsprechend wurde dem Reaktionsansatz unter Hot Chase-Bedingungen nach Autophosphorylierung mit nicht markiertem ATP 5-20 µCi [γ -³²P]ATP hinzugefügt. Bei der Bestimmung der spezifischen Aktivität bei der [γ -³²P]ATP-Zugabe in der Hot Chase-Reaktion wurde der ATP-Verbrauch zu diesem Zeitpunkt berücksichtigt.

10.6 Bestimmung des Phosphateinbaus

Zur Bestimmung der inkorporierten Radioaktivität nach Auto- oder Substratphosphorylierungsreaktionen wurden zwei Methoden angewendet. Die Radioaktivität des inkorporierten radioaktiven Phosphates wurde durch Messung der Cerenkovstrahlung im Tritium-(^3H) Fenster des β -Szintillationszählers ermittelt.

10.6.1 Dot-Blot auf Phosphozellulose-Papier (Sahal und Fujita-Yamaguchi, 1987)

Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration 33 mM) beendet und 5 μl auf Whatman P81-Papier aufgetragen. Das Papier wurde anschließend viermal für 15 min mit eiskalter 10 % (w/v) TCA/10 mM Natriumpyrophosphat und abschließend für 10 min mit Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurden die Probenfelder ausgeschnitten und die Radioaktivität durch Messung der Cerenkov-Zählung bestimmt.

10.6.2 SDS-PAGE

Die Reaktion wurde durch Zugabe von SDS-Probenpuffer (100 mM DTT) beendet. Die Proben (10 pmol Kinase/Meßwert) wurden 5 min bei 95 °C denaturiert und danach die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde 20 min fixiert (50 % Methanol, 7 % Essigsäure) und auf einem Gelrockner zwischen einer Zellulosefolie unter Vakuum getrocknet. Durch Autoradiographie des getrockneten Gels wurden die radioaktiven Proteinbanden lokalisiert und die Banden ausgeschnitten. Die Radioaktivität der Gelstücke wurde durch Messung der Cerenkovstrahlung bestimmt.

10.7 Phosphoaminosäure- und Nukleotidanalyse

10.7.1 Tryptische Spaltung von Proteinen im SDS-Gel

Für die Generierung tryptischer Peptide für die Phosphoaminosäureanalyse oder HPLC-Analyse wurden die Proteine nach SDS-PAGE aus dem Gelstück eluiert (nach Rosenfeld *et al.*, 1992).

- Proteinbande aus dem getrockneten SDS-Gel ausschneiden
- Gelstück kurz in H_2O aufweichen und Zellulosefolie entfernen, H_2O entfernen
- Gelstück in 500 μl CH_3CN bei 37 °C 30 min dehydratisieren, CH_3CN abnehmen
- Gelstück 15 min unter Vakuum (Speed-Vac) trocknen
- Gelstück mit 5 μl Spaltungspuffer (50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, pH 8,3) rehydratisieren
- 10 μl Trypsin (1 mg/ml) ins Gelstück einziehen lassen
- Zugabe von dreimal 5 μl und einmal 300 μl Spaltungspuffer
- Inkubation über Nacht bei 37 °C
- Überstand abnehmen und Zugabe von 300 μl H_2O für 1,5-2 h bei 42 °C

– Überstände vereinigen

Die Ausbeute an eluierter Radioaktivität beträgt bei diesem Verfahren 85-95 %.

10.7.2 Phosphoaminosäureanalysen

Die zu analysierenden Proben aus der tryptischen Elution wurden unter Vakuum (Speed-Vac) getrocknet und einer sauren (250 µl 6 N HCl, 2 h, 110 °C) oder alkalischen Partialhydrolyse (250 µl 3 N KOH, 4 h, 110 °C) unterworfen. Nach Entfernen der Säure unter Vakuum (Speed-Vac) wurden die Proben einmal mit H₂O gewaschen und erneut getrocknet. Die KOH wurde mit Hilfe des Kationenaustauschmaterials AG 50W-X8 (Bio-Rad) entfernt. Die Radioaktivität der getrockneten Eluate wurde im Cerenkov-Zähler bestimmt und die Proben in H₂O aufgenommen (1000 cpm/µl). Zur Analyse der Phosphoaminosäurezusammensetzung kamen zwei Methoden zur Anwendung:

10.7.2.1 *Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel 60 (Munoz und Marshall, 1990)*

Mobile Phase: Ethanol/25 % (w/v) Ammoniumhydroxid (2,19:1)

Laufbedingungen: 2 Chromatographie-Läufe, bis das Laufmittel ca. 1 cm vom oberen Rand entfernt ist. Platte zwischen den Läufen bei 50 °C trocknen

10.7.2.2 *Zweidimensionale Dünnschicht-Elektrophorese auf Zellulose (Boyle et al., 1991)*

Laufpuffer: 1. Dimension: Ameisensäure 88 %/Eisessig/H₂O (5:15,6:179,4), pH 1,9
2. Dimension: Eisessig/Pyridin/0,5 M EDTA/H₂O (10:1:0,2:188,8), pH 3,5

Laufbedingungen: 1. Dimension: 15-20 min, 1300 V, 4 °C
2. Dimension: 10-15 min, 1300 V, 4 °C

Zwischen den Läufen wurden die Platten bei Raumtemperatur getrocknet.

Bei allen angewandten Methoden wurden 500-1000 cpm Hydrolysat verwendet. Dabei diente eine Mischung aus Phosphoserin, Phosphothreonin und Phosphotyrosin (jeweils 1 µg) als Standard, der jeweils auf den Auftragungspunkt pipettiert wurde (0,5 µl). Bei den elektrophoretischen Analysen diente eine Mischung aus ε-Dinitrophenyl-Lysin (DNP-Lysin 5 mg/ml in H₂O) und Xylencyanol FF Blue (1 mg/ml in H₂O) als Farbmärker (0,5 µl). Nach Durchführung der Trennungen wurden die Platten mit 0,2 % (w/v) Ninhydrin in Ethanol besprüht und die Standards durch Erhitzen bei 80 °C sichtbar gemacht. Auf diese Weise können die relativen Positionen der Phosphoaminosäuren den radioaktiven Signalen nach Autoradiographie zugeordnet werden. Die quantitative Auswertung der Phosphoaminosäurezusammensetzung erfolgte durch Phospho-Imager-Analyse.

10.7.3 Nukleotidanalyse

Die Bestimmung des ATP-Umsatzes der IRKD-Autophosphorylierungsreaktion wurde durch Analyse der ATP-, ADP- und AMP-Zusammensetzung durch Dünnschichtchromatographie nach Jost und Hauck (1983) durchgeführt. In der Reaktion wurde entweder ein Gemisch von [α - 32 P]ATP und [γ - 32 P]ATP im Verhältnis von etwa 1:1 oder reines [α - 32 P]ATP eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Kinase gestartet. Zu verschiedenen Zeiten wurden Aliquots entnommen. 1 μ l des Ansatzes wurde zu 100 μ l einer 300 μ M EDTA-Lösung gegeben und auf Eis gelagert. Zum gleichen Zeitpunkt wurde die [γ - 32 P]ATP-Reaktion durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Die Proteine wurden in einer SDS-PAGE getrennt und die Phosphatinkorporation durch Messung der Cerenkovstrahlung ermittelt (vgl. 10.6.2). Zur Bestimmung der einzelnen Nukleotidanteile (ATP, ADP, AMP) wurden die in EDTA gelösten Proben verwendet. Dazu wurden 1000 cpm (1 μ l) auf eine 10 \times 10 cm Kieselgel 60 (HPTLC NH₂F₂₅₄S) Platte aufgebracht. Als Standards wurde jeder Probe je 1 μ g ATP, ADP und AMP zugesetzt.

Laufmittel: 200 mM NaCl, 30 % (v/v) Ethanol/H₂O

Laufbedingungen: Chromatographie bis Laufmittelfront ca. 1 cm vor oberem Ende der Platte

Nach Durchführung der Trennung wurde die Platte getrocknet und die Standards im UV-Licht (254 nm) lokalisiert. Die quantitative Auswertung der radioaktiven Signale erfolgte mittels Phospho-Imager-Analyse.

10.8 HPLC-Analyse tryptischer Peptide der Insulinrezeptorkinase (Phosphopeptid-Kartierung)

Durch tryptische Proteolyse lassen sich aus der cytoplasmatischen phosphorylierten Domäne der löslichen Insulinrezeptorkinase Phosphopeptide generieren, die sich durch HPLC-Anionenaustauschchromatographie voneinander trennen lassen (Al-Hasani *et al.*, 1997). Die Auftrennung des Phosphopeptid-Gemisches durch HPLC-Anionenaustauschchromatographie (Trennsäule: Nucleogel SAX1000-8/46, 50 \times 4,6 mm) mit einem zweistufigen Salzgradienten führt zur Separation von 14 Radioaktivität enthaltenden, unterscheidbaren Fraktionen. Die Sequenz der darin enthaltenen Phosphopeptide konnte Al-Hasani durch direkte Edman-Sequenzierung ermitteln. Somit ist es möglich, jedem einzelnen Elutionssignal 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 (Al-Hasani *et al.*, 1997). Das standardisierte Protokoll erlaubt demnach die Analyse des Phosphorylierungsstatus der einzelnen Phosphorylierungsstellen im Enzym. Für

Phosphopeptid-Kartierungen wurden Auto- und Substratphosphorylierungsreaktionen durchgeführt (Kap. 9.5). 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 (9.7.1) und die HPLC-Analyse durchgeführt; das verwendete Trypsin war „sequencing grade“ oder TPCK-behandelt. Die Probe sollte wenigstens 10.000 cpm, besser 100.000 cpm enthalten und ein Volumen von 500-700 μ l nicht überschreiten.

- Laufpuffer

Puffer A: 20 mM Ammoniumacetat, pH 7,0

Puffer B: 1 M Kaliumdihydrogenphosphat, pH 4,0

- Tryptisches Eluat mit Puffer A auf 1 ml auffüllen und bei $10000 \times g$ für 5 min zentrifugieren
- Säule mit 20 ml Puffer A äquilibrieren
- Säule mit Probe beladen, Flußrate: 0,5 ml/min
- dreistufigen linearen Gradienten anlegen: 0-10 min: 0 % B, 10-50 min: 10 % B, 50-125 min: 50 % B, Flußrate 0,5 ml/min
- Fraktionen von 0,5 ml sammeln, Radioaktivität durch Messung der Cerenkovstrahlung ermitteln
- Alternativ Cerenkovstrahlung mittels Durchflußradiometer (Packard) bestimmen: 0,5 ml Flußzelle, 8 sec Meßzeit, 0-24 keV-Fenster, Lumineszenz-Korrektur.

Die Phosphoaminosäurezusammensetzung einzelner Signalspitzen des Elutionsprofils kann durch Phosphoaminosäureanalyse ermittelt werden (s. 10.7.2). Dazu muß allerdings zuvor das in den Fraktionen störende Salz durch Reversed-Phase-Chromatographie mit Hilfe einer C_8 -Säule entfernt werden:

- vereinigte Fraktionen einer Signalspitze auf 0,1 % Trifluoressigsäure in H_2O (TFA, v/v) einstellen
- C_8 -Säule mit 0,1 % (v/v) TFA in H_2O äquilibrieren
- Probe mit Spritze auf Säule auftragen
- Säule mit 1 ml 0,1 % (v/v) TFA in H_2O waschen
- Elution der Peptide mit 0,5 ml 0,1 % (v/v) TFA in Isopropanol
- Lösungsmittel unter Vakuum (Speed Vac) entfernen, Phosphoaminosäureanalyse durchführen

10.9 Spektrometrische Messungen mit dem Phosphatdonor 2-Methoxybenzoylphosphat

2-Methoxybenzoylphosphat (2-MBP) ist ein aromatisches Acylphosphat, das Phosphatase und Histidinkinase als Substrat dienen kann (Paoli P. *et al.*, 1995; Schuster, persönliche Mitteilung). Hydrolyse von 2-MBP führt zu einer leichten Zunahme der Extinktion bei 280 nm und zu einer starken Abnahme bei 300 nm. 2-MBP besitzt bei pH 5-8,6 eine Halbwertszeit von 16,5 h. Gemessen wurden in 200 μ l 50 mM Tris/HCl pH 7,5 mit folgenden Zusätzen: 1) 700 nmol 2-MBP; 2) wie 1) aber zusätzlich 0,1 mg/ml BSA; 3) 20 pmol IRKD und Kinasepuffer (s. 10.5) ; 4) wie 3) aber zusätzlich 200 nmol 2-MBP; 5) wie 4) aber zusätzlich 50 μ M ATP; 6) 200 Einheiten alkalische Phosphatase mit entsprechendem Puffer und 400 nmol 2-MBP. Es wurden die Änderungen der Extinktionen zwischen 250 und 330 nm für maximal 50 min verfolgt.

10.10 Computeranalyse

Für die Simulation von Restriktionsspaltungen und Ligationen verschiedener DNA-Sequenzen und Vektoren wurden das Programm Clone 3.11 (Scientific & Educational Software) verwendet. Oligonukleotidprimer für die Mutagenese und Sequenzierung wurden mit dem Programm Oligo 4.0 (Wojciech Rychlik) entworfen und analysiert. Sequenzanalysen und Homologievergleiche wurden mit den Programmen WU-Blastp+Beauty, SIM und Align (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/> sowie <http://www.expasy.ch/www/tools.html>) durchgeführt. Die Bestimmung der kinetischen Konstanten K_M und V_{MAX} (mittels Lineweaver-Burk-, Hanes-, Eadie-Hofstee- und Parameter Space-Diagrammen sowie hyperbolischer Regressionsanalyse) der löslichen Insulinrezeptorkinasen für Auto- und Substratphosphorylierungen erfolgte mit dem Programm Hyper 1.1s (Wilkinson 1961; Duggleby 1981). pI-Werte und Molekulargewichte der Proteine wurden rechnerisch mit dem Programm „Compute and pI/Mw tool“ bestimmt (http://expasy.hcuge.ch/ch2d/pi_tool.html). Proteininformationen wurden aus den Datenbanken EMBL, PIR, SWISS-PROT und PDB bezogen.

11 Material

11.1 Chemikalien

Acetonitril, gradient grade	Merck, Darmstadt
Acrylamid, 2x krist., p.a.	Serva, Heidelberg
Acrylamid, 4x krist., analytical grade	Serva, Heidelberg
Adenosin-5'-diphosphat (ADP), krist. Dinatriumsalz	Boehringer, Mannheim
Adenosin-5'-monophosphat (AMP), krist. Dinatriumsalz	Boehringer, Mannheim
Adenosin-5'-triphosphat (ATP), krist. Dinatriumsalz	Boehringer, Mannheim
Agarose	Seakem, Hameln
Ameisensäure, 98-100 %	Merck, Darmstadt
Ammoniumacetat	Fluka, Buchs/Schweiz
Ammoniumcarbonat	Merck, Darmstadt
Ammoniumhydroxid-Lösung, 25 %	Fluka, Buchs/Schweiz
Ammoniumper(oxodi)sulfat (APS), analytical grade	Serva, Heidelberg
Ammoniumsulfat, p.a.	Merck, Darmstadt
Borsäure, p.a.	Merck, Darmstadt
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau (BPB), Natriumsalz, research grade	Serva, Heidelberg
(Coomassie Brilliant) Blue G-250	Serva, Heidelberg
(Coomassie Brilliant) Blue R-250	Serva, Heidelberg
2,7-Diamino-10-ethyl-9-phenyl-phenanthridiniumbromid (Ethidiumbromid)	Sigma, Deisenhofen
Di-Kaliumhydrogenphosphat-trihydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
N, N'-Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
ϵ -Dinitrophenyl-L-Lysin-hydrochlorid (DNP-Lys)	Sigma, Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure, > 97 %, p.a.	Roth, Karlsruhe
Ethanol absolut, p.a.	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA, Titriplex III®), p.a.	Merck, Darmstadt
Glycerol (Glycerin)	Serva, Heidelberg
Glycin, electrophoresis grade	ICN, Aurora/Ohio/USA

Harnstoff p.a.	Roth, Karlsruhe
Isopropanol, p.a.	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid-hexahydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat, p.a.	Merck, Darmstadt
di-Kaliumhydrogenphosphat-trihydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid, Plätzchen	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid-hexahydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
Mangan(II)chlorid-tetrahydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
Methanol, p.a.	Roth, Karlsruhe
2-Methoxybenzoylphosphat	Dr. Schuster, MPI Martinsried
N, N'-Methylenbisacrylamid, research grade	Serva, Heidelberg
Natriumacetat, wasserfrei, p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumazid, reinst	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid, p.a.	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-monohydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma, Deisenhofen
Natriumpyrophosphat-decahydrat, p.a.	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydroxid, Plätzchen	Merck, Darmstadt
Natronlauge (Titrisol®)	Merck, Darmstadt
Ninhydrin, p.a.	Merck, Darmstadt
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Sigma, Deisenhofen
(PCR-) Nukleotid-Mix	Boehringer, Mannheim
Perchlorsäure, 70 %	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen
o-Phospho-L-Serin	Sigma, Deisenhofen
o-Phospho-L-Threonin	Sigma, Deisenhofen
o-Phospho-L-Tyrosin	Sigma, Deisenhofen
o-Phosphorsäure, 99 % krist., reinst, p.a.	Merck, Darmstadt
Polyethylenglykol 8000 (PEG-8000) bzw. 6000	Serva, Heidelberg
Poly(Glu:Tyr) _{4:1}	Sigma, Deisenhofen

Poly-L-Lysin, Hydrobromid, 15-30 kDa	Sigma, Deisenhofen
Pyridin, p.a.	Merck, Darmstadt
Repel-Silane ES Plus one	Pharmacia Biotech, Freiburg
D(+)-Saccharose, kristallin, p.a.	Roth, Karlsruhe
Salzsäure, 25 %	Merck, Darmstadt
N, N, N', N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Trichloressigsäure (TCA), kristallin	Sigma, Deisenhofen
Trifluoressigsäure (TFA), f. d. Spektr.	Merck, Darmstadt
Triton-X-100®, p.a.	Boehringer, Mannheim
Tris[hydroxymethyl]aminomethan (TRIS)	Sigma, Deisenhofen
Tween-20 (Polyoxyethylensorbitmonolaureat)	Bio-Rad, München
Tyrphostin A47	Boehringer, Mannheim
Xylen Cyanol FF (XC)	Sigma, Deisenhofen

11.2 Radiochemikalien

[α - ³² P]-Adenosin-5'-Triphosphat, ~ 3000 Ci/mmol	Amersham, Braunschweig
[γ - ³² P]-Adenosin-5'-Triphosphat, > 5000 Ci/mmol	Amersham, Braunschweig
[γ - ³² P]-Guanosin-5'-Triphosphat, > 5000 Ci/mmol	Amersham, Braunschweig
[α - ³⁵ S]-Desoxyadenosin-5'-[α -Thio]-Triphosphat, > 1000 Ci/mmol	Amersham, Braunschweig

11.3 Antikörper und Enzyme

Antikörper:

G α R-AP (goat anti rabbit, alkalische Phosphatase konjugiert)	Boehringer, Mannheim, BioRad, München
α -GST-CT (polyklonaler Antikörper gegen GST-CT des IR (Kaninchen))	Dr. Al-Hasani (1995)
α -GST-JM (polyklonaler Antikörper gegen GST-JM des IR (Kaninchen))	Dr. Al-Hasani (1995)
<u>DNA-modifizierende Enzyme:</u>	
Shrimps Alkalische Phosphatase	USB, Bad Homburg
T4-DNA-Ligase	Boehringer, Mannheim
T7-DNA-Polymerase	Pharmacia Biotech, Freiburg
Pfu [®] -DNA-Polymerase	Stratagene, Heidelberg

Restriktionsenzyme

Boehringer, Mannheim
MBI Fermentas, St. Leon-Rot
NEB, Schwalbach/Taunus

Proteasen:

Trypsin (aus Rinderpankreas)

Boehringer, Mannheim

Trypsin, Sequencing grade

Sigma, Deisenhofen

Trypsin, TPCK-behandelt

Sigma, Deisenhofen

Proteine:

Rinderserumalbumin (BSA)

Serva, Heidelberg

Rinderserumalbumin (BSA), Cohn fraction V, pure,
protease- und phosphatasefrei

Serva, Heidelberg

11.4 Nukleinsäuren

11.4.1 DNA

Linearisierte und modifizierte AcNPV-DNA

PharminGen, USA

11.4.2 Plasmidvektoren

pUC19

Pharmacia Biotech, Freiburg

pUC19-IRKD

Tennagels (1995)

pVL1393

PharminGen, USA

11.4.3 Oligonukleotide

Sequenzierungsprimer:

Zur Kontrolle der Mutation in IRKD-Y1150F, IRKD-Y1151F, IRKD-D1120A:

Upper 5'-GGAGTGGTGTCCAAGGGCCAG-3'

Lower 5'-CAGTTGTCGGGTGATCCAG-3'

Zur Kontrolle der Mutationen in IRKD-SS1275/1309DD:

Upper 5'-GATGGAGGGTATCTGGATCA-3'

Upper 5'-GCACCCCAGCTTTCCAGAGG-3'

Lower 5'-CCTCGTAGCTCCGCTTGAAA-3'

Lower 5'-CCAGAGGAAAGCGAAAATGG-3'

Zur Kontrolle der Mutation in IRKD-C1296S:

Upper 5'-GATGGAGGGTATCTGGATCA-3'

Lower 5'-CCTCGTAGCTCCGCTTGAAA-3'

Zur Kontrolle der Mutation in IRKD-CHH1044/1045/1046TRQ:

Upper 5'-CCGCTGGGACCGCTTTACGC-3'

Lower 5'-GTAGGGGGAGGGCGGCCAGG-3'

Mutageneseprimer für die Generierung der IRKD-Derivate:

Unterstrichen: mutierte Reste, gestrichelt: eingeführte Restriktionsschnittstellen

Y1150F, Eco RV

Upper 5'-GACCAGAGATATCTATGAAACGGATTCTACCGGAAAG-3'

Lower 5'-CTTTCCGGTAGAAATCCGTTTCATAGATATCTCTGGTC-3'

Y1151F, Eco RV

Upper 5'-GACCAGAGATATCTATGAAACGGATTACTCCGGAAAGG-3'

Lower 5'-CCTTTCCGGAGAGTAATCCGTTTCATAGATATCTCTGGTC-3'

SS1275/1309DD:

Für S1275D, Sac I

Upper 5'-GGCTCCCGAGGATGAGGAGCTCGAGATGGAGTTTG-3'

Lower 5'-ACTCCATCTCGAGCTCCTCATCCTCGGGAGCCTTG-3'

Für S1309D, Bam HI

Upper 5'-CCGGGATGGAGGATCCGATCTGGGTTTCAAGC-3'

Lower 5'-CTTGAAACCCAGATCCGATCCTCCATCCCGG-3'

CHH1044/1045/1046TRQ, Mlu I

Upper 5'-TGAAGGGCTTCACCACGCGTCAAGTGGTGCGCCTC-3'

Lower 5'-GAGGCGCACCACTTGACGCGTGGTGAAGCCCTTCATG-3'

D1120A, Sac I

Upper 5'-TTGTGCATCGAGCTCTGGCAGCGAGAAACTG-3'

Lower 5'-TCGCTGCCAGAGCTCCGATGCACAAACTTCTTGG-3'

Die in Auftrag gegebenen Oligonukleotide wurden von den Firmen ARK Scientific, Darmstadt, Pharmacia Biotech, Freiburg und Eurogentec, Belgien synthetisiert.

11.5 Chromatographie

Chromabond® C₈-Säulen

ResourceQ®

Phenyl-Sepharose® Fast Flow (High Sub)

Nucleogel SAX 1000-8/46 (50×4,6 mm)

AG 50W-X8 Kationenaustauschmaterial

Macherey-Nagel, Düren

Pharmacia Biotech, Freiburg

Pharmacia Biotech, Freiburg

Macherey-Nagel, Düren

Bio-Rad, München

11.6 Bakterien, Zell-Linien, Viren, Kulturmedien und -zusätze

<i>Autographa californica</i> Nuclear Polyhedrosis Virus	PharminGen, USA
<i>E. coli</i> DH5 α	Dr. Stabel, Max-Delbrück-Laboratorien, Köln
<i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf9-Zellen)	Dr. Stabel, Max-Delbrück-Laboratorien, Köln
Amphotericin B (Fungizone®)	Life Techn., Eggenstein
Ampicillin, Natriumsalz	Fluka, Buchs/Schweiz
Fötales Kälberserum	Life Techn., Eggenstein
Gentamicinsulfat	Life Techn., Eggenstein
Grace's Insektenmedium	Life Techn., Eggenstein
LB-Broth Base-Medium	Life Techn., Eggenstein
LB-Agar	Life Techn., Eggenstein
Neutralrot (3-Amino-7-dimethylamino-2-Methylphenazin-hydrochlorid)	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau 0,5 % in 0,9 % NaCl (1,2-bis(5-Amidino-2-benzofuranyl)ethylen)	Serva, Heidelberg

11.7 Molekulargewichts-/Längenstandards

Broad Range Marker	Bio-Rad, München
Low Range Marker (Peptidmarker)	Pharmacia Biotech, Freiburg
Prestained SDS Molecular Weight Marker	Sigma, Deisenhofen
1 Kb-DNA-Leiter	Life Techn., Eggenstein
100 Bp-DNA-Leiter	Life Techn., Eggenstein
500 Bp-DNA-Leiter	Life Techn., Eggenstein

11.8 Kit-Systeme

Plasmid Mini Kit/Midi Kit	Qiagen, Hilden
QiaEx II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Sephaglas™ BandPrep Kit	Pharmacia Biotech, Freiburg
¹⁷ Sequencing™ Kit	Pharmacia Biotech, Freiburg
QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
BaculoGold™ Transfektion Kit	PharminGen, USA

11.9 Verbrauchsmaterial

Bayol F Siliconöl	Serva, Heidelberg
Centricon™ C 10/C 30- Microconcentrator	Amicon, Witten/Ruhr
DC-Plastikfolien (Cellulose)	Merck, Darmstadt
Elektrodendochte, 240 × 60 × 1 mm	Serva, Heidelberg
<u>Filmmaterial:</u>	
BIOMAX™ MS (Kodak)	Amersham, Braunschweig
GBX- Developer (Kodak)	Amersham, Braunschweig
GBX- Fixer (Kodak)	Amersham, Braunschweig
Hyperfilm™ MP	Amersham, Braunschweig
Sofortbildfilm SW Typ 665/Typ 667	Polaroid, USA
X-Omat AR-Film (Kodak)	Amersham, Braunschweig
<u>Filtermaterial:</u>	
0,2 µm Dynagard ME Sterilfilter	Microgon, California/USA
0,22 µm Type GS (Ø 4.9 cm)	Millipore, Bedford/USA
0,45 µm Type GS (Ø 4.9 cm)	Millipore, Bedford/USA
Filterpapier Munktell Grade 1F	LKB/Pharmacia, Freiburg
HP TLC-Fertigplatten Kieselgel 60	Merck, Darmstadt
HP TLC-Fertigplatten NH ₂ F ₂₅₄ S	Merck, Darmstadt
Mikrotiterplatten Linbro	Flow Laboratories, Mecken-
heim	
Nitrozellulosemembran, 0,45 µM	Schleicher & Schüll, Dassel
PVDF-Membran Immobilon P (0,22 µm)	Millipore, Bedford/USA
Zellulosephosphat-Papier P 81	Whatman, Maidstone/GB

11.10 Laborausstattung

<u>Autoklaviergeräte:</u>	
Tischautoklav tuttnauer 2540 EL	Tuttnauer, Jerusalem/Israel
Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik, München
β-Counter LS 6500	Beckman, München
<u>Blot-Apparatur:</u>	
2117 Multiphor II Electrophoresis unit	
+ 250 Novablot Electrophoretic transfer kit	LKB/Pharmacia, Freiburg
Brutschrank E/B 28 und FD53	WTB Binder, Tuttlingen
Brutkühlschrank BK6160	Heraeus, Düsseldorf

Elektrophorese-Apparaturen:

Mupid®-2

Cosmo Bio Co.

GNA-100

Pharmacia Biotech, Freiburg

Mighty- Small II

Hoefler, San Francisco/USA

Pharmacia LKB Macrohor

Pharmacia Biotech, Freiburg

Protean™

Bio-Rad, München

Filtriereinheit für 0,22 µm-Filter

Millipore, Bedford/USA

FPLC:

BioLogic Chromatographieranlage

Bio-Rad, München

Geltrockner PH-t 20

Biotec Fischer, Reiskirchen

Heizblock, HB-130

Unitex

HPLC-Anlagen:

System Gold®, 127 NM Solvent Module

Beckman, München

System Gold®, 166 NM Detector

Beckman, München

Durchflußradiometer 505TR

Packard, Dreieich

Fraktionssammler 2110

Bio-Rad, München

Kamerasystem:

MP4 Land Camera

Polaroid Co., USA

Bio-Rad GelDoc 1000

Bio-Rad, München

Lyophilisationssystem:

Speed Vac SC 100

Savant, Farmingdale/USA

RVT 4104 (Refrigerated Vapor Trap)

Savant, Farmingdale/USA

Vakuumpumpe RC-4

Vakuubrand, Wertheim

Mastercycler® 5330

Eppendorf, Hamburg

MICROPLATE READER Model 550

Bio-Rad, München

Mikroskop Wilovert S

Hund, Wetzlar

pH-Meter 671 Calimatic

Knick, Berlin

Phospho-Imager:

GS-363 Molecular Imager® System

Bio-Rad, München

GS-505 Sample Exposure Platform

Bio-Rad, München

GS-505 Screen Eraser

Bio-Rad, München

Molecular Imager® Screen-BI

Bio-Rad, München

Molecular Imager® Screen-CS

Bio-Rad, München

Mitsubishi Digital Colour Printer CP-D1E

Bio-Rad, München

Photometer:

Photometer DU 7400

Beckman, München

Rühr- Schüttel- und Mischgeräte:

Diffusionsentfärb-Apparatur

Desaga, Heidelberg

Ikamag Magnetrührer mit Heizplatte

Janke & Kunkel, Staufen

Magnetrührer Reverstir Model RS 8

Toyo Kagaku Sangyo Co.,
Japan

Rolleninkubator RM-5 Assistent

Braun, Melsungen

Incubator Shaker innova 4000

New Brunswick Sci., SA

Schüttler Ika-Vibrax-VXR electronic (Typ VX 1)

Janke & Kunkel, Staufen

Thermomixer 5436

Eppendorf, Hamburg

Variomag Elektronikrührer

H+P Labortechnik, München

Rotoren:

HFA 12.500, 14.500, 22.50, 8074 H

Heraeus, Düsseldorf

Ti 45, Ti 17, Ti 70, SW 60

Beckman, München

Spannungsgeber

Pharmacia Biotech, Freiburg

Sterilbank LB 48 C Lamin Air®

Heraeus, Düsseldorf

Ultraschallgerät + Branson Sonifier Power Supply

Branson Instruments, USA

UV-Tisch 2011 Macrovue Transilluminator

LKB/Pharmacia, Freiburg

Vakuubrand, Membranvakuumpumpe

Vakuubrand, Wertheim

Waagen:

Analysenwaage

Sartorius, Leichlingen

Feinwaage

Sartorius, Leichlingen

Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q Plus

Millipore, Bedford/USA

Wasserbäder:

Julabo 13A

Julabo, Seelbach

Julabo F10

Julabo, Seelbach

Zentrifugen:

Centrifuge 5415 C

Eppendorf, Hamburg

Hettich Universal 30 RF, EBA 12R

Hettich, Tuttlingen

Mikrozentrifuge Hf-120 Capsule

Qualitron, Korea

Variofuge 20RS, 3.0RS, Biofuge B

Heraeus, Düsseldorf

XL-70 Ultrazentrifuge

Beckman, München



12 Literatur

- Affüpper 1998 Dissertation an der Universität zu Köln
- Ahmad F. u. Goldstein B.J. 1997 *J. Biol. Chem.* **272**, 448-457
- Ahn J., Donner D.B. u. Rosen O.M. 1993 *J. Biol. Chem.* **268**, 7571-7576
- Alessi D.R., Andjelkovic M., Caudwell B., Cron P., Morrice N., Cohen P. u. Hemmings B.A. 1996 *EMBO J.* **15**, 6541-6551
- Al-Hasani 1995 Dissertation an der Universität zu Köln
- Al-Hasani H., Eisermann B., Tennagels N., Magg C., Paßlack W., Koenen M, Müller-Wieland D., Meyer H.E. u. Klein H.W. 1997 *FEBS Letters* **400**, 65-70
- Al-Hasani H., Paßlack W. u. Klein H.W. 1994 *FEBS Letters* **349**, 17-22
- Ando A., Momomura K., Tobe K., Yamamoto-Honda R., Sakura H., Tamori Y., Kaburagi Y., Koshio O., Akanuma Y., Yazaki Y., Kasuga M. u. Kadowaki T. 1992 *J. Biol. Chem.* **267**, 12788-12796
- Appleby J., Parkinson J.S. u. Bourret B.R. 1996 *Cell* **86**, 845-848
- Araki E., Haag B.L. III u. Kahn C.R. 1994a *Biochim. Biophys. Acta* **1221**, 353-356
- Araki E., Lipes M.A., Patti M., Bruning J.C., Haag B., Johnson R.S. u. Kahn C.R. 1994b *Nature* **372**, 186-190
- Argetsinger L.S. u. Shafer J.A. 1992 *J. Biol. Chem.* **267**, 22095-22101
- Arrandale J.M., Gore-Willse A., Rocks S., Ren J.M., Zhu J., Davis A., Livingston J.N. u. Rabin D.U. 1996 *J. Biol. Chem.* **271**, 21353-21358
- Backer J.M., Kahn C.R., Cahill D.A., Ullrich A. u. White M.F. 1990 *J. Biol. Chem.* **265**, 16450-16454
- Backer J.M., Myers M.G., Shoelson S.E., Chin D.J., Sun X.J., Miralpeix M., Hu P., Margolis B., Skolnik E.Y., Schlessinger J. u. White M.F. 1992a *EMBO J.* **11**, 3469-3479
- Backer J.M., Schroeder G.G., Cahill D.A., Ullrich A., Siddle K. u. Kahn, C.R. 1991a *Biochemistry* **30**, 6366-6372
- Backer J.M., Schroeder G.G., Kahn C.R., Myers Jr M.G., Wilden P.A., Cahill D.A. u. White M.F. 1992b, *J. Biol. Chem.* **267**, 1367-1374
- Backer J.M., Shoelson S.E., Häring E. u. White M.F. 1991b *J. Cell. Biol.* **115**, 1535-1545
- Backer J.M., Shoelson S.E., Weiss M.A., Hua Q.X., Cheatham R.B., Häring E., Cahill, D.C. u. White M.F. 1992c *J. Cell. Biol.* **118**, 831-839
- Baek Y.H. u. Nowak T. 1982 *Arch. Biochem. Biophys.* **217**, 491-497
- Ballotti R., Lammers R., Scimeca J.-C., Dull T., Schlessinger J., Ullrich A. u. Van Obberghen E. 1989 *EMBO J.* **8**, 3303-3309
- Ballotti, R., Kowalski A., LeMarchand-Brustel Y. u. Van Obberghen E. 1986 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **139**, 179-185
- Baltensperger K., Lewis R.E., Woon C.-W., Vissavajhala P., Ross A.H. u. Czech M.P. 1992 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7885-7889
- Bandyopadhyay D., Kusari A., Kenner K.A., Liu F., Chernoff J., Gustafson T.A. u. Kusari J. 1997a *J. Biol. Chem.* **272**, 1639-1645
- Bandyopadhyay G., Standaert M.L., Zhao L.M., Yu B., Avignon A., Galloway L., Kamam P., Moscat J. u. Farese R.V. 1997b *J. Biol. Chem.* **272**, 2551-2558
- Baron V., Gautier N., Kaliman P., Dolaiskitabgi J. u. Van Obberghen E. 1991 *Biochemistry* **30**, 9365-9370
- Baron V., Gautier N., Komoriyn A., Hainaut P., Seimeen J.C., Mervic M., Lavielle S., Dolais-Kitabgi J. u. Van Obberghen E. 1990 *Biochemistry* **29**, 4634-4641
- Baron V., Kaliman P., Alengrin F. u. Van Obberghen E. 1995 *Eur. J. Biochem.* **229**, 27-34

- Baron V., Kaliman P., Gautier N. u. Van Obberghen E. 1992 *J. Biol. Chem.* **267**, 23290-23294
- Beames B., Braunagel S., Summers M.D. u. Lanford R.E. 1991 *Biotechniques* **11**, 378-383
- Beemelmans 1997 Dissertation an der Universität zu Köln
- Behle 1997 Diplomarbeit an der Universität zu Köln
- Beitner-Johnson D., Blakesley V.A., Shen-Orr Z., Jimenez M., Stannard B., Wang L.M. Pierce J. u. LeRoith D. 1996 *J. Biol. Chem.* **271**, 9287-9290
- Berhanu P., Ibrahim-Schneck R.H., Anderson C. u. Wood W.M. 1991 *Mol. Endocrinol.* **5**, 1827-1835
- Bishop S.M., Ablooglu A.J. u. Kohanski R.A. 1998 *Biochemistry* **37**, 11289-11300
- Blakesley R.W. u. Boezi J.A. 1977 *Anal. Biochem.* **82**, 580-582
- Boulton T.G., Gregory J.S., Jong S.M., Wang L.H., Ellis L. u. Cobb M.H. 1990 *J. Biol. Chem.* **265**, 2713-2719
- Bourret R.B., Hess J.F., Borkovich K.A., Pakula A.A. u. Simon M.I. 1989 *J. Biol. Chem.* **264**, 7085-7088
- Boyle J.W., van de Geer P. u. Hunter T. 1991 in: *Methods in Enzymology* (Hunter T. u. Sefton B.M., eds.) **201**, 110-149, Acad. Press New York, London
- Bradford M.M. 1976 *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- Bramson H.N., Kaiser E.T. u. Mildvan A.S. 1984 *CRC Crit. Rev. Biochem.* **15**, 93-123
- Bruning J.C., Winnay J., Bonner-Weir S., Taylor S.I., Accili D. u. Kahn C.R. 1997 *Cell* **88**, 561-572
- Byon J.C.H., Kusari A.B. u. Kusari J. 1998 *Mol. Cell. Biol.* **182**, 101-108
- Cann A.D. u. Kohanski R.A. 1997 *Biochemistry* **25**, 7681-7689
- Carter W.G., Asamoah K.A. u. Sale G.J. 1995 *Biochemistry* **34**, 9488-9499
- Chardot T., Shen H. u. Meunier J.C. 1995 *C. R. Acad. Sci. III* **318**, 937-942
- Chavanieu A., Keane N.E., Quirk P.G., Levine B.A., Calas B., Wei L. u. Ellis L. 1994 *Eur. J. Biochem.* **224**, 115-123
- Cheatham B. u. Kahn C.R., 1992 *J. Biol. Chem.* **267**, 7108-7115
- Cheatham B., Shoelson S.E., Yamada K., Goncalves E. u. Kahn C.R. 1993 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7336-7340
- Chen D.I., Van Horn D.J., White M.F. u. Backer J.M. 1995 *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4711-4717
- Chen J., Sadowski H.B., Kohanski R.A. u. Wang L.-H. 1997 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2295-2300
- Chin J.E., Dickens M., Tavaré J.M. u. Roth R.A. 1993 *J. Biol. Chem.* **268**, 6338-6347
- Chin J.E., Liu F. u. Roth R.A. 1994 *Mol. Endocrinol.* **8**, 51-58
- Chin J.E., Tavaré J.M., Ellis L. u. Roth R.A. 1991 *J. Biol. Chem.* **266**, 15587-15590
- Chou C.K., Dull T.J., Russel D.S., Gherzi R., Lebwohl D., Ullrich A. u. Rosen O.M. 1987 *J. Biol. Chem.* **262**, 1842-1847
- Chung C.T., Niemela S.L. u. Miller R.H. 1989 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2172-2175
- Clark S., Eckardt G, Siddle K. u. Harrison L.C. 1991 *Biochem. J.* **276**, 4852-4860
- Cline J., Braman J.C. u. Hogrefe H.H. 1996 *Nucleic Acids Res.* **24**, 3546-3551
- Cobb M.H., Sang B.-C., Gonzalez R., Goldsmith E. u. Ellis L. 1989 *J. Biol. Chem.* **264**, 18701-18706
- Cohen P., Alessi D.R. u. Cross D.A.E. 1997 *FEBS Letters* **410**, 3-10
- Cozzzone A.J. 1998 *Biochimie* **80**, 43-48
- Craparo A., Freu. R., Gustafson T.A. 1997 *J. Biol. Chem.* **272**, 11663-11669
- Craparo A., O'Neill T.J. u. Gustafson T.A. 1995 *J. Biol. Chem.* **270**, 15639-15643
- Daly R.J., Sanderson G.M., Janes P.W. u. Sutherland R.L. 1996 *J. Biol. Chem.* **271**, 12502-12510
- De Fea K. u. Roth R.A. 1997a *Biochemistry* **36**, 181-189

- De Fea K. u. Roth R.A. 1997b *J. Biol. Chem.* **272**, 31400-31406
- De Meyts P. 1995 *Diabetologia* **37**, S135-S148
- De Meyts P., Christoffersen C.T., Ursø B., Wallach B., Grønskov K., Yakushiji F. u. Shymko R.M. 1995 *Metabolism* **44** Suppl. 4, 2-11
- De Meyts P., Wallach B., Christoffersen C.T., Ursø B., Grønskov K., Latus L.J., Yakushiji F., Ilondo M.M. u. Shymko R.M. 1994 *Horm. Res.* **42**, 152-169
- Debant A., Clauser E., Ponzio G., Filloux C., Auzan C., Contreres J.O. u. Rossi B. 1988 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8032-8036
- Denu J.M. u. Dixon J.E. 1995 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 5910-5914
- Desbois C., Capeau J., Hainault I., Wicek D., Reynet C., Veissierre D., Caron M., Picard J., Guerremillo M. u. Cerqui G. 1992 *J. Biol. Chem.* **267**, 13488-13497
- Dhand R., Hara K., Hiles I., Bax B., Gout I., Panayotou G., Fry M.J., Yonezawa K., Kasuga M. u. Waterfield M.D. 1994a *EMBO J.* **13**, 511-521
- Dhand R., Hiles I., Panayotou G., Roche S., Fry M.J., Gout I., Totty N.F., Truong O., Vicendo P., Yonezawa K *et al.* 1994b *EMBO J.* **13**, 522-533
- Dickens M. u. Tavaré J.M. 1992 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**, 244-250
- Dickens M., Chin J.E., Roth R.A., Ellis L., Denton R.M. u. Tavaré J.M. 1992 *Biochem. J.* **287**, 201-209
- Dong L.Q., Farris S., Christal J. u. Liu F. 1997 *Mol. Endocrinol.* **11**, 1757-1765
- Dong L.Q., Porter S., Hu D.R. u. Liu F. 1998 *J. Biol. Chem.* **273**, 17720-17725
- Duggleby R.G. 1981 *Anal. Biochem.* **110**, 9-18
- Ebina Y., Araki E., Taira M., Shimada F., Mori M., Craik C.S., Siddle K., Pierce S.B., Roth R.A. u. Rutter W.J. 1987 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 704-708
- Ebina Y., Ellis L., Jarnagin K., Edery M., Graf L., Clauser E., Ou J.H., Masiarz F., Kan Y.W., Goldfine I.D., Roth R.A. u. Rutter W.J. 1985 *Cell* **40**, 747-758
- Eck M.J., Dhe-Paganon S., Trub T., Nolte R.T. u. Shoelson S.E. 1996a *Cell* **85**, 695-705
- Eck M.J., Pluskey S., Trub T., Harrison S.C. u. Shoelson S.E. 1996b *Nature* **379**, 277-280
- Egger L.A., Park H. u. Inouye M. 1997 *Genes Cells* **2**, 167-184
- Eldar-Finkelman H. u. Krebs E.G. 1997 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9660-9664
- Ellis L. u. Levine B.A. 1991 *Methods in Enzymology* **200**, 661-669
- Ellis L., Clauser E., Morgan D.O., Edery M., Roth R.A. u. Rutter W.J. 1986 *Cell* **45**, 721-732
- Ellis L., Levitan A., Cobb M.H. u. Ramos P. 1988 *J. Virol.* **62**, 1634-1639
- Ellis L., Morgan, D.O., Clauser E., Roth R.A. u. Rutter W.J. 1987 *Mol. Endocrinol.* **1**, 15-24
- Escobedo J.A., Kaplan D.R., Kavanaugh W.M., Turck C.W. u. Williams L.T. 1991 *Mol. Cell. Biol.* **11**, 1125-1132
- Fantin V.R., Sparling J.D., Slot J.W., Keller S.R., Lienhard G.E. u. Lavan B.E. 1998 *J. Biol. Chem.* **273**, 10726-10732
- Fantus I.G. u. Tsiani E. 1998 *Mol. Cell. Biol.* **182**, 109-118
- Feener E.P., Backer J.M., King G.L., Wilden P.A., Sun X.J., Kahn C.R. u. White M.F. 1993 *J. Biol. Chem.* **268**, 11256-11264
- Feinstein R., Kanety H., Papa M.Z., Lunenfeld B. u. Karasik A. 1993 *J. Clin. Invest.* **94**, 1543-1549
- Ferrell Jr J.E. u. Bhatt R.R. 1997 *J. Biol. Chem.* **272**, 19008-19016
- Flint A.E., Tiganis T., Barford D. u. Tonks N.K. 1997 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1680-1685
- Flores-Riveiros J.R., Sibley E., Kastelic T. u. Lane M.D. 1989 *J. Biol. Chem.* **264**, 21557-21572
- Frantz J.D., Giorgetti-Peraldi S., Ottinger E.A. u. Shoelson S.E. 1997 *J. Biol. Chem.* **272**, 2659-2667
- Frattali A.L., Treadway J.L. u. Pessin J.E. 1991 *J. Biol. Chem.* **266**, 9829-9834

- Frattali A.L., Treadway J.L. u. Pessin J.E. 1992 *J. Biol. Chem.* **267**, 19521-19528
- Freu. G.G., Wittig J.G. u. Mooney R.A. 1995 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **206**, 272-278
- Fruman D.A., Cantley L.C. u. Carpenter C.L. 1996 *Genomics* **37**, 113-121
- Gale N.W., Kaplan S., Lowenstein E.J., Schlessinger J. u. Bar-Sagi D. 1993 *Nature* **363**, 88-92
- Gerold 1995 Diplomarbeit an der Universität zu Köln
- Goder 1995 Diplomarbeit an der Universität zu Köln
- Goldstein B.J. u. Dudley A.L. 1990 *Mol. Endocrinol.* **4**, 235-244
- Gottlin E.B., Rudolph A.E., Zhao Y., Matthews H.R. u. Dixon J.E. 1998 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9202-9207
- Grako K.A., Olefsky J.M. u. McClain D.A. 1992 *Endocrinol.* **130**, 3441-3452
- Gruppuso P.A., Boylan J.M., Levine B.A. u. Ellis L. 1992 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**, 1457-1463
- Gual P., Baron V., Alengrin F., Mothe I. u. Van Obberghen E. 1996 *Endocrinol.* **137**, 3416-3423
- Gustafson T.A., He W., Craparo A., Schaub C.D. u. O'Neill T.J. 1995 *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2500-2508
- Hanks S. u. Quinn A.M. 1991 *Methods in Enzymology* **200**, 38-62
- Hanks S.K., Quinn A.M. u. Hunter T. 1988 *Science* **241**, 45-51
- Hanks S.K. 1991 *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1**, 269-383
- Hanks S.K. u. Hunter T. 1995 *FASEB J.* **9**, 576-596
- Hansen H., Svensson U., Zhu J., Laviola L., Giorgino F., Wolf G., Smith R.J. u. Riedel H. *J. Biol. Chem.* 1996 **271**, 8882-8886
- Hari J. u. Roth R.A. 1987 *J. Biol. Chem.* **262**, 15341-15344
- He W., Rose D.W., Olefsky J.M. u. Gustafson T.A. 1998 *J. Biol. Chem.* **273**, 6860-6867
- Heidenreich 1995 Dissertation an der Universität zu Köln
- Heidenreich K., Paduschek M., Mölders M. u. Klein H.W. 1994 *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **375**, 99-104
- Herrera R. u. Rosen O.M. 1986 *J. Biol. Chem.* **261**, 11980-11985
- Herrera R., Lebwohl D., de Herreros A.G., Kallen R.G. u. Rosen O.M. 1988 *J. Biol. Chem.* **263**, 5560-5568
- Holgado-Madruga M., Emler D.R., Moscatello D.K., Godwin A.K. u. Wong A.J. 1996 *Nature* **379**, 560-563
- Hotamisligil G.S., Arner P., Caro J.F., Atkinson R.L. u. Spiegelman B.M. 1995 *J. Clin. Invest.* **95**, 2409-2415
- Hotamisligil G.S., Budavari A., Donovan A., Ellis R., White M.F. u. Spiegelman B.M. 1996 *Science* **271**, 665-668
- Hotamisligil G.S., Budavari A., Murray D. u. Spiegelman B.M. 1994 *J. Clin. Invest.* **94**, 1543-1549
- Hsuan J.J., Downward J., Clark S. u. Waterfield M.D. 1989 *Biochem. J.* **259**, 519-527
- Hu S.-H., Parker M.W., Lei J.Y., Wilce M.C.J., Benian G.M. u. Kemp B.E. 1994 *Nature* **369**, 581-584
- Hubbard S.R. 1997 *EMBO J.* **16**, 5572-5581
- Hubbard S.R., Wei L., Ellis L. u. Hendrickson W.A. 1994 *Nature* **372**, 746-754
- Isakoff S.J., Taha C., Rose E., Klip A. u. Skolnik E.Y. 1995 *Diabetes* **44**, 18A
- Isakoff S.J., Yu Y.P., Su Y.-C., Blaikie P., Yajnik V., Rose E., Weidner K.M., Sachs M., Margolis B. u. Skolnik E.Y. 1996 *J. Biol. Chem.* **271**, 3959-3962
- Issad T., Tavaré J.M. u. Denton R.M. 1991 *Biochem. J.* **275**, 15-21
- Jost W. u. Hauck H.E. 1983 *Anal. Biochem.* **135**, 120-127
- Kaburagi Y., Momomura K., Yamamoto-Honda R., Tobe K., Tamori Y., Sakura H., Akanuma Y., Yazaki Y. u. Kadowaki T. 1993 *J. Biol. Chem.* **268**, 16610-16622

- Kaburagi Y., Yamamoto-Honda R., Tobe K., Ueki K., Yachi M., Akanuma Y., Stephens R.M., Kaplan D., Yazaki Y. u. Kadowaki T. 1995 *Endocrinology* **136**, 3437-3443
- Kanety H., Feinstein R., Papa M.Z. u. Karasik A. 1995 *J. Biol. Chem.* **270**, 23780-23784
- Kasus-Jacobi A., Perdereau D., Tartare-Deckert S., Van Obberghen E., Girard J. u. Burnol A.F. 1997 *J. Biol. Chem.* **272**, 17166-17170
- Kayatz 1994 Diplomarbeit an der Universität zu Köln
- Keegan A.D., Nelms K., White M., Wang L.M., Pierce J.H. u. Paul W.E. 1994 *Cell* **76**, 811-820
- Kellerer M., Koch M., Metzinger, Mushack J., Capp E. Häring H.U. 1997 *Diabetologia* **40**, Nr.11, 1358-1362
- Kellerer M., Lammers R., Ermel B., Tippmer S., Vogt B., Obermaier-Kusser B., Ullrich A. u. Häring H.U. 1992 *Biochemistry* **31**, 4588-4596
- Kellerer M., Mushack J., Seffer E., Mischak H., Ullrich A. u. Häring H.U. 1998 *Diabetologia* **41**, 833-838
- Kelly K.L. u. Ruderman N.B. 1993 *J. Biol. Chem.* **268**, 4391-4398
- Keßler 1998 Diplomarbeit an der Universität zu Köln
- Kharitonov A., Chen Z., Sures I., Wang H., Schilling J. u. Ullrich A. 1997 *Nature* **386**, 181-186
- Kharitonov A., Schnekenburger J., Chen Z., Knyazev P., Ali S., Zwick E., White M.F. u. Ullrich A. 1995 *J. Biol. Chem.* **270**, 29189-29193
- Kimura K., Hattori S., Kabuyama Y., Shizawa Y., Takayanagi J., Nakamura S., Toki S., Matsuda Y., Onodera K. u. Fukui Y. 1994 *J. Biol. Chem.* **269**, 18961-18967
- Klein H.W., Im M.J. u. Palm D. 1986 *Eur. J. Biochem.* **157**, 107-114
- Klein H.W., Im M.J., Palm D. u. Helmreich E.J. 1984 *Biochemistry* **23**, 5853-5861
- Knighton D.R., Zheng J., Ten Eyck L.F., Ashford V.A., Xuong N.H., Taylor S.S. u. Sowadski J.M. 1991 *Science* **253**, 407-414
- Koch 1998 Diplomarbeit an der Universität zu Köln
- Kohanski R.A. 1993a *Biochemistry* **32**, 5766-5772
- Kohanski R.A. 1993b *Biochemistry* **32**, 5773-5780
- Kole H.K., Liotta A.S., Kole S., Montrose-Rafizadeh C. u. Bernier M. 1996 *J. Biol. Chem.* **271**, 31619-31626
- Kole, H.K, Abdel-Ghani M. u. Racker E. 1988 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5849-5853
- Kreegipuu A., Blom N., Brunak S. u. Järvi J. 1998 *FEBS Letters* **430**, 45-50
- Kuhne M.R., Pawson T., Lienhard G.E. u. Feng G.S. 1993 *J. Biol. Chem.* **268**, 11479-11481
- Kuhne M.R., Zhao Z. u. Lienhard G.E. 1995, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **211**, 190-197
- Ku.ra V., Escobedo J.A., Kazlauskas A., Kim H.K., Rhee S.G., Williams L.T. u. Zetter B.R. 1994 *Nature* **367**, 474-476
- Kuriyan J. u. Cowburn D. 1997 *Annu. Rev. Biomol. Struct.* **26**, 259-288
- Kwok Y.C., Nemenoff R.A., Powers A.C. u. Avruch J. 1986 *Arch. Biochem. Biophys.* **244**, 102-113
- Laemmli U.K. 1970 *Nature* **227**, 680
- Lammers R., Gray A., Schlessinger J. u. Ullrich A. 1989 *EMBO J.* **8**, 1678-1682
- Lammers R., Van Obberghen E., Ballotti R., Schlessinger J. u. Ullrich A. 1990 *J. Biol. Chem.* **265**, 16886-16890
- Lavan B.E., Fantin V.R., Chang E.T., Lane W.S., Keller S.R. u. Lienhard G.E. 1997a *J. Biol. Chem.* **272**, 21403-21407
- Lavan B.E., Lane W.S. u. Lienhard G.E. 1997b *J. Biol. Chem.* **272**, 11439-11443
- Lebwohl D.E., Nunez I., Chan M. u. Rosen O.M. 1991 *J. Biol. Chem.* **266**, 386-390

- Lee C.H., Li W., Nishumura R., Zhou M., Batzer A.G., Myers Jr. M.G., White M.F., Schlessinger J. u. Skolnik E.Y. 1993 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11713-11717
- Lee M.H., Hebda C.A. u. Nowak T. 1981 *J. Biol. Chem.* **256**, 12793-12801
- Lee T.R., Niu J. u. Lawrence D.S. 1994 *Biochemistry* **33**, 4245-4250
- Lee T.R., Niu J. u. Lawrence D.S. 1995 *J. Biol. Chem.* **270**, 5375-5380
- Lehr 1995 Diplomarbeit an der Universität zu Köln
- Lehr 1998 Dissertation an der Universität zu Köln
- Lemmon M.A. u. Schlessinger J. 1994 *Trends Biochem. Sci.* **19**, 459-463
- Levine B.A., Clack B. u. Ellis L. 1991 *J. Biol. Chem.* **266**, 3565-3570
- Levitzki A. 1990 *Biochem. Pharmacol.* **40**, 913-918
- Levitzki A. u. Gazit A. 1995 *Science* **267**, 1782-1788
- Levy-Toledano R., Taouis M., Blaettler D.H., Gorden P. u. Taylor S.I. 1994 *J. Biol. Chem.* **49**, 31178-31182
- Lewis R.E., Wu G.P., MacDonald R.G. u. Czech M.P. 1990a *J. Biol. Chem.* **265**, 947-954
- Lewis R.E., Cao L., Perregaux D. u. Czech M.P. 1990b *Biochemistry* **29**, 1807-1813
- Lewis R.E., Volle D.J. u. Sanderson S.D. 1994 *J. Biol. Chem.* **269**, 26259-26266
- Li W., Nishimura R., Kashishian A., Batzer A.G., Kim W.J.H., Cooper J.A. u. Schlessinger J. 1994 *Mol. Cell. Biol.* **14**, 509-517
- Lindberg R.A., Quinn A.M. u. Hunter T. 1992 *Trends Biochem. Sci.* **17**, 114-119
- Liu F. u. Roth R.A. 1994a *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200**, 1570-1577
- Liu F. u. Roth R.A. 1994b *FEBS Letters* **352**, 389-392
- Liu F. u. Roth R.A. 1994c *Biochem. J.* **298**, 471-477
- Liu F. u. Roth R.A. 1995 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 10287-10291
- Longo N., Shuster R.C., Griffin L.D., Langley S.D. u. Elsas L.J. 1992 *J. Biol. Chem.* **267**, 12416-12419
- Lu K. u. Guidotti G., 1996 *Mol. Biol. in Cell* **7**, 679-691
- Luckow V.A. u. Summers M.D. 1989 *Virology* **170**, 31-39
- Madhusudan, Trafny E.A., Xuong N.H., Adams J.A., Ten Eyck L.F., Taylor S.S. u. Sowadski J.M. 1994 *Protein Sci.* **3**, 176-187
- Maegawa H., McClain D.A., Freidenberg G., Olefsky J.M., Napier M., Lipari T., Dull T.J., Lee J. u. Ullrich A. 1988 *J. Biol. Chem.* **263**, 8912-8917
- Magg 1993 Diplomarbeit an der Universität zu Köln
- Magg 1997 Dissertation an der Universität zu Köln
- Margolis B., Sivennoinen O., Comoglio F., Roonprapunt C., Skolnik E., Ullrich A. u. Schlessinger J. 1992 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8894-8898
- Marin O., Megio F., Perich J.W. u. Pinna L.A. 1996 *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **28**, 999-1005
- Marshall C.J. 1994 *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**, 82-89
- Matte A., Tari L.W. u. Delbaere L.T.J. 1998 *Structure* **6**, 413-419
- McClain D.A. 1991 *Mol. Endocrinol.* **5**, 724-739
- McClain D.A. 1992 *Am. J. Med. Asc.* **304**, 192-201
- McClain D.A., Maegawa H., Lee J., Dull T.J., Ullrich A. u. Olefsky J.M. 1987 *J. Biol. Chem.* **262**, 14663-14671
- McClain D.A., Maegawa H., Levy J., Hueckstaedt T., Dull T., Lee J., Ullrich A. u. Olefsky J.M. 1988 *J. Biol. Chem.* **263**, 8904-8911
- Mendelow M., Prorok M., Salerno A. u. Lawrence D.S. 1993 *J. Biol. Chem.* **268**, 12289-12296
- Milarski K.L. u. Saltiel A.R. 1994 *J. Biol. Chem.* **269**, 21239-21243
- Mildvan A.S. u. Fry D.C. 1987 *Adv. Enzymol.* **59**, 241-313

- Minamide L.S. u. Bamburg J.R. 1990 *Anal. Biochem.* **190**, 66-70
- Miralpeix M., Sun X., Backer J.M., Myers Jr M.G., Araki E. u. White M.F. 1992 *Biochemistry* **31**, 9031-9039
- Mosthaf L., Grako K., Dull T.J., Ullrich A. u. McClain D.A. 1990 *EMBO J.* **9**, 2409-2413
- Mothe I. u. Van Obberghen E. 1996 *J. Biol. Chem.* **271**, 11222-11227
- Müller 1996 Diplomarbeit an der Universität zu Köln
- Müller-Dieckmann H.J., u. Schulz G.E. 1994 *J. Mol. Biol.* **236**, 361-367
- Munoz G. u. Marshall S.H. 1990 *Anal. Biochem.* **190**, 233-237
- Murakami M.S. u. Rosen O.M. 1991 *J. Biol. Chem.* **266**, 22653-22660
- Myers Jr M.G. u. White M.F. 1995 *Trends Endocrinol. Metab.* **6**, 209-215
- Myers Jr M.G., Grammer T.C., Brooks J., Glasheen E.M., Wang L.M., Sun X.J., Blenis J., Pierce J.H. u. White M.F. 1995 *J. Biol. Chem.* **270**, 11715-11718
- Myers Jr M.G., Grammer T.C., Wang L.M., Sun X.J., Pierce J.H., Blenis J. u. White M.F. 1994 *J. Biol. Chem.* **269**, 28783-28789
- Myers M.G., Backer J.M., Siddle K. u. White M.F. 1991 *J. Biol. Chem.* **266**, 10616-10623
- Myers M.G., Wang L.M., Sun X.J., Zhang Y., Yenush L., Schlessinger J., Pierce J.H. u. White M.F. 1994 *Mol. Cell. Biol.* **14**, 3577-3587
- Najjar S.M., Choice C.V., Soni P., Whitman C.M. u. Poy M.N. 1998 *J. Biol. Chem.* **273**, 12923-12928
- Noguchi T., Matozaki T., Horita K., Fujioka Y. u. Kasuga M. 1994 *Mol. Cell. Biol.* **14**, 6674-6682
- Nölle 1995 Diplomarbeit an der Universität zu Köln
- O'Neill T.J., Craparo A. u. Gustafson T.A. 1994 *Mol. Cell. Biol.* **14**, 6433-6442
- O'Neill T.J., Rose D.W., Pillay T.S., Hotta K., Olefsky J.M. u. Gustafson 1996 *J. Biol. Chem.* **271**, 22506-22513
- O'Neill, T.J., Zhu Y. u. Gustafson T.A. 1997 *J. Biol. Chem.* **272**, 10035-10040
- O'Reilly D., Miller L.K. u. Luckow V.A. 1992 *Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual*, W.H. Freeman & Co., New York, NY
- Obermaier-Kusser B., White M.F., Pongratz D., Su Z., Ermel B., Mühlbacher C. u. Häring H.U. 1989 *J. Biol. Chem.* **264**, 9497-9503
- Ogawa W., Matozaki T. u. Kasuga M. 1998 *Mol. Cell. Biol.* **182**, 13-22
- Ogihara T., Isobe T., Ichmura T., Taoka M., Funaki M., Sakoda H., Onishi Y., Inukai K., Anai M., Fukushima Y., Kikuchi M., Yazaki Y., Oka Y. u. Asano T. 1997 *J. Biol. Chem.* **272**, 25276-25274
- Okada T., Kawano Y., Sakakibara T., Hazeki O. u. Ui M. 1994a *J. Biochem.* **269**, 3568-3573
- Okada T., Sakuma L., Fukui Y., Hazeki O. u. Ui M. 1994b *J. Biol. Chem.* **269**, 3563-3567
- Ooi J., Yajnik V., Immanuel D., Gordon M., Moskow J.J., Buchberg A.M. u. Margolis B. 1995 *Oncogene* **10**, 1610-1630
- Pang, D.T., Sharma, B.R., Shafer J.A., White M.F. u. Kahn C.R. 1985 *J. Biol. Chem.* **260**, 7131-7136
- Paoli P., Camici G., Manao G. u. Ramponi G. 1995 *Experientia* **51**, 57-62
- Pawson T. 1995 *Nature* **373**, 573-580
- Paz K., Hemi R., LeRoith D., Karasik A., Elhanany E., Kanety H. u. Zick Y. 1997 *J. Biol. Chem.* **272**, 29911-29918
- Pelicci G., Lanfrancone L., Grignani F., McGlade J., Cavallo F., Forni G., Nicoletti I., Grignani F., Pawson T. u. Pelicci P.G. 1992 *Cell* **70**, 93-104
- Perlman R., Bottaro D.P., White M.F. u. Kahn C.R. 1989 *J. Biol. Chem.* **264**, 8946-8950
- Pike L.J., Eakes A.T. u. Krebs E.G. 1986 *J. Biol. Chem.* **261**, 3782-3789
- Plekhanov A.Y. 1996 *Anal. Biochem.* **239**, 110-111
- Quirk P.G., Keane N.E., Levine B.A., Wei L. u. Ellis L. 1995 *Biochem. Soc. Transact.* **23**, 188S

- Rafaeloff R., Maddux B.A., Brunetti A., Sbraccia P., Sung C.K., Patel R., Hawley D.M. u. Goldfine I.D. 1991 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**, 912-918
- Rajagopalan M., Neidigh J.L. u. McClain D.A. 1991 *J. Biol. Chem.* **266**, 23068-23073
- Reynet C., Caron M., Magre J., Cherqui G., Clauser E., Picard J. u. Capeau J. 1990 *Mol. Endocrinol.* **4**, 304-311
- Ricketts W.A., Rose D.W., Shoelson S. u. Olefsky J.M. 1996 *J. Biol. Chem.* **271**, 26165-26169
- Riedel H., Wang J., Hansen H. u. Yosuaif N. J. 1997 *J. Biochem. (Tokyo)* **122**, 1105-1113
- Rocchi S., Tartare-Deckert S., Murdaca J., Holgado-Madruga M., Wong A.J., Van Obberghen E. 1998 *Mol. Endocrinol.* **12**, 914-923
- Rocchi S., Tartare-Deckert S., Sawka-Verhelle D., Gamha A. u. Van Obberghen E. 1996 *Endocrinol.* **137**, 4944-4952
- Rosen O.M. u. Lebowitz D.E. 1988 *FEBS Letters* **231**, 397-401
- Rosen O.M., Herrera R., Olowe Y., Petrzelli L.M. u. Cobb M.H. 1983 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 3237-3240
- Rosenfeld J., Capdeville J., Guillemot J.C. u. Ferrera P. 1992 *Anal. Biochem.* **203**, 173-179
- Ross S.A., Lienhard G.E. u. Lavan B.E. 1998 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**, 487-492
- Rother K.I., Imai Y., Caruso M., Beguinot F., Formisano P. u. Accili D. *J. Biol. Chem.* 1998 **273**, 17491-17497
- Ruan, Y., Chen C., Cao Y. u. Garofalo R.S. 1995 *J. Biol. Chem.* **270**, 4236-4243
- Russell D.S., Gherzi R., Johnson E.L., Chou C.-K. u. Rosen O.M. 1987 *J. Biol. Chem.* **262**, 11833-11840
- Russo A.A., Jeffrey P.D. u. Pavletich N.P. 1996 *Nature Struct. Biol.* **3**, 696-700
- Rylatt D.B. u. Parish C.R. 1982 *Anal. Biochem.* **121**, 213-214
- Sahal D. u. Fujita-Yamaguchi Y. 1987 *Anal. Biochem.* **167**, 23-30
- Saltiel A.R. u. Ohmichi M. 1993 *Curr. Opin. Neurobiol.* **3**, 352-359
- Sambrook J., Fritsch E.F. u. Maniatis T. 1989 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Sanger F., Nicklen S. u. Coulson A.R. 1977 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467
- Sawka-Verhelle D., Filloux C., Tartare-Deckert S., Mothe I. u. Van Obberghen E. 1997 *Eur. J. Biochem.* **250**, 411-417
- Sawka-Verhelle D., Tartare-Deckert S., White M.F. u. Van Obberghen E. *J. Biol. Chem.* 1996 **271**, 5980-5983
- Schlessinger J. 1988 *TIBS* **13**, 443-447
- Schlessinger J. 1993 *Biochem. Sci.* **18**, 273-275
- Schweins T., Scheffzek K., Assheuer R. u. Wittinghofer A. 1997 *J. Mol. Biol.* **266**, 847-856
- Sergeant L.E. u. Stinson R.A. 1979 *Biochem. J.* **181**, 247-250
- Seino S., Seino M. u. Bell G.I. 1990 *Diabetes* **39**, 129-133
- Shier P. u. Watt V. 1989 *J. Biol. Chem.* **264**, 14605-14608
- Shoelson S.E., White M.F. u. Kahn C.R. 1988 *J. Biol. Chem.* **263**, 4852-4860
- Shymko R.M., De Meyts P. u. Thomas R. 1997 *Biochem. J.* **326**, 463-469
- Siemeister G., Al-Hasani H., Klein H.W., Kellner S., Streicher R., Krone W. u. Müller-Wieland D. 1995 *J. Biol. Chem.* **270**, 4870-4874
- Skolnik E.Y., Batzer A.G., Li N., Lee C.H., Lowenstein E.J., Mohammadi M., Margolis B. u. Schlessinger J. 1993a *Science* **260**, 1953-1955
- Skolnik E.Y., Lee C.-H., Batzer A., Vincentini L.M., Zhou M., Daly R., Myers Jr M.J., Bakker J.M., Ullrich A., White M.F. u. Schlessinger J. 1993b *EMBO J.* **12**, 1929-1936
- Smith D.M. u. Sale G.J. 1988 *Biochem. J.* **256**, 903-909
- Smith G.E. u. Summers M.D. 1978 *Virology* **89**, 517-527
- Smith J.E., Sheng Z.-F. u. Kallen R.G. 1994 *DNA Cell. Biol.* **6**, 593-603

- Smith-Hall J., Pons S., Patti M.E., Burks D.J., Yenush L., Sun J., Kahn C.R. u. White M.F. 1997 *Biochemistry* **36**, 8304-8310
- Songyang Z., Carraway K.L. III, Eck M.J., Harrison S.C., Feldman R.A., Mohammadi M., Schlessinger J., Hubbard S.R., Smith D.P., Eng C. *et al.* 1995 *Nature* **373**, 536-539
- Sparrow L.G., McKern N.M., Gorman J.J., Strike P.M., Robinson C.P., Bentley J.D. u. Ward C.W. 1997 *J. Biol. Chem.* **47**, 29460-29467
- Stadtmauer L. u. Rosen O.M. 1986 *J. Biol. Chem.* **261**, 10000-10005
- Staubs P.A., Reichart D.R., Saltiel A.R., Milarski K.L., Maegawa H., Berhanu P., Olefsky J.M. u. Seely B.N. *J. Biol. Chem.* **269**, 27186-27192
- Stein D., Wu J., Fuqua S.A.W., Roonprapunt C., Yajnik V., D'Eustachio P., Moskow J.J., Buchberg A.M., Osborne C.K. u. Margolis B. 1994 *EMBO J.* **13**, 1331-1340
- Strack V., Stoyanov B., Bossenmaier B., Mosthaf L., Kellerer M. u. Häring H.-U. 1997 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **239**, 235-239
- Stumpo D.J. u. Blackshear P.J. 1991 *J. Biol. Chem.* **266**, 455-460
- Summers M.D. u. Smith G.E. 1987 in: *A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures*, Texas Agricultural Experiment Station, Bulletin No. **1555**
- Sun X.J., Crimmins D.L., Myers Jr M.G., Miralpeix M. u. White M.F. 1993 *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7418-7428
- Sun X.J., Miralpeix M., Myers Jr M.G., Glasheen E.M., Backer J.M., Kahn C.R. u. White M.F. 1992 *J. Biol. Chem.* **267**, 22662-22672
- Sun X.J., Pons S., Asano T., Myers Jr. M.G., Glasheen E.M. u. White M.F. 1996 *J. Biol. Chem.* **271**, 10583-10587
- Sun X.J., Rothenberg P., Kahn C.R., Backer J.M., Araki E., Wilden P.A., Cahill D.A., Goldstein B.J. u. White M.F. 1991 *Nature* **352**, 73-77
- Sun X.J., Wang L.-M., Zhang Y., Yenush L., Myers Jr M.G., Glasheen E., Lane W.S., Pierce J.H. u. White M.F. 1995 *Nature* **377**, 173-177
- Sung C.K. 1992 *J. Cell. Biochem.* **48**, 324-335
- Sung C.K., Han X.L., Brunetti A., Maddux B., Yamamoto-Honda Y. u. Goldfine I.D. 1992 *Biochemistry* **31**, 168-174
- Swarup G., Cohen S. u. Garbers D.L. 1982 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **107**, 1104-1109
- Takata Y., Webster N.J.G. u. Olefsky J.M. 1991 *J. Biol. Chem.* **266**, 9135-9139
- Takata Y., Webster N.J.G. u. Olefsky J.M. 1992 *J. Biol. Chem.* **267**, 9065-9070
- Takayama S. White M.F. u. Kahn C.R. 1988 *J. Biol. Chem.* **263**, 3440-3447
- Tamemoto H., Kadowaki T., Tobe K., Yagi T., Sakura H., Hayakawa T., Terauchi Y., Ueki K., Kaburagi Y., Satoh S., Sekihara H., Yoshioka S., Horokoshi H., Furuta Y., Ikawa Y., Kasuga M., Yazaki Y. u. Aizawa S. 1994 *Nature* **372**, 182-186
- Tanasijevic M.J., Myers Jr M.G., Thoma R.S., Crimmins D.L. White M.F. u. Sacks D.B. 1993 *J. Biol. Chem.* **268**, 18157-18166
- Tanti J.F., Gremeaux T, Van Obberghen E. u. Le Marchand-Brustel Y. 1994 *Biochem J.* **304**, 17-21
- Tartare S., Ballotti, R., Lammers R., Alengrin F., Dull T., Schlessinger J., Ullrich A. u. Van Obberghen 1991 *J. Biol. Chem.* **266**, 9829-9834
- Tauer T.J., Volle D.J., Rhode S.L. u. Lewis R.E. 1996 *J. Biol. Chem.* **271**, 331-336
- Tavaré J.M. u. Dickens M. 1991 *Biochem. J.* **274**, 173-179
- Tavaré J.M. u. Siddle K. 1993 *Biochim. Biophys. Acta* **1178**, 21-39
- Tavaré J.M., Clack B. u. Ellis L. 1991 *J. Biol. Chem.* **266**, 1390-1395
- Tavaré J.M., O'Brien R.M., Siddle K. u. Denton R.M. 1988 *Biochem. J.* **253**, 783-788
- Tavaré J.M., Ramos P. u. Ellis L. 1992 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188**, 86-93

- Taylor S.S., Radzio-Andzelm E. u. Hunter T. 1995 *FASEB J.* **9**, 1255-1266
- Tennagels 1995 Diplomarbeit an der Universität zu Köln
- Tennagels 1998 Dissertation an der Universität zu Köln
- Thies R.S., Ullrich A. u. McClain D.A. 1989 *J. Biol. Chem.* **264**, 12820-12825
- Thies R.S., Webster N.J., u. McClain D.A. 1990 *J. Biol. Chem.* **265**, 10132-10137
- Tornqvist H.E., Pierce M.W., Frackleton, R., Nemenoff R.A. u. Avruch J. *J. Biol. Chem.* 1987 **262**, 10212-10219
- Tornqvist H.E., Gunsalus J.R., Nemenoff R.A., Frackleon A.R., Pierce M.W. u. Avruch J. 1988 *J. Biol. Chem.* **263**, 350-359
- Tornqvist, H.E. u. Avruch J. 1988 *J. Biol. Chem.* **263**, 4593-4601
- Treadway J.L. Morrison B.D., Soos M.A., Siddle K., Olefsky J., Ullrich A., McClain D.A. u. Pessin J.E. 1991 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 214-218
- Ullrich A., Bell J.R., Chen E.Y., Herrera R., Petruzzelli L.M., Dull T.J., Gray A., Coussens L., Liao Y.-C., Tsubokawa M., Mason A., Seeburg P.H., Grunfeld C., Rosen O.M. u. Ramachandran, J. 1985 *Nature* **313**, 756-761
- Ullrich A., Gray A., Tam A.W., Yang-Feng T., Tsubokawa M., Collins C., Henzel W., Le Bon T., Kathuria S., Chen E., Jacobs S., Francke U., Ramachandran J. u. Fujita-Yamaguchi Y. 1986 *EMBO J.* **5**, 2503-2512
- Valius M. u. Kazlauskas A. 1993 *Cell* **73**, 321-334
- Van Horn D.J., Myers Jr M.G. u. Backer J.M. 1994 *J. Biol. Chem.* **269**, 29-32
- Villalba M., Wente S.R., Russell D.S., Ahn J., Reichelderfer C.F. u. Rosen O.M. 1989 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7848-7852
- Wang L.-M., Keegan A.D., Li W., Lienhard G.E., Pacini S., Gutkind J.S., Myers M.G., Sun X.J., White M.F., Aaronson S.A., Paul W.E. u. Pierce J.H. 1993a *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 4032-4036
- Wang L.-M., Myers M.G., Sun X.J., Aaronson S.A., White M.F. u. Pierce J.H. 1993b *Science* **261**, 1591-1594
- Wei L., Hubbard S.R., Hendrickson W.A. u. Ellis L. 1995 *J. Biol. Chem.* **270**, 8122-8130
- Wennstrom S., Hawkins P., Cooke F., Hara K., Yonezawa K., Kasuga M., Jackson T., Claessonwelsh L. u. Stephens L. 1994 *Curr. Biol.* **4**, 385-393
- White M.F. 1997 *Diabetologia* **40**, S2-S17
- White M.F. 1998 *Mol. Cell. Biol.* **182**, 3-11
- White M.F. u. Kahn C. R. 1989 *J. Cell. Biol.* **39**, 429-441
- White M.F. u. Kahn C.R., 1994 *J. Biol. Chem.* **269**, 1-4
- White M.F., Häring H.U., Kasuga M. u. Kahn C.R. 1984 *J. Biol. Chem.* **259**, 255-264
- White M.F., Livingston J.N., Backer J.M., Lauris V., Dull T.J., Ullrich A. u. Kahn C.R. 1988a *Cell* **54**, 641-649
- White M.F., Maron R. u. Kahn C.R. 1985 *Nature* **318**, 183-186
- White M.F., Shoelson S.E., Keutmann H. u. Kahn C.R. 1988b *J. Biol. Chem.* **263**, 2969-2980
- Whithers D.J., Gutierrez J.S., Towery H., Burks D.J., Ren J.M., Previs S., Zhang Y.T., Bernal D., Pons S., Shulman G.I., Bonner-Weir S., White M.F. 1998 *Nature* **391**, 900-904
- Wieber 1998 Diplomarbeit an der Universität zu Köln
- Wilden P.A., Backer J.M., Kahn C.R., Cahill D.A., Schroder G.J. u. White M.F. 1990 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3358-3362
- Wilden P.A., Kahn C.R., Siddle K. u. White M.F. 1992a *J. Biol. Chem.* **267**, 16660-16668
- Wilden P.A., Siddle K., Häring E., Backer J.M., White M.F. u. Kahn C.R. 1992b *J. Biol. Chem.* **267**, 13719-13722
- Wilkinson G.N. 1961 *Biochem. J.* **80**, 324-332
- Wilson K. u. Goulding K.H. 1991 *Methoden der Biochemie*, 3. Auflage, Thieme-Verlag

- Wolf G., Trub T., Ottinger E., Groninga L., Lynch A., White M.F., Miyazaki M., Lee J. u. Shoelson S.E. 1995 *J. Biol. Chem.* **270**, 27407-27410
- Xiao S., Rose D.W., Sasaoka T., Maegawa H., Burke Jr. T.R., Roller P.P. Shoelson S.E. u. Olefsky J.M. 1994 *J. Biol. Chem.* **269**, 21244-21248
- Yamada K., Goncalves E., Kahn C.R. u. Shoelson S.E. 1992 *J. Biol. Chem.* **267**, 12452-12461
- Yamada M., Ohnishi H., Sano S., Nakatani A., Ikeuchi T. u. Hatanaka H. 1997 *J. Biol. Chem.* **272**, 30334-30339
- Yamaguchi H. u. Hendrickson W.A. 1996 *Nature* **384**, 484-489
- Yamaguchi Y., Flier J.S., Yokota A., Benecke H., Backer J.M. u. Moller D.E. 1991 *Endocrinol.* **129**, 2058-2066
- Yamamoto-Honda R., Kadowski T., Momomura K., Tobe K., Tamori Y., Shibasaki Y., Mori Y., Kaburagi Y., Koshio O., Akanuma Y. *et al.* 1993 *J. Biol. Chem.* **268**, 16859-16865
- Yamanashi Y. u. Baltimore D. 1997 *Cell* **88**, 205-211
- Yamao T., Matozaki T., Amano K., Matsuda Y., Takahashi N., Ochi F., Fujioka Y. u. Kasuga M. 1997 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **231**, 61-67
- Yamasaki H., Prager D., Gebremedhin S. u. Melmed S. 1992 *J. Biol. Chem.* **267**, 20953-20958
- Yamauchi K., Milarski K.L., Saltiel A.R. u. Pessin J.E. 1995 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 664-668
- Yamauchi T., Tobe K., Tamemoto H., Ueki K., Kaburagi Y., Yamamoto-Honda R., Takahashi Y., Yoshizawa F., Aizawa S., Akanuma Y., Sonenberg N., Yazaki Y. u. Kadowaki T. 1996 *Mol. Cell. Biol.* **16**, 3074-3084
- Yan J.X., Packer N.H., Gooley A.A. u. Williams K.L. 1998 *J. Chromatography A* **808**, 23-41
- Yenush L., Fernandez R., Myers M.G., Grammer T.C., Sun X.J., Blenis J., Pierce J.H., Schlessinger J. u. White M.F. 1996a *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2509-2517
- Yenush L., Makati K.J., Smith-Hall J., Ishibashi O., Myers Jr. M.G. u. White M.F. 1996b *J. Biol. Chem.* **271**, 24300-24306
- Yonezawa K., Pierce S., Stover C., Aggerbeck M., Rutter W.J. u. Roth R.A. 1991 *Adv. Exp. Med. Biol.* **293**, 227-238
- Yonezawa K. u. Roth R.A. 1991 *Mol. Endocrinol.* **5**, 194-200
- Yoon M.-Y. u. Cook P.F. 1987 *Biochemistry* **26**, 4118-4125
- Yuan C.J., Huang C.Y. u. Graves D.J. 1993 *J. Biol. Chem.* **268**, 17683-17686
- Zhang B. u. Roth R.A. 1992 *J. Biol. Chem.* **267**, 18320-18328
- Zhang B., Tavaré J.M., Ellis L. u. Roth R.A. 1991 *J. Biol. Chem.* **266**, 990-996
- Zhang Z.-Y. u. Dixon J.E. 1993 *Biochemistry* **32**, 9340-9345
- Zhang Z.-Y. u. Dixon J.E. 1994 *Advances in Enzymology* **68**, 1-33
- Zhang Z.-Y., Wang Y., Wu L., Fauman E.B., Stuckey J.A., Schubert H.L., Saper M.A. u. Dixon J.E. 1994 *Biochemistry* **33**, 15266-15270
- Zhang-Sun G., Yang C.-R., Viallet J., Feng G.-S., Bergeron J.J.M. u. Posner B.I. 1996 *Endocrinol.* **137**, 2649-2658
- Zhou C., Yang Y. u. Jong A.Y. 1990 *Bio-techniques* **8**, 172-173
- Zhou L.X., Chen H., Lin C.H., Cong L.N., McGibbon M.A., Sciacchitano S., Lesniak M.A., Quon M.J. u. Taylor S.I. 1997 *J. Biol. Chem.* **272**, 29829-29833
- Zick Y., Grunberger G., Podskalny J.M., Moncada V., Taylor S.I., Gorden P. u. Roth J. 1983 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **116**, 1129-1135

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben:

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. H. W. Klein nicht nur für die Überlassung des interessanten Themas, die kontinuierliche und großzügige finanzielle Unterstützung und die fruchtbaren wissenschaftlichen Diskussionen, sondern vor allem für das mir entgegengebrachte Vertrauen und das freundschaftliche Verhältnis sowie die ständige Hilfsbereitschaft und die vielfältigen Anregungen.

Meinen Kollegen Melanie Affüpper, Hadi Al-Hasani, Kristin Baer, Ulrike Beemelmans, Barbara Behle, Shanti Conn, Teresa Corona, Cora Fried, Daniela Keßler, Joachim Koch, Sima Khademlou, Marlies Koenen, Oliver Leven, Claudia Magg, Birgit Manze, Jörg Müller, Susan Parvaresch, Waltraud Paßlack, Felicitas Priboth, Norbert Tennagels, Alexander Wieber und Angela Wirth danke ich für die gute Zusammenarbeit, das angenehme Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft.

Herausgehoben seien dabei Claudia, Melanie und Norbert.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern des Biochemischen Instituts für ihre kompetente Hilfe und das freundschaftliche Verhältnis: Martina Fischer, Khamis Jakob, Gerhild Jugert, Manfred Kreikler, Michael Lohmer, Uwe Otto, Gunter Pillunat, Herrn Pyschny und Fritz Schmitz.

Erklärung

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

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Helmut W. Klein betreut worden.

Teilpublikationen

V. Nölle, E. Klein, O. Leven, J. Müller, S. Parvaresh, H.W. Klein (1996)

Recombinant peptide substrates of the insulin receptor

Biol. Chem. Hoppe-Seyler **377**, S154

N. Tennagels, C. Magg, V. Nölle, H.W. Klein (1996)

Characterisation of the intrinsic serine phosphorylation of the insulin receptor

Biol. Chem. Hoppe-Seyler **377**, S154

und

4. KBF-Symposium: Molecular Targets for Drug Development, Braunschweig

N. Tennagels, C. Magg, V. Nölle, S. Parvaresh, D. Müller-Wieland, H.W. Klein (1997)

The dual kinase activity of the insulin receptor in respect to auto- and substrate phosphorylation

Diabetes **46**, suppl. 1, 384

N. Tennagels, V. Nölle, M. Affüpper, S. Parvaresh, D. Müller-Wieland, H.W. Klein (1997)

The insulin receptor kinase phosphorylates substrates on serine residues

FEBS Special Meeting, Amsterdam, Cell Signaling Mechanisms, P4 089

N. Tennagels, S. Parvaresh, J. Koch, V. Nölle, M. Affüpper, D. Müller-Wieland, H.W. Klein (1997)

Is serine kinase activity of the insulin receptor a mechanism for desensitization in insulin receptor signaling?

International Symposium on Structures and Mechanisms in Biological Signal and Energy Transduction, Ruhr-Universität Bochum

V. Nölle, N. Tennagels, H.W. Klein (1998)

Mutational analysis of the soluble insulin receptor kinase

Biol. Chem. Hoppe-Seyler **379**, S108

N. Tennagels, V. Nölle, S. Parvaresh, H.W. Klein (1998)

Transient tyrosine phosphates: a new insight of their role in the dual kinase activity of the insulin receptor

Biol. Chem. Hoppe-Seyler **379**, S135

S. Lehr, J. Kotzka, A. Herkner, E. Klein, C. Siethoff, B. Knebel, V. Nölle, J. C. Brüning, H. W. Klein, H. E. Meyer, W. Krone, D. Müller-Wieland (1999)

Identification of tyrosine phosphorylation sites in human Gab-1 protein by EGF receptor kinase *in vitro*

Biochemistry **38**, 151-159

in Vorbereitung:

V. Nölle, N. Tennagels, H.W. Klein

Dual activity of the insulin receptor kinase: A mutational analysis

N. Tennagels, S. Parvaresh, V. Nölle, H.W. Klein

The insulin receptor kinase: Dual specificity towards substrates

LEBENS LAUF

17.02.1969	Geboren in Köln
1975-1979	Besuch der Städt. Grundschule Soldiner Straße, Köln
1979-1988	Besuch des Städt. Gymnasiums Schulstraße, Köln
Juni 1988	Abitur
Juli 1988-Februar 1990	Ersatzdienst bei MSHD / Amt für Diakonie, Köln
Oktober 1990	Studium an der Universität zu Köln, Fachrichtung Biologie (Diplom)
Oktober 1992	Diplom Vorprüfung
Dezember 1994	Diplom Hautprüfung
März 1995-Dezember 1995	Diplomarbeit am Diabetes Forschungsinstitut Düsseldorf unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H.W. Klein: <i>Zum Mechanismus der Tyrosinkinase des humanen Insulinrezeptors: Herstellung der Rezeptor-Mutante C1296S</i>
Januar 1996-Oktober 1998	Dissertation im Hauptfach Biochemie an der Universität zu Köln unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H.W. Klein