

Was bestimmt die Spezifität einer Tyrosinkinase?

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Daniel-Sebastian Karau

aus Rheine

2009

Berichterstatter:

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

Prof. Dr. J. Marner (2.Gutachter)

Prof. Dr. S. Korsching (Prüfungsvorsitz)

Tag der mündlichen Prüfung:

24.06.2009

Meinen Eltern

„Das ist ein Nod-Problem...“

Matt Ruff - „Bad Monkeys“

Die im folgenden dokumentierte Arbeit wurde in der Zeit vom
01.01.2005 bis zum 25. April 2009
am Institut für Biochemie der Universität zu Köln
unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. W. Klein durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Abstract	3
3 Einleitung	5
3.1 Allgemeine Einführung.....	5
3.2 Kinasen und ihre Funktion	6
3.2.1 Topologie der Rezeptortyrosinkinasen.....	7
3.2.2 Unterschiede zwischen Ser/Thr-Kinasen und Tyrosinkinasen.....	10
3.3 Die Familie der Insulinrezeptorkinasen.....	13
3.4 Unterschiede zwischen IR und IGF-1R.....	15
3.5 Substrate und Signalwege des IGF-1R	15
3.5.1 Signalwege die durch IRS-1 gesteuert werden.....	16
3.6 Spezifische Protein-Protein Interaktion.....	19
3.6.1 Scaffolds und Ihre Bedeutung in Signalwegen.....	21
3.7 Die Phosphotyrosin-bindende Domäne (PTB).....	22
3.7.1 Strukturelle Analyse der Peptidbindung der PTB.....	24
3.8 Bedeutung der Serinphosphorylierung innerhalb des Insulinsignalwegs.....	25
4 Fragestellung	28
5 Ergebnisse	30
5.1 Serinphosphorylierung durch IRKD und IGF.....	30
5.2 Bestimmung der Determinanten für duale Substratphosphorylierung.....	32
5.2.1 Etablierung von dimeren Kinasen.....	32
5.2.2 Phosphorylierung von GST-PTB275 durch GST-Kinasen.....	35
5.2.3 Nachweis der Bindung von GST-PTB275 an die IGF-Kinase.....	37
5.2.4 Ist das Faltungsdimer GST von Substrat und Kinase der Grund für die Substrat-Kinase-Interaktion?.....	39
5.2.5 Phosphorylierung der denaturierten GST-PTB275	40
5.2.6 Phosphorylierung von GST-PTB275 durch Kinasen mit mutierter Aktivierungsschleife.....	42
5.2.7 Konzentrationsabhängige Substratphosphorylierung von GST-PTB275 durch GST-TS-IGF Δ C und GST-TS-IGF Δ C Phe.....	44
5.2.8 Modulation der dualen Phosphorylierung durch Substratverlängerung.....	45
5.3 Auswirkungen einer kovalenten Bindung zwischen Substrat und Kinase.....	55
5.4 Bestimmung der Serinphosphorylierungsstelle.....	57
5.4.1 Eingrenzung der Serinphosphorylierungsstelle.....	58
5.4.2 Prinzip des Ala-Scans am Beispiel der Serinkinase Akt.....	59
5.4.3 Ermittlung der Serinphosphorylierungsstelle für die IGF-Kinase in GST-PTB275 durch Alanin-Scanning.....	62
5.4.4 Vollständige Substitution des Serin-Clusters.....	64
5.4.5 Separation des Serinclusters.....	66

Verzeichnisse

5.4.6 Das Serincluster der PTB ist kein Substrat für die IGF-Kinase, wenn es nicht mit dieser interagieren kann.....	68
5.4.7 Das Serincluster wird nicht durch die IGF-Kinase phosphoryliert, wenn es in seiner relativen Position innerhalb der PTB-Domäne verschoben wird.....	70
5.4.8 Massenspektroskopische Analyse der phosphorylierten GST-PTB275.....	71
5.4.9 Bromcyan Verdau (BrCN) der phosphorylierten GST-PTB275.....	72
5.5 Auswirkungen der Proteinkomplexbildung auf nachgeschaltete Effektorinasen....	75
5.5.1 Phosphorylierung von GST-PTB370 durch die Akt-Kinase in Anwesenheit von GST-IGFD→A.....	77
5.5.2 Phosphorylierung von GST-PTB370 durch die Akt-Kinase in Anwesenheit von GST-14-3-3γ.....	79
5.5.3 Konkurrenz der Akt-Phosphorylierung durch GST-IGFD→A und GST-14-3-3γ.....	82
5.5.4 Sequenzielle Phosphorylierung durch zwei Kinasen.....	84
6 Diskussion	87
6.1 Duale Proteinkinasen.....	87
6.2 Proteinbindung im zellulären Kontext.....	89
6.3 Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten Kinasen.....	89
6.4 Duale Substratphosphorylierung durch die IGF-Kinase.....	91
6.4.1 Bestimmung der Serinphosphorylierungsstelle der IGF-Kinase von GST-PTB275.....	95
6.4.2 Bewertung der massenspektroskopischen Auswertung.....	97
6.5 Kinetische Untersuchungen der dualen Phosphorylierung.....	99
6.6 Mechanistische Überlegungen der dualen Kinaseaktivität.....	100
6.7 Wirkt sich der IGF-Kinase-Substrat-Komplex auf nachgeschaltete Serinkinasen aus?.....	104
6.8 Resümee und Ausblick.....	109
7 Material	111
7.1 Bakterienstämme, Viren, Kulturmedien und -Zusätze.....	111
7.2 Chemikalien.....	111
7.3 Chromatographiematerial.....	113
7.4 Kit-Systeme.....	113
7.5 Laborgeräte.....	114
7.6 Molekulargewichte und Massenstandards.....	116
7.7 Nucleinsäuren.....	116
7.7.1 Plasmidvektoren.....	116
7.7.2 Primer.....	116
7.8 Proteine.....	118
7.8.1 DNA-modifizierende Enzyme und zugehörige Puffer.....	118
7.8.2 Proteasen.....	118
7.9 Puffer und Lösungen.....	118
7.10 Verbrauchsmaterial.....	122

7.11 EDV und genutzte Programme.....	122
7.11.1 Datenerfassung.....	122
7.11.2 Densiometrie.....	123
7.11.3 Molekularbiologische Standardanwendungen.....	123
7.11.4 Programme zur Bilderfassung und -bearbeitung.....	123
8 Methoden	124
8.1 Molekularbiologische Methoden.....	124
8.1.1 Klonierung von GST-PTB263.....	124
8.1.2 Klonierung der Single-Ala-PTB-Mutanten des ersten Alanin-Scans.....	124
8.1.3 Klonierung von Single-S-PTB-Mutanten für den zweiten Alanin-Scan.....	125
8.1.4 Klonierung von His-Tyrtide-SPeptid-rCys.....	125
8.1.5 Klonierung von His-PTB263-SPeptid-rCys.	126
8.2 Biochemische Methoden.....	126
8.2.1 Baculovirus-Expressionssystem.....	126
8.2.2 Proteinexpression in E.coli.....	129
8.2.3 Chromatographische Methoden.....	130
8.2.4 Proteolytische Spaltungen.....	136
8.2.5 Analytische Modifikation von reaktiven Cysteinen.....	137
8.2.6 Präparative Modifikation von reaktiven Cysteinen.....	137
8.2.7 Dialyse von Proteinen.....	138
8.2.8 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen.....	138
8.2.9 Charakterisierung von Proteinkonzentration und -Identität	138
8.2.10 Phosphorylierungsreaktionen.....	143
8.2.11 BrCN Verdau von phosphorylierter GST-PTB275.....	148
9 Literaturverzeichnis	150
10 Anhang	158
10.1 Plasmidkarten.....	158
10.2 Reinigungsdokumentationen.....	161
10.3 Phosphorylierungsreaktionen.....	168

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1.: Schematischer Aufbau der Kinasedomäne einer Proteinkinase in aktiver Form mit gebundenem Substrat.....	9
Abbildung 3.2.: Schematische Darstellung der katalytischen Region von Kinasen.....	11
Abbildung 3.3.: Sequenzvergleich des Aktivierungssegments von dualen Kinasen mit Tyrosinkinasen und Ser/Thr-Kinasen.....	12
Abbildung 3.4.: Schematische Darstellung der verschiedenen Signalwege, welche über den IGF-1-Rezeptor gesteuert werden.....	18
Abbildung 3.5.: Kristallstruktur der PTB-Domäne von IRS-1.....	24
Abbildung 5.1.: Zeitabhängige Phosphorylierung von GST-Y-PTB275 durch IRKD Wildtyp (grün) und Phe-Mutante (rot).....	31
Abbildung 5.2.: Kontrolle der Kinaseaktivität von GST-TS-IGFΔC und GST-IGFΔC Phe durch Auto- und Substratphosphorylierung.....	34
Abbildung 5.3.: Schematische Darstellung des Substrats GST-PTB275.....	35
Abbildung 5.4.: Zeitabhängige Phosphorylierung von GST-PTB275 durch GST-TS-IGFΔC und GST-TS-IGFΔC Phe.....	36
Abbildung 5.5.: Native PAGE zur Interaktion von radioaktiv phosphoryliertem GST-IGFNT mit GST-PTB275.....	38
Abbildung 5.6.: Zeitabhängige Phosphorylierung von GST-PTB275 durch GST-TS-IGFΔC und GST-TS-IGFΔC Phe ± 15 μM GST.....	40
Abbildung 5.7.: Phosphorylierung von GST-PTB275 im nativen und denaturierten Zustand durch GST-TS-IGFΔC und GST-AktOca.....	41
Abbildung 5.8.: Zeitabhängige Phosphorylierung von GST-PTB275 durch Kinasen mit mutierter Aktivierungsschleife.....	43
Abbildung 5.9.: Vergleich der Initialgeschwindigkeiten von GST-TS-IGFΔC und GST-TS-IGFΔC Phe für steigende Konzentrationen des Substrats GST-PTB275.....	45
Abbildung 5.10.: Schematische Darstellung der Substrate GST-PTB370 (A) und GST-TS-IRS-1738 (B).....	46
Abbildung 5.11.: Zeitabhängige Phosphorylierung von GST-PTB370 durch GST-TS-IGFΔC WT und GST-TS-IGFΔC Phe (rot).....	48
Abbildung 5.12.: Vergleich der Initialgeschwindigkeiten von GST-TS-IGFΔC und GST-TS-IGFΔC Phe für steigende Konzentrationen des Substrats GST-PTB370.....	49
Abbildung 5.13.: Zeitabhängige Phosphorylierung von GST-TS-IRS-1665 durch monomere IGF Kinasen.....	51
Abbildung 5.14.: Zeitabhängige Phosphorylierung von TS-IRS-1665 durch dimere GST-IGF Kinasen.....	53
Abbildung 5.15.: Zeitabhängige Phosphorylierung von GST-TS-IRS-1738 durch dimere GST-IGF Kinasen.....	54
Abbildung 5.16.: Zeitabhängige Phosphorylierung der Hybride GST-IRKD-IRS-1738 und GST-IRKDPhe-IRS-1738.....	56
Abbildung 5.17.: Sequenzausschnitt des C-Terminus der GST-PTB275 von Arginin265 bis Asparagin275 (Serincluster).....	58
Abbildung 5.18.: Zeitabhängige Phosphorylierung von GST-PTB263 durch GST-TS-IGFΔC.....	59
Abbildung 5.19.: Zeitabhängig Phosphorylierung von GST-PTB275 S270A durch GST-AktOca...60	
Abbildung 5.20.: Vergleichende zeitabhängige Phosphorylierung von GST-PTBS270Y durch GST-TS-IGFΔC und GST-AktOca.....	61
Abbildung 5.21.: Auswertung des Ala-Scans wenn je ein Serin des Clusters zu Alanin substituiert	

ist.....	63
Abbildung 5.22.: Auswertung des zweiten Ala-Scans.....	65
Abbildung 5.23.: Schematische Darstellung des Substrats His-Tyrtide-SPeptid-rCys (A) und His-PTB263-SPeptid-rCys (B).....	67
Abbildung 5.24.: Zeitabhängige Phosphorylierung von His-Tyrtide-SPeptid-rCys durch GST-TS-IGFAC und GST-AktOca.....	69
Abbildung 5.25.: Zeitabhängige Phosphorylierung von His-PTB263-SPeptid-rCys durch GST-TS-IGFAC (grün) und GST-AktOca.....	70
Abbildung 5.26.: Auswertung der Phosphoaminosäureanalyse durch das ZMMK-Service-Zentrum Köln.....	72
Abbildung 5.27.: BrCN Verdau der durch GST-AktOca und GST-TS-IGFAC radioaktiv phosphorylierten GST-PTB275.....	74
Abbildung 5.28.: Zeitabhängige Phosphorylierung des Substrats GST-PTB370 durch GST-AktOCA ± GST-IGFD→A	77
Abbildung 5.29.: Zeitabhängige Phosphorylierung des Substrats Crosstide durch GST-AktOca ± GST-IGFD→A.....	79
Abbildung 5.30.: Zeitabhängige Phosphorylierung des Substrats GST-PTB370 durch GST-AktOCA ± GST-14-3-3γ.....	80
Abbildung 5.31.: Zeitabhängige Phosphorylierung von Crosstide durch GST-AktOCA ± GST-14-3-3γ.....	81
Abbildung 5.32.: Zeitabhängige Phosphorylierung von GST-PTB370 durch GST-TS-IGFAC ± GST-14-3-3γ.....	82
Abbildung 5.33.: Zeitabhängige Phosphorylierung des Substrats GST-PTB370 durch GST-AktOCA ± GST-14-3-3γ und GST-IGFD→A.	83
Abbildung 5.34.: Sequenzielle Phosphorylierung von GST-PTB275 durch zwei unterschiedliche Kinasen.....	85
Abbildung 6.1.: Autoradiographie der durch GST-AktOca phosphorylierten GST-PTB370 (A) und GST-PTB370 S270A (B) in Anwesenheit von GST-IGFD→A.....	107
Abbildung 8.1.: Schema der BrCN Spaltung von Peptiden unter sauren Bedingungen an Methionin.	149
Abbildung 10.1.: Plasmidkarte und Nukleotidsequenz als FASTA-File des kodierenden Bereiches von GST-TS-IGFAC aus dem Vektor pAc-G2T-TS-IGF-dC	158
Abbildung 10.2.: Plasmidkarte und Nukleotidsequenz als FASTA-File des kodierenden Bereiches von GST-TS-IGFAC Phe aus dem Vektor pAc-G2T-TS-IGF-dC-Y950F	158
Abbildung 10.3.: Plasmidkarte und Nukleotidsequenz als FASTA-File des kodierenden Bereiches von pCis2-IRS-1.....	159
Abbildung 10.4.: Plasmidkarte und Nukleotidsequenz als FASTA-File des kodierenden Bereiches von GST-PTB275 aus dem Vektor pGex-3X-IRS-1-PTB275	159
Abbildung 10.5.: Plasmidkarte und Nukleotidsequenz als FASTA-File des kodierenden Bereiches von GST-TS-IRS-1 aus dem Vektor pAc-G2T-TS-IRS-1.....	160
Abbildung 10.6.: Plasmidkarte und Nukleotidsequenz als FASTA-File des Klonierungsbereiches von pet-NTHis-Tyrtide-TS-CTCys.....	160
Abbildung 10.7.: Reinigungsdokumentation der IRKD	161
Abbildung 10.8.: Reinigungsdokumentation der GST-TS-IGFAC	161
Abbildung 10.9.: Reinigungsdokumentation des Hybrids GST-IRKD-IRS-1738.....	162
Abbildung 10.10.: Reinigungsdokumentation der TEV-Spaltung von GST-TS-IGFAC.....	163
Abbildung 10.11.: Reinigungsdokumentation von GST-PTB275.....	163
Abbildung 10.12.: Reinigungsdokumentation von GST-PTB263.....	164
Abbildung 10.13.: Reinigungsdokumentation von GST-PTBS74A.....	164
Abbildung 10.14.: Reinigungsdokumentation von GST-14-3-3γ.	165
Abbildung 10.15.: Reinigungsdokumentation von GST-PTB370	165

Verzeichnisse

Abbildung 10.16.: Reinigungsdokumentation von GST-IGFNT.	166
Abbildung 10.17.: Reinigungsdokumentation von GST-PTBS74A.	166
Abbildung 10.18.: Reinigungsdokumentation von His-Tyrtide-SPeptid-rCys.....	167
Abbildung 10.19.: Reinigungsdokumentation von His-PTB263-SPeptid-rCys.....	167
Abbildung 10.20.: Dokumentation des ersten Ala-Scans (siehe Kapitel 5.4.3)	168
Abbildung 10.21.: 1D PASA des ersten Alanin-Scans (siehe Kapitel 5.4.3) aller PTB-Mutanten nach 30 min.....	168
Abbildung 10.22.: 1D PASA des zweiten Alanin-Scans.....	169
Abbildung 10.23.: A) Zeitabhängige Autophosphorylierung von verschiedenen Activation-Loop- Mutanten.....	169
Abbildung 10.24.: Vergleich der Initialgeschwindigkeiten von GST-TS-IGFΔC (grün) und GST-TS-IGFΔC Phe (rot) für steigende Konzentrationen von GST-IGFD→A . .	170

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1.: Zusammenfassung von Serin-/Threoninkinasen die IRS-1 phosphorylieren können. .	26
Tabelle 5.1.: Prozentuale Phosphat-Verteilung auf die einzelnen Aminosäuren der untersuchten PTB Mutanten des ersten Alanin-Scans.....	64
Tabelle 5.2.: Prozentuale Phosphat-Verteilung auf die einzelnen Aminosäuren der untersuchten PTB Mutanten des zweiten Alanin-Scans.....	66
Tabelle 5.3.: Übersicht der Peptide die durch einen BrCN-Verdau von GST-PTB275 erwartet werden.....	73
Tabelle 6.1.: Eigenschaften der möglichen dualen Protein Kinasen nach Lindberg et al. (TIBS 1992)[5].....	88
Tabelle 6.2.: Vergleich der maximalen Initialgeschwindigkeiten der GST-TS-IGFΔC Kinasen für verschiedene Substrate.....	99
Tabelle 8.1.: Zusammensetzung der verwendeten Trenn- und Sammelgele.....	140
Tabelle 8.2.: Zusammensetzung der verwendeten Trenn-, Spacer und Sammelgele.....	141
Tabelle 8.3.: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die native PAGE.....	141

Abkürzungsverzeichnis

A	E.coli <i>Escherichia coli</i>	K
AcNPV <i>Autographa californica Nuclear Polyhydrosis Virus</i>	EDTA <i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>	Kap Kapitel
Ala Alanin	EGFR <i>Epidermal growth factor Rezeptor</i>	kDa Kilodalton
APS <i>Ammoniumpersulfat</i>	EGTA <i>Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure</i>	L
Arg Arginin	et al <i>et aliter</i>	LIRK <i>lösliche Insulinrezeptorkinase</i>
ATP <i>Adenosintriphosphat</i>	F	M
B	FPLC <i>Fast performance Liquid Chromatography</i>	mA Milliampere
BCIP <i>5-Brom-4-Chlor-3-Indolyphosphat</i>	G	MAPK <i>Mitogen activatated Protein Kinase</i>
BSA <i>Rinderserumalbumin</i>	GEF <i>Guanin-Nukleotid-Austaufaktor</i>	min Minute
bzw <i>beziehungsweise</i>	Glu Glutamat	mind <i>mindestens</i>
C	Gly Glycin	ml Milliliter
ca <i>Circa</i>	GST <i>Glutathion-S-Transferase</i>	mm Millimeter
Ci <i>Curie</i>	H	mM Millimolar
cpm <i>counts per minute, Zählimpuls pro Minute</i>	His Histidin	MQ Millipore Wasser
Csk <i>Src am C-Terminus phosphorylierende Kinase</i>	HPLC <i>High Pressure Liquid Chromatography</i>	N
CT <i>C-terminale Domäne</i>	I	NGFR/ Trk <i>nerve growth factor receptor</i>
Cys Cystein	IGF <i>insulin like growth factor</i>	P
D	IR <i>Insulinrezeptor</i>	PAGE <i>Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>
d.h <i>das heißt</i>	IRKD <i>Insulinrezeptor-Kinasedomäne</i>	PASA <i>Phosphoaminosäureanalyse</i>
Da Dalton	IRR <i>insulin-related-Rezeptor</i>	PBS <i>phosphate buffered saline</i>
Dab <i>Death-Associated Protein</i>	IRS-1 <i>Insulinrezeptor-Substrat-1</i>	PDGFR <i>Platelet-derived growth factor Rezeptor</i>
DMSO <i>Dimethylsulfoxid</i>	Itk <i>Interleukin-2-Tyrosinkinase</i>	Pdk1 <i>Phosphatidylinositol- dependent kinase-1</i>
DNA <i>Desoxiribonucleinsäure</i>	J	pH <i>potentium hydrogenii</i>
Dok <i>downstream of tyrosine kinases</i>	JNK1 <i>c-Jun N-terminal Protein Kinase</i>	PH <i>Pleckstin homology</i>
DTT <i>Dithiothreitol</i>		Phe <i>Phenylalanin</i>
E		Pi <i>anorganisches Phosphat</i>

Verzeichnisse

PI3K <i>Phosphatidylinositol-3-Kinase</i>	<i>Rezeptor-Tyrosinkinase</i>	Tris <i>Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan</i>
PIP3 <i>Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-Triphosphat</i>	S S6K1 <i>Protein S6 Kinase 1</i>	Trp <i>Tryptophan</i>
PKA <i>cAMP-abhängige Proteinkinase A</i>	SDS <i>Natriumdodecylsulfat</i>	TSC <i>Tuberous Sclerosis Complex</i>
PKB/Akt <i>Proteinkinase B</i>	sec <i>Sekunde</i>	Tyr <i>Tyrosin</i>
pmol <i>picomol</i>	Ser <i>Serin</i>	U
PMSF <i>Phenylmethylsulfonylfluorid</i>	Sf9 <i>Spodoptera frugiperda</i>	UV <i>Ultraviolett</i>
Pro <i>Prolin</i>	SH2 <i>src homology domain</i>	V
pS <i>Phosphoserin</i>	Shc <i>sh2-containing protein</i>	v/v <i>volume/volume, ml Volumen in 100ml Gesamtvolumen</i>
PSK <i>Serin/Threonin-Kinasen</i>	Shp <i>Src Homolog 2 domain containing phosphatase</i>	W
pT <i>Phosphothreonin</i>	SIRP <i>signal related proteins</i>	w/v <i>weight/volume, g Substanz in 100 ml Gesamtvolumen</i>
PTB <i>Phosphotyrosinbindende Domäne</i>	sog <i>sogenannt</i>	Z
PTK <i>Protein-Tyrosin-Kinasen</i>	Sos <i>Son of Sevenless</i>	z.B. <i>zum Beispiel</i>
PVDF <i>Polyvinylidendifluorid</i>	Src <i>Rous Sarcoma Virus</i>	°
pY <i>Phosphotyrosin</i>	T	°C..... <i>Grad Celsius</i>
R	TBS <i>Tris Buffered Saline</i>	α
Ref. <i>Referenz</i>	TEMED <i>N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin</i>	αC <i>α-C-Helix</i>
rpm <i>revolutions per minute</i>	TEV <i>Tobacco Etch Virus</i>	μ
RT <i>Raumtemperatur</i>	Thr <i>Threonin</i>	μCi <i>Mikrocurie</i>
RTK <i>tumor necrosis factor receptor</i>	TNFR <i>tumor necrosis factor receptor</i>	μg <i>Mikrogramm</i>
		μl <i>Mikroliter</i>
		μM <i>Mikromolar</i>

1 Zusammenfassung

Der Insulinrezeptor (IR) und der nah verwandte *insulin-like growth factor-1 receptor* (IGF-1R) sind Mitglieder der Familie der transmembranständigen Rezeptortyrosinkinasen. Nach Stimulation durch Insulin zeigt der IR in der Autophosphorylierung eine duale Aktivität, d.h. Phosphorylierung von Tyrosin- und Serinresten. Wird die lösliche Insulinrezeptorkinase als dimeres GST-Fusionsprotein exprimiert, so zeigt diese Kinase auch in der Autophosphorylierung duale Aktivität. Duale Substratphosphorylierung durch IR bzw. IGF-1R konnte nur beobachtet werden, wenn im Phosphorylierungsansatz Poly-Lysin als „Vernetzer“ in äquimolaren Konzentrationen vorlag.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen von Kinase-Substratkomplexen auf die Spezifität von Kinasen und auf nachgeschaltete Effektoren untersucht. Als Modellsubstrat wurde die Phosphotyrosin-bindende Domäne (PTB) des humanen Insulinrezeptorsubstrats (IRS-1) verwendet. Die PTB-Domäne weist sowohl die Eigenschaften eines „Vernetzers“ auf, ist jedoch gleichzeitig ein geeignetes Substrat für die Kinasen des IR und IGF-1R. Dazu wurden verschiedene Varianten der PTB-Domäne kloniert, gereinigt und in Kinase-Assays eingesetzt. Als Modellenzyme wurden die lösliche, dimere GST-getagte Kinasedomäne des IGF-1R verwendet, sowie eine Mutante dieser Kinase, in der die PTB-Bindung durch Substitution des essenziellen Tyrosin⁹⁵⁰ stark abgeschwächt ist.

Es konnte gezeigt werden, dass Kinase und Substrat einen stabilen Komplex eingehen. Auf nachgeschaltete Effektorinasen hat dieser Proteinkomplex weitreichende Auswirkungen. Eine Effektorkinase außerhalb des Signalosoms zeigte nur geringe katalytische Effizienz für das Substrat im Signalosom.

Kinase und Substrat bilden 1:1-Komplexe, sodass eine „quasi“-intramolekulare Reaktion stattfindet. Somit unterliegt der Mechanismus der Substratphosphorylierung im Komplex keiner Michaelis-Menten-Kinetik.

Durch den Kinase-Substrat-Komplex wird nicht nur die Aktivität der komplexierten Tyrosinkinase gesteigert, sondern darüber hinaus ihre Spezifität von Tyrosinphosphorylierung auf Serin- und Threoninphosphorylierung erweitert. Wird die Komplexbildung auf Seite der Kinase oder des Substrats pertubiert, so konnte keine

Phosphorylierung des Substrats mehr beobachtet werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wird ein Modell der Kinasespezifität postuliert, das zwischen der Proteinbindung über „Docking“-Domänen und der Bindung von Substraten im katalytischen Zentrum unterscheidet. Dieses Modell erklärt die Spezifität von Tyrosinkinasen: Einer Kinase wird für jeden Phosphorylakzeptor im Substratprotein eine Präferenz zugeordnet, unabhängig davon, ob es sich um ein Tyrosin, Threonin oder Serin handelt. Diese Präferenz wird durch die Eigenschaften des Kinase-Substrat-Komplexes bestimmt. Hier ist die Aufenthaltsdauer des „Docking“-Proteins im Komplex mit der Kinase, sowie die Flexibilität der zu phosphorylierenden Aminosäurereste, entscheidend.

2 Abstract

The insulin receptor (IR) and the closely related insulin-like growth factor receptor (IGF-1R) are members of the transmembrane receptor tyrosine kinase family. IR autophosphorylation after insulin stimulation reveals dual activity, that is, phosphorylation of both tyrosine and serine residues. Insulin receptor kinase, if expressed as a soluble, dimeric GST-fusion protein, also displays dual activity during autophosphorylation. Dual substrate phosphorylation by IR or IGF-1R was detected only with a polylysine linker present in equimolar concentrations.

In this thesis, the effects of kinase-substrate-complexes on the dual specificity of kinases and on downstream effectors were analyzed. The phosphotyrosine binding domain (PTB) of the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) was used as a model substrate. PTB functions as both a linker and a suitable substrate for the kinase domain of the IR and the IGF-1R. Therefore, different variants of the PTB were cloned, purified and analyzed in kinase assays. The soluble, dimeric GST-fused kinase domain of the IGF-1R was used as a model enzyme, as well as a mutant of this kinase in which PTB binding is impaired by substitution of the essential tyrosine 950.

A stable complex formation between kinase and substrate could be demonstrated. This complex has extensive impact on downstream effector kinases. An effector kinase beyond the signalosome shows only marginal catalytic activity towards the substrate at the signalosome.

Kinase and substrate form a 1:1 complex, so that a “quasi”-intramolecular reaction appeared. Therefore, the mechanism of substrate phosphorylation within this complex does not comply with Michaelis-Menten kinetics.

Complex formation between kinase and substrate not only increases kinase activity but also extends kinase specificity from tyrosine phosphorylation to serine- and threonine phosphorylation. Perturbation of complex formation on the part of either the kinase or the substrate resulted in a total loss of substrate phosphorylation.

Based on these results, a model for kinase specificity is postulated which distinguishes between protein binding by docking sites and binding of substrate amino acid residues to the catalytic cleft. This model explains the specificity of tyrosine kinases: the kinase

Abstract

exhibits a distinct preference for every phosphoryl acceptor within the substrate, regardless of this residue being a tyrosine-, threonine-, or serine residue. This preference is determined by the characteristics of the kinase-substrate-complex, particularly the duration of the binding of the docking substrate in complex, as well as the flexibility of the phosphoryl acceptor residues.

3 Einleitung

3.1 Allgemeine Einführung

Protein-Protein-Wechselwirkungen sind essenziell für die Bildung von zellulären, makromolekularen Strukturen. Ein zentraler Aspekt ist hierbei die Bildung von enzymatischen Komplexen, welche die Regulation und den Metabolismus der Zelle bestimmen^[1]. Es wird geschätzt, dass jedes zelluläre Protein im Durchschnitt mit bis zu 10 Partnern interagiert. Ein primärer Mechanismus dieser Signaltransduktion in Zellen ist hierbei die Phosphorylierung von Proteinen durch den Transfer der γ -Phosphatgruppe von ATP auf -OH-, -SH oder -N Gruppen von Aminosäureresten. Die reversible Übertragung von Phosphatresten spielt eine entscheidende Rolle für die Zellkommunikation und das Überleben der Zelle. Unkontrollierte Phosphorylierung kann die Ursache oder die Konsequenz von Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Krebs oder diverser Immunerkrankungen sein^[2]. Dieser Phosphat Transfer wird durch eine große Gruppe von Enzymen, den Proteinkinasen, gewährleistet. Darüber hinaus wird die Wichtigkeit der Proteinphosphorylierung in der eukaryotischen Signalübertragung dadurch bestätigt, dass Proteinkinasen ungefähr 2% des gesamten Genoms ausmachen^[3]. Die Sequenzierung des menschlichen Genoms hat mindestens 500 verschiedene Kinasen ausgewiesen, die, aufgrund ihrer strukturellen Übereinstimmungen, in etwa 20 Unterfamilien eingeteilt werden können^[4]. Die Familie der Proteinkinasen wurde lange Zeit in zwei Klassen eingeteilt: Protein-Serin/Threonin-Kinasen (PSK), die entsprechend spezifisch für Serin- und/oder Threoninreste sind, und Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK), die Tyrosinreste in Proteinen phosphorylieren. Durch die Entdeckung von mehreren Proteinkinasen, die fähig sind, sowohl sich selbst als auch Substrate an Tyrosinresten und Serin-/Threoninresten zu phosphorylieren, wurde eine dritte Kinase-Klasse der Proteinkinasen postuliert: Kinasen mit dualer Spezifität^[5].

Äußere Signale werden durch Botenstoffe wie Hormone, Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren an die jeweiligen zellulären Strukturen übermittelt. Diese können elektrophysiologisch durch Potentialänderung an Membranen, sterisch durch Strukturveränderungen oder chemisch durch posttranslationale Modifikationen der beteiligten Signalmoleküle in das Innere der Zelle weitergeleitet werden, wo sie biochemisch verarbeitet werden. Wichtige Komponenten der intrazellulären

Signaltransduktion sind GTPasen, Adaptermoleküle, Proteinphosphatasen und Proteinkinasen. Phosphorylierung von Proteinen kann zu sterischen und elektrostatischen Effekten führen, welche die Struktur, die zelluläre Lokalisation oder Bindungseigenschaften verändert. Über die Strukturveränderung kann sich auch die enzymatische Aktivität oder die subzelluläre Lokalisation verändern. Weiterhin können neue Bindungsstellen (*docking Sites*) für aktivierende oder inhibitorische Bindungspartner entstehen oder verloren gehen^[6]. Die wichtige Rolle reversibler Phosphorylierung wurde schon für viele Signaltransduktionswege gezeigt^[7,2].

Wie spezifische Substrat Erkennung bei einer Myriade von Proteinkinasen erreicht wird, ist bis heute nicht vollständig verstanden. Jedoch liegt es nahe, dass die Determinanten für diese Spezifität außerhalb der eigentlichen Phosphorylierungsstelle liegen müssen^[8].

3.2 Kinasen und ihre Funktion

Auf der Basis der Sequenz und Struktur bilden eukaryotische Proteinkinasen eine nah verwandte Super-Familie. Diese unterscheiden sich von den Histidinkinasen und anderen Phosphoryltransferasen. Alle eukaryotischen Proteinkinasen katalysieren dieselbe Reaktion, den Transfer des γ - Phosphats (Phosphorylrest) von ATP an die Hydroxylgruppe von Serin, Threonin oder Tyrosin. Da die Klasse der eukaryotischen Proteinkinasen, welche mehreren hundert Mitglieder zählt, dasselbe katalytische Gerüst aufweist, hat sich eine Anzahl von sehr verschiedenen, regulatorischen Mechanismen entwickelt. Dies erlaubt Kinasen, in der Funktion individuell zu sein. Im Grundzustand sind Proteinkinasen in der Regel inaktiv und die Akquisition der katalytischen Aktivität wird oftmals erst nach einer mehrstufigen Kontrolle erreicht. Die Reichweite dieser Kontrolle geht von der Bindung allosterischer Effektoren bis zur Änderungen der subzellulären Lokalisation des Enzyms. Proteinkinasen stellen molekulare Schalter dar, die zumindest zwei extreme Konformationen einnehmen können: einen „An“-Zustand mit maximaler Aktivität und einen „Aus“-Zustand, der minimal aktiv ist.

PSKs stellen die bei weitem am besten untersuchte Klasse der Proteinkinasen dar. Das am besten dokumentierte Modell für eine Kinase diesen Typs ist die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA). Die PKA war zudem die erste Kinase, deren Kristallstruktur veröffentlicht wurde^[9]. Die PKA besitzt eine zweilappige Struktur, einen kleineren,

vornehmlich aus β -Faltblättern aufgebauten N-terminalen Lappen und einen größeren, C-terminalen Lappen, der überwiegend α -helikal aufgebaut ist. Im Spalt zwischen den zwei Bereichen der Kinase befinden sich sowohl die Substrat- als auch die ATP-Bindestelle. Untersuchungen zur Regulation dieser Kinase erbrachten Beweise dafür, dass die Phosphorylierung des Threonins¹⁹⁷ für die Aktivierung der Kinase verantwortlich ist, und des Weiteren die Erkennung der regulatorischen Untereinheit ermöglicht.

Die Src-Kinase stellt den ersten Vertreter einer Tyrosinkinase dar, welche charakterisiert wurde. Kinasen aus der Src-Familie sind unter anderem in die Signalkaskade von T-Zellen involviert. Entdeckt wurde die Src-Kinase beim *Rous Sarcoma Virus*. Kinasen dieser Klasse bestehen aus fünf Untereinheiten, wobei die Kinase-Domäne als SH-1 bezeichnet wird. N-terminal davon befindet sich eine SH2-Domäne (*Src-homology*), die Phosphotyrosine erkennen und binden kann, gefolgt von einer SH3-Domäne, die prolinreiche Sequenzen erkennt. Der N-terminale Bereich, der für die Membranverankerung verantwortlich ist, ist selbst innerhalb der Src-Kinasefamilie sehr divergent. C-terminal von SH1 befindet sich das regulatorische Tyrosin⁵²⁷. Nach Phosphorylierung durch die Csk (Src am C-Terminus phosphorylierende Kinase) führt dies zur Abschaltung der Kinasefunktion der Src, da es mit der Protein eigenen SH2-Domäne interagiert. Dabei ist zu beachten, dass die sequenzielle Umgebung des Tyrosin⁵²⁷ nicht optimal für die Erkennung durch SH2 ist und es sich bei dieser Bindung, um schwache Wechselwirkungen handelt.

Ein klassisches Beispiel für eine Kinase mit dualer Spezifität ist die MEK-Kinase. Die MEK stellt eines der wichtigsten Komponenten innerhalb des evolutionär hoch konservierten MAP-Kinaseweg dar. Sie wird selbst durch eine Serinkinase phosphoryliert und damit aktiviert. Die MEK phosphoryliert und aktiviert nun ihrerseits die MAPK-Kinase sowohl an Tyrosin¹⁸⁵ als auch an Threonin¹⁸³ in der Aktivierungsschleife^[9]. Die Struktur der MEK1 und MEK2 wurden 2004 aufgeklärt und ähnelt in ihrem Aufbau der Faltung der PKA^[10].

3.2.1 Topologie der Rezeptortyrosinkinasen

Rezeptortyrosinkinasen (im Folgenden als RTK bezeichnet) stellen neben den PTKs die größte Enzymfamilie dar. Es handelt sich dabei um transmembrane Glykoproteine, welche

zur Überfamilie der Wachstumsfaktorrezeptoren gehören. Ihre Aufgabe besteht darin, extrazelluläre Signale durch die Membran in das Zytoplasma zu leiten. Prominente Mitglieder der Familie der RTKs sind der *insulin receptor* (IR), der *insulin-like growth factor-1 receptor* (IGF-1R), der *epidermal growth factor receptor* (EGFR), der *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) und der *nerve growth factor receptor* (NGFR/Trk)^[9,11]. Die Struktur all dieser Rezeptoren ist sehr ähnlich^[4]. Der Wachstumsfaktor bindet an die Hormonbindedomäne im extrazellulären Bereich. Die Unterschiede im Aufbau dieser Domäne bestimmen die Spezifität gegenüber dem Liganden. Der hormonbindende, extrazelluläre Teil des Rezeptors wird über einen α -helicalen, transmembranen Bereich mit dem intrazellulären Teil des Rezeptors verbunden. Der zytoplasmatische Bereich, welcher die Phosphoryltransferaseaktivität trägt, wird in eine Juxtamembran-, eine C-terminale und eine hoch konservierte Kinasedomäne unterteilt. Die Spezifität für signalweiterleitende Adapterproteine wird durch Unterschiede im Juxtamembranbereich und in der C-terminalen Domäne garantiert. Die meisten RTKs bestehen aus einer einzelnen Polypeptidkette und liegen ohne Ligand in monomerer Form in der Zellmembran vor (z.B. EGFR). Nur die Mitglieder der IR-Familie (IR und IGF-1R) existieren dagegen bereits als kovalente Dimere. Um die Signaltransduktionswege von Rezeptorkinasen zu untersuchen, ist deren lösliche Intrazellulärdomänen ein geeignetes Modell^[12], da Holorezeptoren, im Gegensatz zu Intrazellulärdomänen, gentechnisch schwer zu generieren und zu reinigen sind.

Mit der Auflösung der PKA wurde die erste dreidimensionale Struktur einer Proteinkinase gezeigt^[13-15]. Hubbard *et al.* stellte mit der Auflösung der Kristallstruktur der löslichen Insulinrezeptorkinasedomäne (IRKD) erstmalig die Struktur einer Rezeptortyrosinkinase vor. Durch diese und weitere Kristallstrukturen von Proteinkinasen konnte gezeigt werden, dass die katalytischen Domänen eine große Homologie aufweisen, unabhängig davon, ob es sich um Tyrosin- oder Serin/ Threoninkinasen handelt.

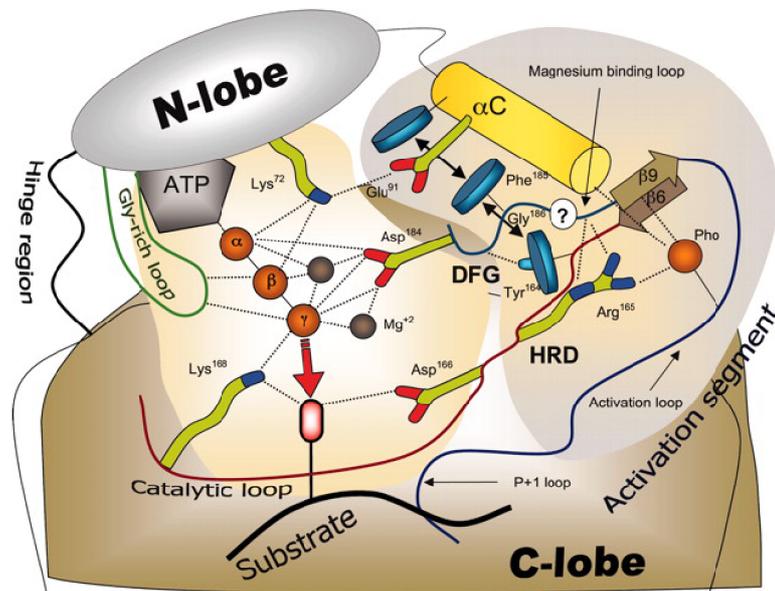


Abbildung 3.1.: Schematischer Aufbau der Kinasedomäne einer Proteinkinase in aktiver Form mit gebundenem Substrat.

Der katalytische Transfer des γ -Phosphats des ATP auf ein Proteinsubstrat wird durch den roten Pfeil angedeutet. Alle wichtigen, bei der Katalyse beteiligten Reste, die entweder mit dem ATP oder dem Substrat interagieren, sind in gelber Farbe hinterlegt. Sekundärstrukturen, die an der Regulation der katalytischen Aktivität der Kinase beteiligt sind, sind in grauer Farbe gehalten. Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen HRD-Motiv, DFG-Motiv und der α -C-Helix sind als schwarze Pfeile dargestellt. Gestrichelte Linien zeigen die wichtigen polaren Kontakte. Die Annotation erfolgte anhand der Aminosäuren der PKA (Abbildung modifiziert nach Kornev et al., 2006)^[16]

In Abbildung 3.1 (Ref.^[16]) ist stellvertretend die Topologie der Kinasedomäne der PKA dargestellt. Die Kinasedomäne weist einen zweilappigen Aufbau auf. Der N-terminale Bereich (*N-lobe*) ist neben der charakteristischen α -C-Helix (α C, gelb) aus β -Faltblättern aufgebaut und über eine Scharnierregion (*hinge region*) mit dem größeren, α -helicalen C-terminalen Bereich verbunden (*C-lobe*). In der katalytischen Spalte (*catalytic cleft*), zwischen dem N-terminalen und C-terminalen Bereich gelegen, ist das aktive Zentrum der Kinase lokalisiert.

Der N-terminale Bereich bildet dort eine hydrophobe Tasche, die den Adeninring des ATP während der Nukleotidbindung aufnimmt und stabilisiert. Die Glycin-reiche Schleife (*glycin-rich loop*, grün) des N-terminalen Bereiches ragt in die katalytische Spalte hinein und positioniert das γ -Phosphat des ATP für den Phosphoryltransfer. Ein invariantes Lysin (VAIK-Motiv) koordiniert dabei die α - und β -Phosphorylgruppe des ATP und geht gleichzeitig eine Salzbrücke mit dem hoch konservierten Glutamat (Glu⁹¹) der α -C-Helix

(α C, gelb) ein. Dies gewährleistet die optimale Ausrichtung des γ -Phosphats^[17]. Der *C-lobe* der Kinase beinhaltet die katalytische Schleife (*catalytic loop*, rot) mit der katalytischen Base Aspartat (Asp¹⁶⁶) innerhalb des HRD-Motivs. Diese Base ist essenziell, da sie den Cofaktor Mg^{2+} koordiniert und außerdem für die Orientierung der Hydroxylgruppe des Substrats beim Phosphat Transfer verantwortlich ist. Darauf folgt das Motiv der Substraterkennungssequenz ((L)AARN). Das hoch konservierte DFG-Motiv kennzeichnet den Beginn der Aktivierungsschleife (*activation loop*, blau). Dieses Motiv fungiert als Metallchelator, da das Aspartat (Asp¹⁸⁴) direkte Wechselwirkungen zu allen drei Phosphaten des ATP, bzw. indirekt über den Cofaktor Mg^{2+} , eingeht. Das Phenylalanin (Phe¹⁸⁵) bildet eine Interaktion mit der α -C-Helix (α C, gelb) aus und trägt somit zur Stabilisierung der Salzbrücke bei. Außerdem interagiert es mit dem Histidin (His¹⁶⁴) des benachbarten HRD-Motivs der katalytischen Schleife. Mutationen in den hoch konservierten Aminosäuren können zur Verminderung der katalytischen Aktivität führen. Dies kann bis hin zur vollständigen katalytischen Inaktivität reichen. So ist für die Substitution des Lysins eine starke Abnahme der Kinaseaktivität, die durch Veränderungen der Struktur im aktiven Zentrum hervorgerufen wird, bekannt^[18]. Ein Austausch der katalytischen Base Aspartat führt dazu, dass zwar ATP gebunden wird, aufgrund der Disorientierung des Cofaktors Mg^{2+} aber nicht umgesetzt werden kann^[19]. In der Aktivierungsschleife befinden sich außerdem phosphorylierbare Tyrosinreste, die bei vielen RTKs eine wichtige Rolle spielen und zur vollen Aktivität der Kinase beitragen. Der IR und IGF-1R besitzen beispielsweise drei potentiell phosphorylierbare Tyrosinreste, deren Phosphorylierung essenziell ist, um volle Kinaseaktivität zu erhalten.

3.2.2 Unterschiede zwischen Ser/Thr-Kinasen und Tyrosinkinassen

Alle bisher strukturell aufgelösten Kinasen folgen dem *PKA-Superfold*. Allein anhand der äußeren Struktur lassen sich Ser/Thr-Kinasen nicht von Tyrosinkinassen und dualen Kinasen unterscheiden. Jedoch gibt es im Bereich des katalytischen Zentrums signifikante Unterschiede in der Aminosäuresequenz zwischen diesen Kinaseklassen.

Die primäre Aminosäuresequenz des Aktivierungszentrums einer Kinase wird definiert als Bestandteil des *C-Lobes* zwischen zwei konservierten Tripeptid-Motiven (DFG....APE) und ist zwischen 20 und 35 Aminosäuren lang ist. Eine Aufzählung der sekundären

Strukturelemente vom N-Terminus zum C-Terminus, sind die Magnesium Bindungsschleife, β_9 , die Aktivierungsschleife, und die P+1 Schleife (siehe Abbildung 3.2A)^[20].

Die P+1-Schleife wurde ursprünglich anhand der Struktur der PKA benannt. In der PKA interagiert der P+1 Rest mit dem gebundenen Peptidinhibitor PKI und ist ein kritischer Interaktionspartner zwischen Substrat und Kinase. Zudem wurden bis heute mehr Reste als der P+1 Rest als Substratinteraktionskontakte bei verschiedenen Kinasen strukturell aufgelöst^[21-24].

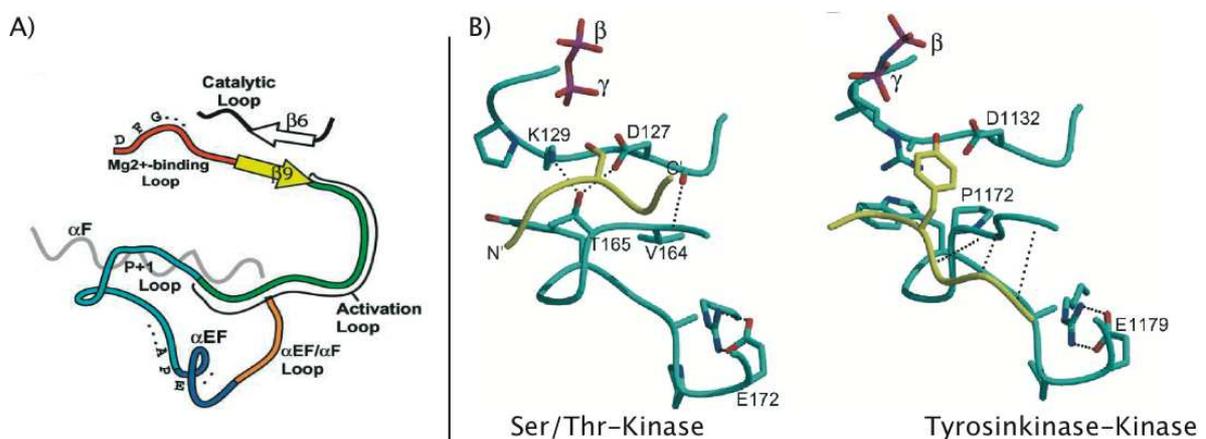


Abbildung 3.2.: Schematische Darstellung der katalytischen Region von Kinasen.

A) Das Aktivierungssegment reicht vom konservierten DFG-Motiv in der Magnesiumbindungsschleife bis zum konservierten APE-Motiv in der P+1-Schleife. Es beinhaltet β_9 und die Aktivierungsschleife.

B) Übersicht über die C-terminale Ankerregion von Ser/Thr-Kinasen und Tyrosinkinasen. Die Annotation für die Ser/Thr-Kinase erfolgte nach CDK2. Für die Tyrosinkinase diente die IRK als Modell. Erläuterungen im Text (Abbildungen nach Nolen, 2004)^[20].

Innerhalb dieser Region lassen sich für die verschiedenen Kinaseklassen signifikante Unterschiede feststellen. Diese betreffen sowohl den „N-terminalen Anker“ als auch den „C-terminalen Anker“ der Aktivierungsschleife. Der N-terminale Anker wird durch die Magnesiumbindungstasche und den β_9 -Strang gebildet. Dispositionierung des Aspartats im DFG-Motiv verhindert eine korrekte Ausrichtung des γ -Phosphats vom ATP. Diese falsche Positionierung macht es der Phosphorylase-Kinase (PHK), einem Vertreter der Ser/Thr-Kinasen, möglich, sich an Tyrosin zu phosphorylieren. Diese duale Spezifität ist jedoch nur dann möglich, wenn das größere Mn^{2+} anstelle des Mg^{2+} verwendet wird^[25].

Der C-terminale Anker beginnt in der Mitte der P+1-Schleife, reicht bis zur αEF -Helix und bildet eine kleine Helix aus. Diese Helix ist zwar in allen Kinasen vorhanden, wird aber

Einleitung

nur bei wenigen Kinasen als eigene Schleife in der Literatur annotiert. Der C-terminale Anker ist in S/T-Kinasen identisch positioniert wie in Tyrosinkinase, wobei aber alle Kinasen in diesem Bereich starke Sequenzunterschiede aufweisen. Diese Unterschiede sind entscheidend für die unterschiedliche Substratspezifität an der P₀-Stelle der Kinasen^[26].

<i>Mg-Bindung</i>	<i>Aktivierungsschleife</i>	<i>P+1-Schleife</i>	<i>Name</i>	<i>Organismus</i>
DFGVSGQ	LIDSMANSF	VG	TRSYMSPE	MEK1 (human)
DFGVSGQ	LIDSMANSF	VG	TRSYMAPE	MEK2 (human)
DFGISGY	LVDSVAKTMD	AG	CKPYMAPE	MEK3 (human)
DFGISGQ	LVDSIAKTRD	AG	CRPYMAPE	MEK4 (human)
DFGSSCY	EHQRVYTYIQ		SRFYRAPE	DYRK (human)
DFGVAGI	EVQTEGMTPE	TG	TYRWMAPE	STY (Peanut)
DFGLARL	YNECEASEDEHL	IR	TSRYLAPE	NtDSK1 (Tabacco)
DFGMTRD	IYETDYRKGKGLL	PVRWMAPE		IRKD (human)
DFGMTRD	IYETDYRKGKGLL	PVRWMAPE		IGFI (human)
DFGLAKL	LGAEKEYHAEGGKV	PIKWMAL		EGF (human)
DFGLCKE	GISDGATMKTF	CG	TPEYLAPE	PKB (human)
DFGFSCQ	LDPGEKLREV	CG	TPSYLAPE	PHK (human)

Abbildung 3.3.: Sequenzvergleich des Aktivierungssegments von dualen Kinasen mit Tyrosinkinase und Ser/Thr-Kinasen

In jeder Kinaseklasse formt der C-terminale Anker das Substratbindungsinterface. In Ser/Thr-Kinasen beginnt es am konservierten Serin oder Threoninrest, welches die P+1-Schleife mit der Aktivierungsschleife verbindet. In Tyrosinkinase ist der äquivalente Rest ein konserviertes Prolin, welches mit der Phenolgruppe des zu phosphorylierenden Tyrosins interagiert (Abbildung 3.3). In den meisten dualen Kinasen, wie zum Beispiel den humanen MEK1 und MEK2, befindet sich dort ein Threonin. Damit würden duale Kinasen zur Klasse der Ser/Thr-Kinasen zählen. Jedoch gibt es auch hier Unterschiede. Die humane MEK3 und MEK4 haben an dieser Position ein Cystein. Cystein ist zwar einem Serin strukturell ähnlich, jedoch lassen sich diese Kinasen anhand der Literatur weder in die Klasse der Tyrosinkinase noch der Ser/Thr-Kinasen einteilen.

In der PKA bildet das Phosphothreonin in der Aktivierungsschleife zum Arginin in der katalytischen Schleife eine stabilisierende Wasserstoffbrücke aus. Wohingegen das Phosphotyrosin in der Aktivierungsschleife der IRKD parallel zum entsprechenden Arginin liegt und keine Wasserstoffbrücken ausbildet^[22,13]. Weitere Unterschiede zwischen Ser/Thr-Kinasen und Tyrosinkinase liegen in der Konformation des Arginins im

RD-Motiv in der katalytischen Schleife. In beiden Kinaseklassen wird der aktive Zustand dadurch charakterisiert, dass das Arginin mit dem Sauerstoffatom der Carboxylgruppe eines Aminosäurerestes in der Magnesiumbindungstasche eine Wasserstoffbrücke eingeht (Abbildung 3.2B). In Ser/Thr-Kinasen ist das δ -Stickstoffatom der Guanidiniumgruppe der Protonendonator, wohingegen es in Tyrosinkinase das ω -Stickstoffatom ist. Das katalytische Aspartat stellt ein weiteres charakteristische Merkmal der beiden Kinase-Klassen dar. Dieser Rest bildet in beiden Kinaseklassen Kontakte zur Phosphatgruppe aus. Jedoch hat die Seitengruppe eine unterschiedliche Drehung, so dass die Wasserstoffbrücken in beiden Klassen auf zwei unterschiedlichen Seiten stehen.

Über duale Kinasen ist bisher wenig bekannt. Sie fallen anhand eines Sequenzvergleiches in die Klasse der Ser/Thr-Kinasen. Die Auflösung der dreidimensionalen Struktur der humanen MEK-Kinase mit einem Inhibitor erbringt ebenfalls keine Aufschlüsse auf die spezielle Funktionsweise dieser Kinasen^[10].

3.3 Die Familie der Insulinrezeptorkinasen

Die Familie der Insulinrezeptorkinasen zeichnet sich dadurch aus, dass diese, anders als andere RTKs, auch ohne Hormonbindung an die extrazelluläre Domäne als Dimer in der Membran vorliegen. Dieses Dimer allein führt aber nicht zur katalytischen Aktivität der intrazellulären Kinasedomänen und ist als *prä-dimerisierter* Zustand zu verstehen. Der IGF-1-Rezeptor ist dem Insulinrezeptor sowohl strukturell als auch sequenziell nahe verwandt. Die Homologie zwischen IR und IGF-1R liegt zwischen 45-65 % in der Ligandenbindungsdomäne, bzw. 60-85 % in den intrazellulären Domänen^[27-30].

Sowohl der Insulinrezeptor als auch der nah verwandte IGF-1-Rezeptor werden als einzelsträngige Pre-Propeptide mit einem 30 Aminosäuren großem Signalpeptid synthetisiert. Dieses wird nach der Translation abgespalten. Das jeweilige Propeptid wird anschließend glykosiliert, dimerisiert und zum Golgi transportiert. Dort wird es in die α - und β - Untereinheit gespalten^[27]. Diese Untereinheiten, verlinkt über Disulfidbrücken, bilden in beiden Rezeptoren ein Heterotetramer (α - β - β - α), das dann zur Plasmamembran transportiert wird^[31]. Es konnte gezeigt werden, dass die N-Glycosylierung notwendig für die Translokation zur Zelloberfläche ist^[32,33]. Der ausgereifte und an die Zellmembran gebundene Holorezeptor besteht aus zwei 130-135 kDa großen α -Ketten und zwei

90-95 kDa großen β -Ketten, die über α - α und α - β Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Die α -Untereinheiten liegen gänzlich extrazellulär vor und bilden die Ligandenbindungsdomäne; pro Rezeptor wird ein Ligand gebunden.

Die Gesamtstruktur der Kinasedomäne ist der von Ser/Thr-Kinasen sehr ähnlich^[34] (siehe Kapitel 3.2.1). Sie folgen beide dem *PKA-Superfold* mit kleiner N-terminaler Domäne, großer C-terminaler Domäne und dem aktiven Zentrum zwischen diesen beiden Domänen. Die Aktivierungsschleife sowohl der Kinase des IGF-1R als auch des IR beinhaltet drei Tyrosinphosphorylierungsstellen (Tyrosine Y¹¹³¹, Y¹¹³⁵ und Y¹¹³⁶ im IGF-1R, bzw. Tyrosine Y¹¹⁴⁶, Y¹¹⁵⁰ und Y¹¹⁵¹ im IR). In der unphosphorylierten Kinase blockiert die Aktivierungsschleife sowohl die ATP-Bindungstasche der N-terminalen Domäne als auch die katalytische Schleife der C-terminalen Domäne.

Das Modell, das sich für die Rezeptoraktivierung etabliert hat, basiert auf der Dimerisierung der Kinase mit anschließender *Transphosphorylierung* der Aktivierungsschleife. Dieser Prozess wird als Autophosphorylierung bezeichnet und überführt die Rezeptorkinase von einer Kinase mit basaler Aktivität in eine Kinase mit hoher Aktivität^[35]. Insgesamt werden außer den drei Tyrosinen in der Aktivierungsschleife noch weitere Tyrosine im C-Terminus phosphoryliert^[36-39]. Des Weiteren werden Tyrosinreste im Juxtamembranbereich phosphoryliert. Dies schließt die Phosphorylierung des Tyrosin Y⁹⁵⁰ beim IGF-1R, bzw. Y⁹⁶⁰ im IR, mit ein, welches für die Ausbildung von Signalkomplexen für die weitere Signaltransduktion eine entscheidende Rolle spielt.

Aus der Röntgenstruktur erklärt sich die Funktion beider RTKs als eine für Tyrosin spezifische Kinase^[40]. Dennoch wurde in unserer Arbeitsgruppe nicht nur für den Insulinrezeptor eine duale Kinase-Aktivität nachgewiesen, sondern auch für die lösliche Insulin Rezeptor Kinase Domäne (=LIRK) und für die Kinase des IGF-1-Rezeptors. Unter bestimmten experimentellen Bedingungen, wie der Zugabe von Poly-Lysin, autophosphoryliert sich die Kinase des IR an den Serinresten S¹²⁷⁵ und S¹³⁰⁹, welche durch Sequenzierung identifiziert wurden^[41]. Die Bedingungen, unter denen auch in Substraten duale Phosphorylierung beobachtet wurden, wurden in der Folgezeit in unserer Arbeitsgruppe weiter untersucht^[42-44]. Eine Verunreinigung durch assoziierte Serinkinasen konnte bei diesen Experimenten nahezu ausgeschlossen werden. Nachfolgend konnte durch die Klonierung und Expression von GST-Kinasen unterstrichen werden, dass durch

die künstliche Dimerisierung Kinasen aktiviert werden und duale Aktivität in der Autophosphorylierung erlangen^[45]. Weder die verfügbaren Röntgenstrukturdaten des Insulinrezeptors^[22,12] noch die des verwandten IGF-Rezeptors, der als Fusionsprotein ebenfalls duale Aktivität aufweist^[45,40], geben Hinweise darauf, wie der Mechanismus dualer Kinasen zu verstehen ist.

Trotz einem unterschiedlichen Aufbau der Rezeptorkinasen unterliegen alle einem vergleichbaren Aktivierungsmechanismus, der generell eine Dimerisierung des Rezeptors erfordert. Die Rezeptoren der Insulinrezeptorfamilie unterscheiden sich jedoch von anderen Wachstumsrezeptoren wie EGF und PDGF^[11]. Als Kinase der Insulinrezeptorklasse rekrutiert der Insulinrezeptor seine Effektorproteine über neun potentielle Substrate, die als *docking*-Proteine von ihm an multiplen Tyrosinresten phosphoryliert werden. Im Gegensatz dazu rekrutieren als weitere Rezeptorklasse der EGF- und PDGF-Rezeptor Signalproteine über Autophosphorylierungsstellen in den zytoplasmatischen Kinasedomänen.

3.4 Unterschiede zwischen IR und IGF-1R

Zwischen den Rezeptoren IR und IGF-1R besteht sowohl strukturell als auch sequenziell starke Homologie. Dennoch üben die beiden Rezeptoren in Säugetieren unterschiedliche biologische Funktionen aus^[46]. Der IR spielt eine zentrale Rolle im Glukose Metabolismus, der IGF-IR hingegen übt seine Funktion in der Wachstumsregulation aus. Eine wichtige Grundlage dieser unterschiedlichen Funktion ist die unterschiedliche zelluläre Verteilung der Rezeptoren. Der IR wird nur im Leber-, Muskel- und Fettgewebe in großer Menge exprimiert, der IGF-1R hingegen in fast allen Geweben^[47,48]. Des Weiteren haben beide Rezeptoren unterschiedliche Affinitäten zu den Liganden, bzw. zu den Signal weiterleitenden Substraten. In Zellen, die beide Rezeptoren exprimieren, gibt es einen Anteil an Hybridrezeptoren, die ein Dimer aus einem IGF-R Monomer und einem IR Monomer bilden^[48,49]. Die Möglichkeit zur Heterodimerisierung beruht auf der hohen Homologie zwischen den Rezeptoren. Die Hybridrezeptoren binden hauptsächlich den Liganden IGF-I; die Affinität zu Insulin ist gering^[50,51].

3.5 Substrate und Signalwege des IGF-1R

Die Hormonbindung an den Rezeptor führt zu einer Aktivierung verschiedenster

Signalwege. Durch die Autophosphorylierung des IR, bzw. IGF-1R, an Tyrosin- und Serinresten werden verschiedene Bindungsstellen für Adapterproteine geschaffen. So können Proteine, welche eine Phosphotyrosin-bindende Domäne (PTB Domäne) enthalten, über das Erkennungsmotiv (NPxpY) an den Rezeptor binden^[52]. Die bevorzugten Substrate dieser Rezeptoren werden historisch nach ihrer Fähigkeit, an den IR zu binden, als Insulinrezeptorsubstrate (IRS) bezeichnet. Sie verfügen alle über eine den IR bindende PTB-Domäne und eine N-terminal gelegene *Pleckstrin-homology* (PH)-Domäne. Die PH-Domäne ermöglicht die zelluläre Lokalisation von IRS-Proteinen an der Zellmembran, da sie mit verschiedenen Inositoltriphosphaten von Zellmembranbestandteilen interagieren kann^[53,54]. Die IRS werden anschließend mehrfach an Tyrosinresten phosphoryliert. Den an Tyrosin phosphorylierten IRS kommt eine Schlüsselrolle in den Signalwegen des IR und des IGF-1R zu. Sie stellen das zentrale Bindeglied zwischen Rezeptor und der Zellantwort dar. Da die IRS nach Phosphorylierung durch den Rezeptor Bindungsstellen für andere Proteine bereitstellen, und so das Signal vom Rezeptor weiterleiten, werden sie oft als Gerüst- oder Adapterproteine bezeichnet (*engl.: scaffolding/adaptor proteins*; siehe Kapitel 3.6.1).

Weitere Bindungspartner für den aktivierten Rezeptor sind die Tyrosin-spezifische Phosphatase SHP2 (*Src homology 2 domain containing phosphatase*). SHP2 kann über ihre SH2-Domäne an die Rezeptoren binden und damit die Aktivität von SHP2 regulieren. Weitere Interaktionspartner sind *Src homology domain containing protein* (Shc), GAP 1 und die Mitglieder der SIRP-Familie („*signal related proteins*“)^[55-57]. Im folgenden werden die weiteren Signalwege, welche über IRS-1 gesteuert werden, im Detail betrachtet.

3.5.1 Signalwege die durch IRS-1 gesteuert werden

IRS-1 bindet über seine PTB-Domäne an das phosphorylierte Tyrosin im NPEpY-Motiv innerhalb der Juxtamembrandomäne des Rezeptors (Y⁹⁵⁰ im IGF-1R; Y⁹⁶⁰ im IR) und wird vom Rezeptor vielfach an Tyrosinresten phosphoryliert. Die phosphorylierten Tyrosinreste dienen ihrerseits als „Andockstellen“ für weitere Effektoren (Abbildung 3.4). Ein Effektor ist zum Beispiel die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K). Die Klasse I PI3K ist ein Heterodimer, bestehend aus einer regulatorischen (p85) und einer katalytischen (p110) Untereinheit. Die p85-Untereinheit bindet über eine SH2 an phosphorylierte Tyrosinreste des IRS-1. Diese Bindung dissoziiert und aktiviert die katalytische Untereinheit der PI3K.

Die PI3K phosphoryliert die 3'-Hydroxylgruppe von Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) und generiert Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-Triphosphat (PIP₃). Die Bildung von PIP₃ führt zur Lokalisation der Proteinkinase B (PKB/Akt) und der *Phosphatidylinositol-dependent kinase-1* (PDK1) über deren PH-Domänen an die Membran^[58,59]. Die Assoziation der Akt mit der Membran führt zu deren Aktivierung. Zusätzlich wird sie durch die PDK1 an einem Threoninrest phosphoryliert und so in der aktivierten Form gehalten. Die Akt Kinase ist ein Knotenpunkt verschiedener Signalwege, die durch Wachstumsfaktoren, Cytokinen oder anderen Zellstimuli ausgelöst werden. Durch den IGF-1R und IR aktiviert, vermittelt die Akt zumindest zwei Signalwege. Zum einen phosphoryliert die aktivierte Akt den *Tuberous Sclerosis Complex* (TSC) und hebt dessen hemmenden Einfluss auf die Ser/Thr-Kinase mTOR auf^[60-62]. Die *protein S6 kinase 1* (S6K1) wird durch die Phosphorylierung von mTOR aktiviert und initiiert die Proteinbiosynthese^[63,64]. Der zweite Signalweg, der durch die Akt initiiert wird, läuft über die Phosphorylierung von Bad, einem Mitglied der Bcl2 Familie. Im unphosphorylierten Zustand bindet Bad an Bcl-X oder Bcl2 und inhibiert deren antiapoptotische Wirkung. Die Phosphorylierung von Bad durch die Akt führt zur Assoziation von 14-3-3 an Bad, so dass eine Heterodimerisierung mit Bcl-X oder Bcl2 nicht mehr möglich ist. Bcl-X und Bcl2 können so ihre antiapoptotische Funktion ausüben^[65]. Über IRS-1 können noch weitere Signalwege initiiert werden. Auch das Adapterprotein Grb2 bindet an IRS-1 und aktiviert über SOS (*Son of Sevenless*) den *Ras/Mitogen activating protein kinase* (MAPK) Signalweg. Das Adapterprotein Grb2 bindet über seine SH2 Domäne an phosphorylierte Reste von IRS-1^[66,67]. Grb2 wiederum ist konstitutiv mit SOS verbunden, einem ubiquitär exprimierten Ras *guanine nucleotide exchange factor* (GEF)^[68,69]. Das Binden des Rezeptor-assoziierten Shc-Proteins an den Grb2-SOS-Komplex bewirkt die Translokation von SOS an die Zellmembran, wo es in die Nähe des dort verankerten Ras-Proteins kommt. Ras ist ein kleines G-Protein, das im inaktiven Zustand GDP und im aktiven Zustand GTP gebunden hat. SOS aktiviert nun Ras, in dem es die Freisetzung von GDP und den anschließenden Austausch mit GTP ermöglicht, welches im Zytosol in ca. zehnfach höherer Konzentration vorliegt^[70].

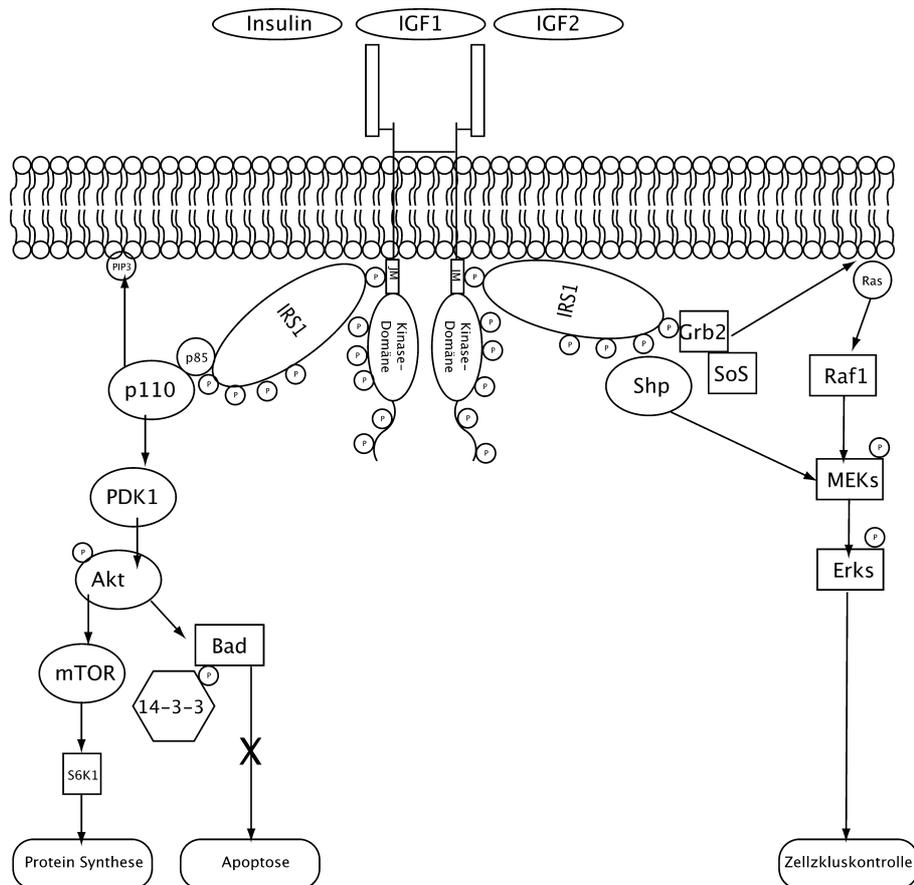


Abbildung 3.4.: Schematische Darstellung der verschiedenen Signalwege, welche über den IGF-1-Rezeptor gesteuert werden.

Dargestellt sind die Hauptwege über IRS-1 und SHP2. Erläuterungen siehe Text

Aktiviertes Ras-GTP kann nun das Effektorprotein, die Raf-Kinase, binden. Die Membranrekrutierung führt zur Aktivierung von Raf^[71]. Aktive Raf-Kinase kann im Gegenzug die Kinase MEK durch Phosphorylierung aktivieren^[72]. MEK, eine duale Kinase, aktiviert wiederum ERK. ERK ist ein Schlüsselenzym für den Eintritt und den Ablauf des Zellzyklus^[73]. Die Konsequenz der Aktivierung dieses Signalweges ist vielfältig: Zellwachstum, Zelltransformation, Proliferation aber auch Wachstumsinhibition^[74].

Ein weiterer Bindungspartner von IRS-1 ist die Phosphatase SHP2^[75]. SHP2 scheint in mehrere Signalwege involviert zu sein. Hierzu zählen der oben genannte MAPK Weg, der Jak-STAT-Weg und der Weg über PI3K^[76]. Eigentlich sollte man meinen, dass SHP2 als Phosphatase seine Bindungspartner dephosphoryliert und dadurch die Signalweiterleitung

abschaltet. Gleichwohl ist der beobachtete Effekt von SHP2, die Signalweiterleitung zu verstärken. In den meisten Fällen spielt SHP2 also eine stimulierende Rolle in der Signalweiterleitung von Protein-Tyrosinkinasen^[77-80]. Tyn und Csk, zwei Mitglieder der Src Kinase Familie, binden ebenfalls an IRS-1^[81]. Beide Proteine aktivieren Signalwege, die zur Reorganisation des Zytoskeletts führen^[82,83]. IRS-1 und Shc sind nicht die einzigen Substrate des Rezeptors. Die Bindung von einigen anderen Proteinen konnte ebenso nachgewiesen werden, jedoch sind die genauen Signalwege noch nicht aufgeklärt. Ein weiteres Protein, für das die Bindung an den IGF-1R nachgewiesen wurde, ist das Adapterprotein Grb10^[84]. Die Rolle von Grb-10 in der IGF-1R Signalweiterleitung ist kontrovers. Je nach Zelltyp führt die Überexpression des Adaptors zur Inhibition oder Verstärkung der mitogenen Effekte des IGF-1R^[85,86]. Dennoch zeigen neuere Daten, dass Grb-10 die Substratphosphorylierung des aktiven IGF-1R hemmt^[87]. CrkII, ein Mitglied der Adapterprotein Familie Crk, bindet ebenfalls an den Rezeptor und wird an Tyrosinresten phosphoryliert. Anschließend interagiert der Adapter mit SOS, was den MAPK Weg anschaltet^[88]. Auch im C-terminalen Bereich des Rezeptors gibt es Bindestellen für Substrate. Fehlt der C-Terminus des Rezeptors, so kann der Rezeptor nicht mehr sein volles Funktionsspektrum erfüllen. Der genaue Signalweg, der vom C-Terminus ausgeht, ist nicht bekannt. Es ist lediglich bekannt, dass 14-3-3 im C-terminalen Bereich des IR und IGF-1R bindet und eine Funktion in der antiapoptischen Signalweiterleitung hat. Auch die PI3K bindet an den C-Terminus. Hierfür ist die Erkennungssequenz pYXXM für die SH2 der p85 notwendig^[89]. p85 wird vom Rezeptor phosphoryliert und führt dadurch eine Konformationsänderung aus, die zur Aktivierung der p110 führt. Die aktivierte PI3K kann die oben beschriebenen Signalwege anschalten.

3.6 Spezifische Protein-Protein Interaktion

Wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, besteht die Möglichkeit, dass ein spezifisches Signal innerhalb der Zelle durch die Signaltransduktion in verschiedene Wege aufgespalten wird. Der Möglichkeit des Crosstalk zwischen dem Signal des IR und dem des IGF-1R, sowie die Möglichkeit der Hybridbildung zwischen IR und IGF-1R, wirft die Frage nach der Spezifität der Signalweiterleitung auf. Wie wird aus der Vielzahl der Signalwege der jeweils nun korrekte ausgewählt? Die Antwort darauf ist Ausbildung der richtigen Protein-Protein-Interaktionen zur richtigen Zeit im richtigen Zelltyp. Daraus lässt

sich allgemein ableiten, wie Substraterkennung bei einer Myriade von Kinasen und Substraten erreicht wird. Es wird deutlich, dass die Spezifität der Erkennung nicht nur in der nächsten Umgebung der Zielaminosäure für die Kinase liegen kann, sondern durch weiter reichende Bedingungen erzeugt werden muss. Protein-Protein-Interaktionen durch *Dockingsites* wurden für eine Reihe von Proteinkinase-Familien, wie die IR-Familie, JNKs, Cdk, und MAPK-Kinasen beschrieben^[90-99]. Für eine Unterfamilie der Proteinkinasen, den C-terminal Src Kinasen (Csk), wurden die Bedingungen der Substraterkennung weitgehend aufgeklärt^[100,101]. Innerhalb der Csk, einer Tyrosinkinase, wurde eine Sequenz von sechs Aminosäuren gefunden, die als Gegenstück zur Oberfläche des Substrats komplementär ist. Diese Docking-Interaktion erlaubt es der Csk, ihre Substrate auf spezifische Weise zu erkennen und zu phosphorylieren.

Die Ausweitung dieser auch als *remote-docking-interaction* genannten Methode^[102,103] der Substraterkennung auf andere Proteinkinasen war bisher nur schwierig zu zeigen. Für die Interleukin-2-Tyrosinkinase (Itk) ist beschrieben, wie die Kinase zwischen ihren beiden Substraten unterscheiden kann. Die Itk phosphoryliert ihr Substrat PLC γ 1 an einem spezifischen Tyrosinrest (Tyrosin⁷⁸³) (Ref.^[104-108]), sowie sich selbst an Tyrosin¹⁸⁰ (Ref.^[104,109]). Die beiden Phosphorylierungsstellen haben keinerlei Sequenzhomologie und sind auch im strukturellen Kontext verschieden. Während Tyrosin¹⁸⁰ der Itk innerhalb der Faltung einer SH3-Domäne liegt, ist Tyrosin⁷⁸³ der PLC γ 1 in einem Linker zwischen der SH2 und SH3 lokalisiert. Es stellt sich die Frage, welcher Mechanismus der Substraterkennung bei der Itk vorliegt. Joseph *et al.* 2007 konnten zeigen, dass die SH2-Domäne der Itk, welche entfernt von der Phosphorylierungsstelle liegt, das Substrat zur Kinase führt und so die Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes fördert. Zudem konnte gezeigt werden, dass dieser Mechanismus der SH2-Bindung Tyrosinphosphat unabhängig ist. Die SH2 der Itk beherbergt ein zusätzliches Erkennungsmotiv, das notwendig für die selektive Phosphorylierung der Zielyrosine (Tyrosin¹⁸⁰ in der Itk, bzw. Tyrosin⁷⁸³ in der PLC γ 1) ist. Diese zusätzliche Interaktion führt zur spezifischen Erkennung der Substrate und verhindert so den ungewollten „Crosstalk“. Die SH2-Domäne der Itk mit ihrer zusätzlichen Bindesequenz fungiert also hier als zentrales Motiv für die Substratspezifität dieser Kinase.

Eine weitere Möglichkeit, um die Spezifität eines Eingangssignals zu erhalten, liegt in der

Organisation von Proteinkomplexen begründet, wie im Fall der IRS-Proteine. Im Folgenden, sollen die Möglichkeiten und Konsequenzen, welche sich durch *scaffolding* ergeben, näher betrachtet werden.

3.6.1 Scaffolds und Ihre Bedeutung in Signalwegen

Komplexe molekulare Signalnetzwerke sind meist modular aufgebaut und erlauben so die unterschiedlichsten biologischen Signale zu verarbeiten. Die Signalweiterleitung in solchen Netzwerken ist oft über Gerüstproteine (eng. *scaffold proteins*) gewährleistet^[110]. *Scaffolds* wurden erstmals in der Hefe in einem MAPK-Signalweg nachgewiesen^[111-115]. Scaffoldproteine fungieren als Organisationszentren. Kinasen und Substrate, die in einer Signalkaskade sequenziell aktiviert werden, werden durch Scaffolds in räumliche Nähe arrangiert. So werden Signalkomplexe ausgebildet, die je nach ihrer Komplexität auch Signalosom genannt werden^[116-118]. Auch die Proteine der IRS-Familie wirken innerhalb der Signaltransduktion vom IR und IGF-1R als Scaffoldproteine.

Scaffold Proteine wurden in der Vergangenheit auch in anderen als den MAPK-Kaskaden nachgewiesen, was impliziert, dass ihre Funktionsweise genereller Natur ist^[119,120]. Diverse Untersuchungen an Scaffold-Proteinen zeigen, dass sie tiefgreifende Einflüsse auf die Art und weise der Signalweitergabe haben^[121-123]. Eine Funktion könnte die Vermeidung von ungewolltem *crossstalk* zwischen verschiedenen Signalwegen sein, welche dieselben molekularen Komponenten ansprechen^[124,116]. In der Literatur wird die Funktion der Proteinorganisation durch *Scaffolding* meist als Verstärkung des Eingangssignals beschrieben. Die Steigerung der Signalspezifität ist jedoch bis heute weitgehend experimentell unerforscht^[125]. Dabei gewährleisten Signalosome, dass unterschiedliche Signalkomplexe physikalisch getrennt sind^[126].

Einer der wichtigsten Parameter in Signalkomplexen ist die Konzentration der Scaffold Proteine. Locasale *et al.* konnten zeigen, dass die Konzentration an Scaffold Proteinen die Aktivierungszeit des Signalosoms stark beeinflusst^[127]. Zudem konnten Levchenko *et al.* zeigen, dass es einer optimalen Scaffold Konzentration bedarf, um einen gesteigerten Signaloutput zu bekommen^[126].

Scaffoldproteine der IRS und Dok-Familie binden über ihre jeweilige PTB-Domäne an Tyrosin phosphorylierte Rezeptoren. Sie werden im Anschluss selber an Tyrosin

phosphoryliert und rekrutieren ihrerseits Effektorproteine mit einer SH2 Bindungsdomäne^[128]. Es wurden gebundene IRS/Dok PTB Domänen an IR, IGF-1R, EGFR, Interleukin-4-Rezeptor (IL-4R), *insulin-related-receptor* (IRR), RET Rezeptor Tyrosinkinase und Tek Rezeptortyrosinkinase gefunden, sowie gebunden an eine Reihe von nicht Rezeptortyrosinkinasen, wie zum Beispiel Abl^[129].

Da die erste Stufe der Signalosom Bildung in der Bindung von IRS-Proteinen durch ihre PTB-Domänen an den Juxtamembranbereich des Rezeptors besteht, wird im folgenden die Phosphotyrosin bindende Domäne im Detail betrachtet.

3.7 Die Phosphotyrosin-bindende Domäne (PTB)

Nahezu 20 verschiedene PTB-Domänen wurden in einer Vielzahl eukaryotischer Organismen identifiziert. Darunter *Caenorhabditis elegans*, *Anopheles gambiae*, *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis* und alle Säugetiere. PTB Domänen wurden nicht in *Saccharomyces cerevisiae* oder *Arabidopsis thaliana* gefunden, jedoch existieren zwei Proteine mit PTB-Domäne in *Dictyostelium discoideum*. Derzeit wurden im menschlichen Genom etwa 60 Proteine mit einer PTB-Domäne identifiziert. Untersuchungen mit dem *Domain architecture resource tool* (DART) von allen identifizierten PTB enthaltenden Proteinen, lässt vermuten, dass keines dieser Proteine eine katalytische Aktivität besitzt. Etwa ein Drittel aller Proteine mit einer PTB-Domäne enthält kein weiteres strukturelles Motiv. Hieraus lässt sich schließen, dass PTB-Proteine universelle Adapter- und Scaffold-Proteine sind.

Proteine mit einer Phosphotyrosin-bindenden (PTB) Domäne wurden schnell als grundsätzliche Schlüsselregulatoren für die Organisation von Signalnetzwerken akzeptiert. Der Stellenwert, den die PTB Domänen im zellulären Kontext haben, wird dadurch unterstrichen, welches Ausmaß sie in physiologischen Prozesse haben. Hierunter befindet sich auch die Entwicklung des Nervensystems, die Immunantwort von Zellen, Zellhomeostase und Zellwachstum. Die Liste der PTB-Adapter/Scaffold Proteine, welche in menschlichen Krankheiten und pathologischen Bedingungen involviert sind, wächst stetig. Zur Zeit wurden fünf Mutationen in Proteinsequenzen, die eine PTB-Domäne kodieren, bestimmt. Diese Mutationen führen zu schweren menschlichen Krankheitsbildern wie Hypercholesteremia, Schlaganfall, Erkrankungen der Coronar

Arterien, Alzheimer und Diabetes^[130-135].

Seit 1994, als die erste Phosphotyrosin-bindende Domäne charakterisiert wurde, wächst die Datenmenge, die über PTBs zusammengeführt wird. PTB Domänen binden zudem eine große Gruppe von sauren Phospholipiden. Dies ist auch ein Grund für die überwiegende zelluläre Lokalisation dieser Proteine in der Nähe der Zellmembran. Einige PTBs benötigen einen phosphorylierten Tyrosinrest für eine hoch affine Bindung an den Liganden. Der überwiegende Anteil der PTBs binden ihre jeweiligen Liganden unabhängig davon, ob das Tyrosin phosphoryliert vorliegt oder nicht. Es besteht eine klare funktionelle Zweiteilung innerhalb der PTB-Familie, welche auf der Abhängigkeit von Phosphotyrosin in ihrem Liganden beruht. Diese Unterteilung bringt die Shc/IRS/Dok/SNT-PTBs in eine Gruppe (Phosphotyrosinabhängig) und alle anderen PTB-Domänen in eine zweite Gruppe. Historisch wurden die PTB Domänen auf Grund ihrer grundsätzlichen strukturellen Unterschiede in zwei Gruppen eingeteilt^[136]. Zum einen die kürzeren Insulinrezeptorsubstrat (IRS) ähnlichen und die längeren Shc-ähnlichen PTBs. Neuere Untersuchungen teilen die PTBs durch strukturelle, evolutionäre und analytische Untersuchungen in drei getrennte Familien ein. Diese sind die IRS-ähnlichen, die Shc-ähnlichen und Dab-ähnlichen PTBs.

Kurz nachdem das erste PTB-Protein identifiziert wurde, konnte auch die erste 3D Struktur gelöst werden^[137,138]. Die Shc PTB Domäne wurde auf Grund der strukturellen Übereinstimmungen mit der *Pleckstrin homology* (PH) Domäne gefunden. Das war etwas überraschend, da kaum Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz zwischen den beiden Domänen bestehen. Bisher folgen alle 10 Strukturen von PTB-Domänen dem so genannten *PH-Domänen-Superfold*^[138,55,139-149]. Der Kern dieses *Superfold* besteht aus sieben anti-parallelen β -Strängen, welche zwei orthogonale β -Faltblätter bilden. Dieses β -Sandwich wird durch eine C-terminale α -Helix abgeschlossen. In Abbildung 3.5 ist die Struktur der PTB-Domäne des IRS-1 dargestellt.

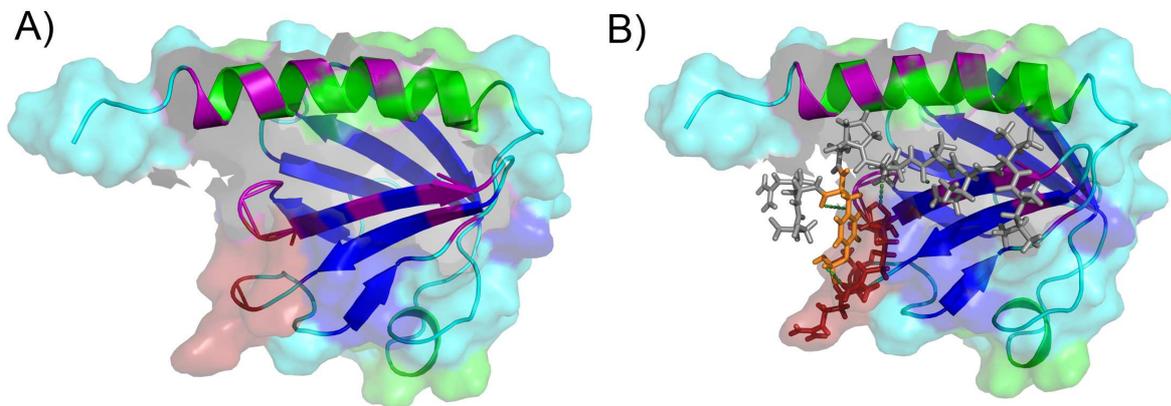


Abbildung 3.5.: Kristallstruktur der PTB-Domäne von IRS-1

A) Struktur der PTB ohne IR-Peptid; B) Struktur der PTB mit IR-Peptid (grau = IR-Peptid; orange = pY; rot = pY-Binder der PTB) (Abbildung modifiziert nach Eck, et al. 1997)

Weitere strukturelle Eigenschaften, die viele PTB-Domänen teilen, ist die Peptidbindetasche, welche das NPxY-Motiv bindet. Diese wird durch den β 6-Strang und der C-terminalen α -Helix gebildet. Des Weiteren verfügen viele PTB Domänen über eine basische Phospholipid Bindungsstelle. Diese wird weitgehend durch Aminosäurereste in den N-terminalen Schleifen gebildet. Neben diesen allgemeinen, strukturellen Übereinstimmungen zwischen verschiedenen PTB-Domänen existieren eine Reihe von signifikanten Unterschieden zwischen der Struktur der IRS-1-PTB und den Strukturen von Shc-PTB und Dab-PTB. Shc-PTB und Dab-PTB besitzen im Gegensatz zur IRS-1-PTB zwei zusätzliche α -Helices, welche im N-Terminus zwischen dem β 1-Strang und β 2-Strang liegen. Die PTB des IRS-1 hat eine extrem trunkierte α 2-Helix, und teilt sonst nur die generelle Faltung mit der Shc-PTB und der Dab-PTB. Daraus ergibt sich die historische Aufteilung der PTB-Domänen in die beiden Klassen der IRS-ähnlichen und Shc-ähnlichen PTBs.

3.7.1 Strukturelle Analyse der Peptidbindung der PTB

Die räumliche Lage und grundsätzliche Raumaufteilung der Peptidbindungstasche ist in allen PTB-Strukturen gleich. Zudem ist auch der generelle Mechanismus der Peptidbindung in dieser Spalte gleich. Peptidliganden werden als anti-paralleles Pseudo- β -Faltblatt gebunden, welches weit reichende Kontakte mit dem β 5-Strang der C-terminalen α -Helix der PTB ausbildet. Die Peptidliganden ihrerseits bilden eine β -Schleife vom Typ I

aus. Diese Struktur wird meist durch die Konsensussequenz NPxY ausgebildet, welche strukturell einer der häufigsten Sequenzmotive für die Ausbildung von β -Schleifen ist^[150]. Die Namenskonvention zeichnet das Tyrosin des NPxY-Motivs als Null-Stelle aus („0“), N-terminale Reste werden mit einem negativen Vorzeichen versehen („-“) und C-terminale Reste mit einem positiven Vorzeichen („+“). β -Schleifen sind für die Bindung durch PTB-Domänen privilegiert, da diese Peptidstruktur das Tyrosin des NPxY-Motivs perfekt in der Bindetasche der PTB-Domäne positioniert. So können vielfältige Wasserstoffbrücken zwischen der PTB und dem Substrat ausgebildet werden^[151]. Zusätzlich bestehen schwächere Kontakte zwischen dem Peptid und dem β 5-Strang und der C-terminalen α -Helix. Die Struktur der PTB-Domäne des IRS-1, welche zuerst zusammen mit einem Tyrosin phosphorylierten IL4-Rezeptorpeptid (*Interleukin4-Receptor*) aufgelöst wurde^[139] und später mit einem Tyrosin phosphorylierten Peptid des Insulinrezeptors^[55], koordiniert das Phosphotyrosin über die beiden Argininreste Arg²¹² und Arg²²⁷. Diese Reste sind über alle bisher strukturell bekannten PTB-Domänen der IRS-ähnlichen und Dok-ähnlichen Proteine konserviert. Sie bilden eine basische Tasche, welche das negativ geladene Phosphat aufnimmt und extensive Wasserstoffbrücken mit den Sauerstoffatomen des Phosphorylmoleküls ausbildet. Eine Mutation des Tyrosins zu Alanin führt zum kompletten Verlust der PTB-Bindung^[139]. Unphosphorylierte Peptide werden durch die IRS-1-PTB-Domäne nur noch schwach gebunden, was noch einmal die zentrale Bedeutung des Phosphotyrosins unterstreicht^[152].

Im Insulinsignalweg führt die Substitution des Tyrosins⁹⁶⁰ zu Phenylalanin im Juxtamembranbereich des Insulinrezeptor zu einer um 80% verringerten Zellantwort über das Scaffoldprotein IRS-1^[153]. Auch hier zeigt sich, die dominierende Relevanz der PTB-Domäne für die Interaktion von IRS-1 und Rezeptorkinase in den Signalwegen des IR und des nah verwandten IGF-1R.

3.8 Bedeutung der Serinphosphorylierung innerhalb des Insulinsignalwegs

In der Vergangenheit sind mehr und mehr Beweise dafür gefunden worden, dass die Serinphosphorylierung des Insulinrezeptors oder des IRS-1 die Signalkaskade inhibiert. Obwohl diesem regulatorischen Weg äußerste Wichtigkeit beigemessen wird, ist es schwer, den dahinter stehenden Mechanismus zu entschlüsseln. Allein die Substrate IRS-1 und

Einleitung

IRS-2 enthalten jeweils über 30 Serin-/Threonin-Phosphorylierungsstellen in Konsensussequenzen für verschiedene Ser/Thr-Kinasen^[154]. Ferner scheint die Phosphorylierung an Serin-/Threoninresten ein genereller Abschaltmechanismus der Insulinsignalkaskade zu sein, da Immunopräzipitate von durch Insulin stimulierten Zellen verstärkt Serin-/Threoninphosphorylierung zeigen^[155].

Starke Serin-/Threoninphosphorylierung kann einerseits leicht durch eine verminderte elektrophoretische Mobilität in reduzierenden SDS-PAGE analysiert werden, wichtiger ist jedoch die Tatsache, dass eine verstärkte Serin-/Threoninphosphorylierung mit einer verminderten Tyrosinphosphorylierung einhergeht. Als Beispiel sei hier der *tumor necrosis factor receptor* (TNFR) □ genannt, der durch seine Signalkaskade negativ auf den Insulinweg einwirkt, indem er die Phosphorylierung des IRS-1 an Tyrosinresten reduziert und die Serin-/Threoninphosphorylierung deutlich erhöht.

Die oben beschriebene starke Phosphorylierung des IRS-1 an Serin- und Threoninresten konnte sowohl in Zellkultur als auch *in vivo* nachgewiesen werden und zeigte, dass diese Art der Phosphorylierung mit einer verminderten Antwort auf das Insulinsignal einhergeht^[156]. Es wird angenommen, dass dieser Mechanismus sowohl zu akuter als auch zu chronischer Insulinresistenz beiträgt.

Tabelle 3.1.: Zusammenfassung von Serin-/Threoninkinasen die IRS-1 phosphorylieren können

(Tabelle modifiziert nach Johnston *et al.*, 2003)^[154]

Kinase	aktiviert durch	phosphorylierende Reste	Verweise
<u>Inhibitory S/T phosphorylation</u>			
PKC α	PMA, human glycated albumin	S612, Rn ^a	De Fea. <i>et al.</i> , 1997
MAPK	n.b. ^c	n.b.	De Fea. <i>et al.</i> , 1997
GSK-3	Insulin	n.b.	Eldar-Finkelman <i>et al.</i> , 1997
PKC ζ	Insulin	n.b.	Liu, <i>et al.</i> 2001
JNK	TNF α	S307, Mm	Aguirre, <i>et al.</i> , 2000
TOR	TNF α	S636, S639, Rn	Ozes <i>et al.</i> , 2001
PI3K	Insulin	n.b.	Lam <i>et al.</i> , 1994
Rho kinase α	Hypertension	n.b.	Begum <i>et al.</i> , 2002
IKK	TNF α	S312, Hs	Gao <i>et al.</i> , 2002
Casein kinase II	Insulin	S99, T502, mM	Tanasijevic <i>et al.</i> , 1993
<u>Activatory S/T phosphorylation</u>			
AMPK	AICAR	S789, Rn	Jakobsen <i>et al.</i> , 2001
PKB	Insulin	S265,302,325,358,Mm	Paz <i>et al.</i> , 1997

^aDie Nomenklatur geht aus der Sequenz von Ratte (Rn), Maus (Mm) oder Mensch (Hs) hervor.

^cnicht bekannt.

Wie Tabelle 3.1 verdeutlicht, kommt der Suche nach Kinasen, die IRS-1 an Serin-/Threoninresten phosphorylieren können, verstärkte Bedeutung zu^[154]. Die Anzahl der Kinasen für sich genommen, die IRS-1 phosphorylieren, macht es wahrscheinlich, dass jede Kinase einen Teil zum Gesamtphosphorylierungsstatus des IRS-1 beiträgt. Durch einen *Yeast-tri-hybrid*-Versuch konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des C-terminal zur PTB-Domäne liegenden Serins³¹² des humanen IRS-1 durch die stressinduzierte JNK1 (c-Jun N-terminal Protein Kinase) die Interaktion der PTB mit der katalytischen Untereinheit des Insulinrezeptors unterbricht. Ein möglicher Mechanismus für die beobachtete Unterbrechung der Interaktion der PTB mit dem phosphorylierten NPEpY⁹⁶⁰-Motiv des Insulinrezeptors wurde von Ogiwara *et al.* 1997 publiziert^[157]. Hierbei wird postuliert, dass eine Insertion hinter der PTB-Domäne, durch die Interaktion mit dem Protein 14-3-3 zur Unterbrechung der IRS-1-Rezeptor-Interaktion führt. Diese Insertion ist nur in den Proteinen IRS-1 und IRS2 konserviert.

4 Fragestellung

Für die Signaltransduktion durch den *insulin-like growth factor-1 receptor* (IGF-1R) ist, neben der Aktivierung der Kinase, die spezifische Bindung der Substrate entscheidend. Nach Autophosphorylierung der Rezeptorkinase bindet das Insulinrezeptorsubstrat-1 (IRS-1) an den N-Terminus der Kinase, welcher räumlich und strukturell entfernt vom aktiven Zentrum liegt. Die Ausbildung eines Signalkomplexes zwischen Rezeptorkinase und IRS-1 führt zur Tyrosin-, Threonin- und Serinphosphorylierung des Substrats, was Bindungsstellen für die nachgeschalteten Effektoren schafft. Unsere Arbeitsgruppe konnte für den nah verwandten Insulinrezeptor nach Insulin-Stimulierung in der Autophosphorylierung duale Spezifität nachweisen^[158]. Die Serinreste Serin¹²⁷⁵ und Serin¹³⁰⁹, die in dieser Phosphorylierungsreaktion modifiziert werden, befinden sich im C-Terminus der Kinase und besitzen keinerlei Identität in ihrer umgebenden Aminosäuresequenz^[44]. Für die lösliche, monomere Kinase des IR (LIRK) konnte durch unsere und andere Arbeitsgruppen intrinsische, duale Kinaseaktivität in der Autophosphorylierung gezeigt werden. Dies galt jedoch nur, wenn Poly-Lysin als „Vernetzer“ zugegen war. Da die natürliche duale Spezifität von Kinasen nicht nur die Auto- sondern auch die Substratphosphorylierung betrifft, war es ein wesentlicher Fortschritt, als in unserer Arbeitsgruppe die Bedingungen für die duale Spezifität in der Substratphosphorylierung gefunden wurden^[43]. Durch die Expression der löslichen Kinasedomäne als GST-getagtes Dimer (Gluthation-S-Transferase) konnte in der LIRK auch ohne Poly-Lysin die Autophosphorylierung der oben genannten Serinreste beobachtet werden. Allerdings verlangte die Substratphosphorylierung an Serinresten auch weiterhin die Anwesenheit von Poly-Lysin und das Vorliegen eines 1:1-Komplexes zwischen Kinase und Substrat.

IRS-1 bindet über seine Phosphotyrosin-bindende-Domäne (PTB) an den aktivierten und phosphorylierten Rezeptor und bildet ein natürliches Heterodimer aus Substrat und Kinase. Es ist deshalb von Interesse zu untersuchen, ob sich die Aktivität der Tyrosinkinase im Proteinkomplex von der Aktivität freier Kinasen und Substrate unterscheidet. Als Modell bietet sich hier die Verwendung der PTB-Domäne des IRS-1 an, um die Auswirkungen von Kinase-Substrat-Komplexen zu untersuchen. Die PTB-Domäne weist sowohl die Eigenschaften eines „Vernetzers“ auf, könnte jedoch gleichzeitig ein Substrat für die

Kinase sein. Neben einem Tyrosinrest, welcher aufgrund der Sekundärstruktur in das Innere des Proteins ragt, enthält die Struktur nach Eck *et al.* keine weiteren Phosphorylakzeptoren^[55]. C-terminal von der strukturell aufgeklärten Struktur befinden sich jedoch neben Serinresten, welche nach Phosphorylierung für die Abschaltung des Signals verantwortlich gemacht werden^[155], auch Threonin- und weitere Tyrosinreste. Durch Modulation der Expression über die von Eck *et al.* beschriebene Struktur hinaus ergeben sich so die Möglichkeit, neben der Tyrosinkinaseaktivität auch Serin- und Threoninreste als Substrate für die Kinase anzubieten. Durch die Ausbildung von stabilen Kinase-Substratkomplexen über die Bindung der PTB-Domäne an die Kinase entfällt zudem die Verwendung von Poly-Lysin und anderer molekularer Vernetzer wie z.B. Histon2B.

Über das Modell der PTB-Domäne sollten in dieser Arbeit Aussagen über die duale Kinaseaktivität der löslichen IGF-1-Kinase im speziellen und daraus ableitend für Kinasen im allgemeinen getroffen werden. Hierbei sollte insbesondere darauf eingegangen werden, worin duale Kinaseaktivität begründet ist. Insbesondere war die Frage von Interesse, ob sich die Kinasespezifität im Kinase-Substratkomplex ändert, und wie sich diese Änderung äußert. Des Weiteren sollte untersucht werden, welche Konsequenzen Signalkomplexe für nachgeschaltete Effektorinasen haben.

5 Ergebnisse

5.1 Serinphosphorylierung durch IRKD und IGF

Nachdem in früheren Arbeiten gezeigt wurde, dass die lösliche Insulinrezeptorkinase (IRKD) in der Autophosphorylierung die Serine Serin¹²⁷⁵ und Serin¹³⁰⁹ im C-Terminus phosphoryliert, sollte dieses Prinzip auch auf Substrate übertragen werden. Frühere Versuche verwendeten hierzu Komplexbildner wie Polykationen (Polylysin) oder Histon2B^[43].

In dieser Arbeit sollte das Prinzip der Serinphosphorylierung auch auf natürliche Substrate übertragen werden. Hierzu wurde das Substrat GST-Y-PTB₂₇₅ verwendet. Das Substrat stellt die Phosphotyrosin-bindende-Domäne (PTB) des Insulinrezeptorsubstrat-1 (IRS-1) von Aminosäure Prolin¹⁵⁸ bis Arginin²⁷⁵ dar. Durch Klonierung hinter einen N-terminalen GST-Tag mit anschließender Schnittstelle für die TEV-Protease, lag das Substrat als konstitutives Dimer vor. Zudem besteht mit dem Tyrosinrest in der TEV-Proteaseschnittstelle die Möglichkeit der Tyrosinphosphorylierung durch die IRKD. In einem ersten Versuch wurde das Substrat GST-Y-PTB₂₇₅, welches in unserer Arbeitsgruppe vorlag, durch die lösliche zytosolische Kinasedomäne des Insulinrezeptors (IRKD) zeitabhängig phosphoryliert. Im direkten Vergleich wurde das Substrat durch eine bindungsdefiziente Kinasemutante der IRKD (IRKD_{Phc}) phosphoryliert. In dieser Kinase wurde das nicht katalytische Tyrosin⁹⁶⁰ im NPEpY-Bindemotiv der PTB-Domäne im Juxtamembranbereich durch Phenylalanin substituiert.

Beide Kinasen sind in unserer Arbeitsgruppe kloniert, charakterisiert und von mir aus *Sf9*-Zelllysat (8.2.1.4) durch eine Kombination aus Anionenaustauscherchromatographie (8.2.3.4) und Gelchromatographie (8.2.3.6) gereinigt worden. Die Reinigungsdokumentation der IRKD ist im Anhang in Abbildung 10.7 gezeigt.

Die Phosphorylierung wurde unter Standardbedingungen (1 mM DTT, 30 μ M MgCl₂ in 50 mM Tris/HCl pH 7,5) mit 1 mM γ [³²P]-ATP und einer spezifischen Aktivität von 200 cpm/pmol ATP durchgeführt (8.2.10). Zu den jeweiligen Zeitwerten wurde die Reaktion mit SDS-Probenpuffer abgestoppt, über eine 12%ige SDS-PAGE (8.2.9.3) aufgetrennt und mit kolloidaler Färbelösung (8.2.9.7) angefärbt. Die einzelnen Banden wurden ausgeschnitten und ihre Radioaktivität mittels Cerenkov-Messung quantifiziert.

In diesem Versuch wurden 5 μM Substrat durch 1 μM Kinase umgesetzt. Zu den jeweiligen Zeitwerten wurden dem Ansatz 30 μl entnommen und terminiert.

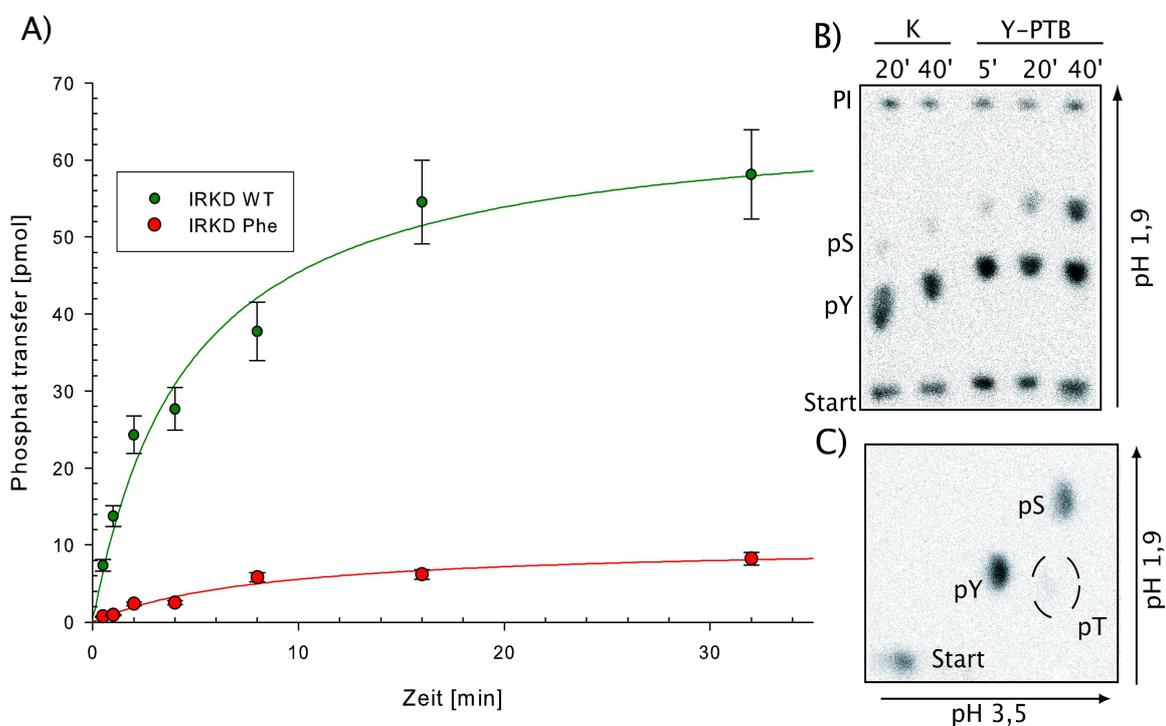


Abbildung 5.1.: Zeitabhängige Phosphorylierung von GST-Y-PTB₂₇₅ durch IRKD Wildtyp (grün) und Phe-Mutante (rot)

A) Kinetischer Verlauf der Phosphorylierung. Aufgetragen ist der Phosphat Transfer in [pmol] gegen die Zeit in [min] B) 1D-PASA der Kinase und des Substrats. C) 2D-PASA des Substrats. Das Substrat GST-Y-PTB₂₇₅ wird durch die WT-Kinase sehr gut, von der Phe-Kinase hingegen nur marginal phosphoryliert. Die Phosphoaminosäureanalyse zeigt, dass die Serinphosphorylierung zeitlich hinter der Tyrosinphosphorylierung liegt, sowie, dass keine Threoninphosphorylierung auftritt.

In Abbildung 5.1 A) ist der Phosphat Transfer der beiden Kinasen auf das Substrat GST-Y-PTB₂₇₅ gezeigt. Es wird deutlich, dass das Substrat durch die Wildtypkinase innerhalb von 30 min sehr viel effizienter phosphoryliert wird, als durch die Phe-Mutante der Kinase. Die Phosphorylierung durch die Wildtypkinase zeigt einen sättigenden Verlauf mit einem Maximum bei 60 pmol nach 32 min. Die Phe-Kinase überträgt im selben Zeitraum nur etwa 8 pmol. Zudem ist die Geschwindigkeit der Wildtypkinase im Initialbereich der Phosphorylierung zehn mal schneller als die der Phe-Kinase.

Für die Phosphoaminosäureanalyse (PASA) wurden die Proteine durch tryptische Elution aus dem Gel eluiert und durch saure Hydrolyse vollständig aufgespalten (8.2.10.4). Die Auftrennung erfolgte durch Dünnschicht-Chromatographie auf Nitrozellulosemembran.

Die eindimensionale PASA der phosphorylierten GST-Y-PTB₂₇₅ (Abbildung 5.1 B und C) zeigt, dass das Substrat durch die Wildtypkinase zeitabhängig signifikant an Serinresten neben Tyrosinresten phosphoryliert wird. Eine Analyse der durch die Phe-Kinase umgesetzten GST-Y-PTB₂₇₅ war auf Grund des nur geringen Gesamttransfers nicht möglich.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurden die Determinanten der dualen Substratphosphorylierung durch die IRKD weiter untersucht. In den nachfolgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob auch die lösliche Kinasedomäne des *insulin-like growth factor-1 receptor* (IGF-1R) in der Lage ist, Substrate dual neben Tyrosinresten auch an Serinresten zu phosphorylieren.

5.2 Bestimmung der Determinanten für duale Substratphosphorylierung

Das Ergebnis aus Kapitel 5.1 zeigt erstmals, dass duale Phosphorylierung von Substraten durch die IRKD ohne die Zugabe von Komplexbildnern wie Polylysin oder Histon2B möglich ist. Jedoch wurde in diesem Versuch mit monomerer Kinase gearbeitet. Die Kinase wurde ohne Affinitätschromatographie aus *Sf9*-Zelllysaten gereinigt. Trotz Kombination aus Ionenaustauscherchromatographie und Gelfiltrationschromatographie konnten die Kinasen in einem Reinheitsgrad von maximal 90% isoliert werden (Reinigungsdokumentation in Abbildung 10.7 im Anhang Seite 161). Des Weiteren mussten diese Kinasen vor der Substratphosphorylierung in einer Konzentration von 10 μ M mit 1 mM ATP unter Standardbedingungen vorphosphoryliert werden und anschließend für die Substrat Phosphorylierung auf 1 μ M verdünnt werden. Auf Grund dieser Durchführung ist der genaue Phosphat Transfer auf Basis der spezifischen Radioaktivität nur schwer zu bestimmen.

In den weiteren Versuchen sollten nun die spezifischen Bedingungen der dualen Phosphorylierung durch die IRKD und die nah verwandte IGF-Kinase weiter charakterisiert werden.

5.2.1 Etablierung von dimeren Kinasen

In einem ersten Schritt sollte untersucht werden, ob auch durch GST dimerisierte Kinasen in der Lage sind, Substrate an Serinresten zu phosphorylieren. Zudem ist bisher unklar ob

sich GST-Kinasen auch an den Phosphorylierungsstellen im Juxtamembranbereich phosphorylieren. Die Phosphorylierung des Tyrosins⁹⁶⁰ der IRKD oder des Tyrosins⁹⁵⁰ im nah verwandten IGF-1R im PTB-Bindemotiv (NPEpY) ist von entscheidender Bedeutung für die PTB-Bindung.

In den folgenden Versuchen wurden die dimeren Kinasen GST-TS-IGF_{ΔC} und die GST-TS-IGF_{ΔC Phe} verwendet. Die Kinasen stellen die lösliche Kinasedomäne des IGF-1-Rezeptors von Aminosäure Arginin⁹³⁰ bis Lysin¹²⁵⁶ dar. Das Konstrukt schließt den Juxtamembranbereich mit dem PTB-Bindemotiv (NPEY⁹⁵⁰) mit ein. Der C-Terminus wurde deletiert. Bisher wurde keine Interaktion zwischen der PTB und dem C-terminalen Bereich der Kinase beschrieben. Um dies bei den folgenden Experimenten trotzdem ausschließen zu können, wurde mit C-terminal deletierten Kinasen gearbeitet. Zwischen dem GST-Tag und der Kinase ist eine TEV-Proteaseschnittstelle, um die Kinasen bei Bedarf monomerisieren zu können.

Beide Kinasen sind in unserer Arbeitsgruppe kloniert und charakterisiert worden. Die Kinasen wurden von mir zuerst über GSH-Affinitätschromatographie (8.2.3.1) aus *Sf9*-Zellen (8.2.1.4) angereichert und weiter über die Kombination aus Anionenaustauscherchromatographie (8.2.3.4) und Gelfiltration (8.2.3.6) bis zu einem Reinheitsgrad von über 99% gereinigt (Reinigungsdokumentation in Abbildung 10.8 im Anhang, Seite 161). Aus 6×10^8 Zellen konnte auf diese Weise etwa 5 mg hoch reine Kinase in einer Konzentration von 2 µg/µl gewonnen werden.

In einem ersten Schritt wurde, durch Autophosphorylierung und Phosphorylierung eines artifiziellen Substrats, die Transferaseaktivität der beiden Kinasen GST-TS-IGF_{ΔC} und GST-TS-IGF_{ΔC Phe} bestimmt und normiert. (Abbildung 5.2A). Hierzu wurden die Kinasen in der Autophosphorylierung in einer Konzentration von 0,5 µM unter Standardbedingungen (siehe 8.2.10) radioaktiv, zeitabhängig phosphoryliert. Zu den jeweiligen Zeitwerten wurden dem Ansatz 30 µl entnommen, die Reaktion mit SDS-Probenpuffer gestoppt und die Proben über eine SDS-PAGE (8.2.9.3) aufgetrennt. Die Banden wurden mit kolloidaler Färbelösung (8.2.9.7) angefärbt, ausgeschnitten und ihre Radioaktivität mittels Cerenkov-Messung quantifiziert.

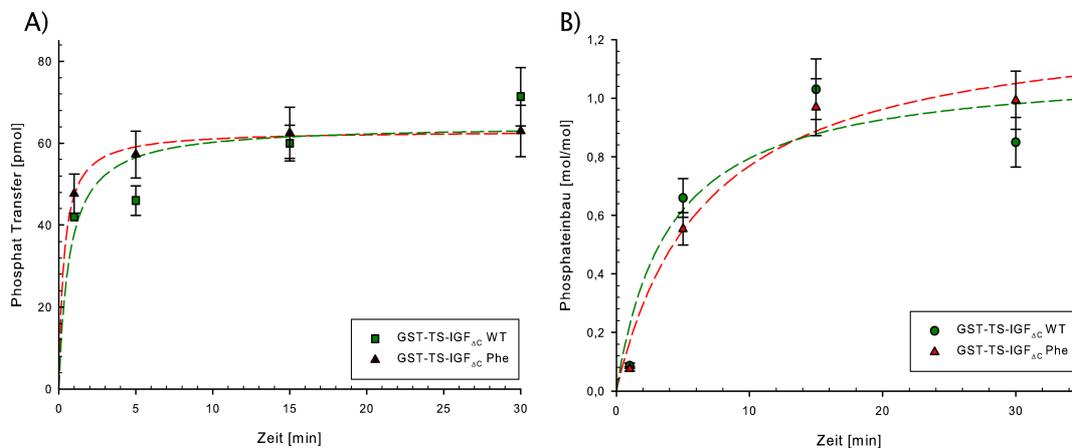


Abbildung 5.2.: Kontrolle der Kinaseaktivität von GST-TS-IGF_{ΔC} und GST-IGF_{ΔC} Phe durch Auto- und Substratphosphorylierung.

A) Zeitabhängige Autophosphorylierung. Aufgetragen ist der Phosphat Transfer in [pmol] gegen die Zeit in [min]. Beide Kinasen zeigen den gleichen Phosphorylierungsverlauf und sind nach 8 min vollständig phosphoryliert B) Zeitabhängige Substratphosphorylierung von Tyrtide durch GST-TS-IGF_{ΔC} (grün) und GST-TS-IGF_{ΔC} Phe (rot). Aufgetragen ist der Phosphateinbau in das Substrat in [mol/mol] gegen die Zeit in [min]. Beide Kinasen phosphorylieren das Substrat gleichwertig und übertragen nach 30 min ca. 1 mol/mol.

Beide Kinasen zeigen in der Autophosphorylierung den gleichen Verlauf. Sie erreichen beiden nach ca. 8 min ein Maximum von 60 pmol Phosphat. Umgerechnet auf Kinase Moleküle entspricht dies einem Phosphorylierungsgrad von 4 mol/mol.

Im zweiten Schritt wurden die Kinasen auf ihre jeweilige Transferaseaktivität für Substrate untersucht. Hierzu wurde das Substrat Tyrtide verwendet (Abbildung 5.2 B). Tyrtide ist ein 80 Aminosäure großes Peptidsubstrat, welches in unserer Arbeitsgruppe aus der p30 Region des humanen IRS-1 kloniert wurde. Die Sequenz von Tyrtide enthält nur eine Tyrosinphosphorylierungsstelle in einer YMxM-Sequenz Umgebung und wird an diesem Rest sehr gut durch die Kinasen des IR und des IGF phosphoryliert. Zudem zeigt es bei Phosphorylierung einen Mobilitätsshift in der nativen PAGE und der SDS-PAGE. Das Substrat Tyrtide wurde mir nach Affinitätschromatographie aus *E.coli* in einer Konzentration von 5 µg/µl zur Verfügung gestellt.

In Abbildung 5.2 B) ist die zeitabhängige Phosphorylierung von Tyrtide durch die IGF Kinasen GST-TS-IGF_{ΔC} und GST-TS-IGF_{ΔC} Phe gezeigt. In diesem Versuch wurden 10 µM Substrat durch je 0,5 µM Kinase unter Standardbedingungen (8.2.10) umgesetzt. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden dem Ansatz 30 µl entnommen und die Reaktion durch SDS-Probenpuffer abgestoppt. Die Proben wurden über eine SDS-PAGE (8.2.9.3)

aufgetrennt, die Banden mit kolloidaler Färbelösung angefärbt (8.2.9.7), ausgeschnitten und ihre Radioaktivität mittels Cerenkov-Messung quantifiziert. Es ist zu sehen, dass das Substrat durch beide Kinasen in gleicherweise umgesetzt wird. Beide Kinasen übertragen nach ca. 15 min etwa 1 mol Phosphat pro mol Substrat. Dies entspricht der theoretisch möglichen maximalen Phosphorylierung des Substrats.

Die Versuche zeigen, dass die Substitution des Tyrosins⁹⁵⁰ weder Auswirkung auf die Autophosphorylierung noch auf die Substratphosphorylierung von artifiziellen Substraten hat.

5.2.2 Phosphorylierung von GST-PTB₂₇₅ durch GST-Kinasen

Da gewährleistet ist, dass beide Kinasen die selbe Transferaseaktivität aufweisen, wurde nun überprüft, ob auch GST-Kinasen Substrate dual phosphorylieren können. Das Substrat GST-PTB₂₇₅ entspricht der PTB-Domäne des IRS-1 von Aminosäure Prolin¹⁵⁸ bis Asparagin²⁷⁵ und enthält keine artifiziellen Phosphorylierungsstellen wie in Kapitel 5.1 für die GST-Y-PTB beschrieben. In Abbildung 5.3 ist das Substrat schematisch dargestellt. Innerhalb der GST-PTB₂₇₅ liegt C-terminal der α -Helix ein Serincluster (Abbildung 5.17). Innerhalb des Clusters befindet sich mit Serin²⁷⁰ ein Substrat in einem RxRxxS-Motiv, welches durch die Akt-Kinase phosphoryliert wird. In dieser Arbeit wurde die Akt-Kinase als Modell für eine Serinkinase verwendet. Hierzu diente die GST-getagte, um die PH-Domäne deletierte und mittels Okadainsäure aktivierte Akt-Kinase (GST-Akt_{Oca}: intrazelluläre Domäne von Prolin¹¹⁹ bis Glutamat⁴⁸¹), welche bereits über Gluthation-Sepharose-Affinitätschromatographie gereinigt vorlag.

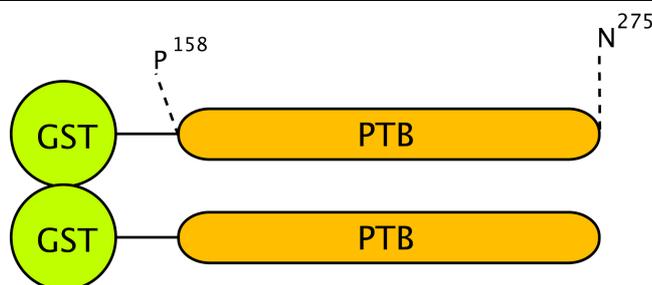


Abbildung 5.3.: Schematische Darstellung des Substrats GST-PTB₂₇₅.

Das Substrat entspricht der PTB-Domäne des humanen IRS-1 von Aminosäure Prolin¹⁵⁸ bis Asparagin²⁷⁵. C-terminal befindet sich das Serin²⁷⁰, welches ein natürliches Substrat der Akt-Kinase dargestellt. Das Substrat wurde mit einem N-terminalen GST-Reinigungstag exprimiert und liegt als konstitutives Dimer vor.

Das Substrat GST-PTB₂₇₅ wurde in unserer Arbeitsgruppe kloniert und von mir über GSH-Affinitätschromatographie (8.2.3.1) aus *E.coli* Zellysate (8.2.2) bis zu einem Reinheitsgrad von über 95% gereinigt. Die Reiningungsdokumentation durch SDS-PAGE (8.2.9.3) ist im Anhang in Abbildung 10.11 auf Seite 163 hinterlegt.

In diesem Versuch wurde das Substrat GST-PTB₂₇₅ zeitabhängig durch die GST-Kinasen GST-TS-IGF_{ΔC} und GST-TS-IGF_{ΔC Phe} phosphoryliert (Abbildung 5.4). Es wurden 5 μM Substrat durch je 1 μM Kinase phosphoryliert. Die Phosphorylierung wurde unter radioaktiven Standardbedingungen (8.2.10) durchgeführt. Zu den jeweiligen Zeitwerten wurden 30 μl der Reaktion mit SDS-Probenpuffer abgestoppt, über SDS-PAGE (8.2.9.3) aufgetrennt, angefärbt und analysiert.

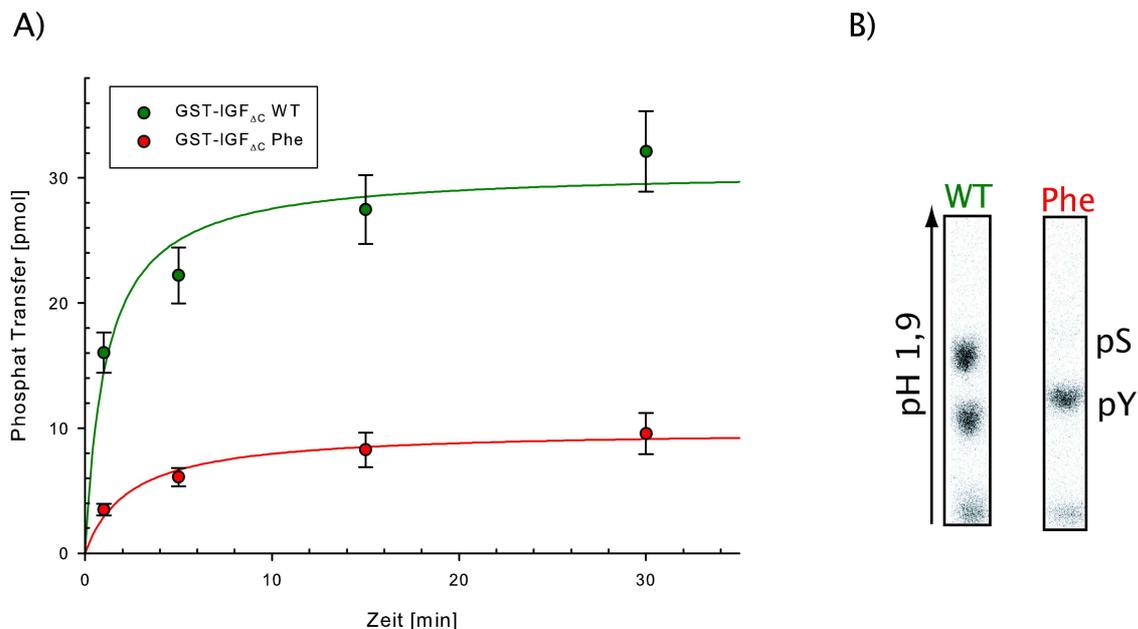


Abbildung 5.4.: Zeitabhängige Phosphorylierung von GST-PTB₂₇₅ durch GST-TS-IGF_{ΔC} und GST-TS-IGF_{ΔC Phe}

A) Aufgetragen ist der Phosphat Transfer in [pmol] gegen die Zeit in [min]. Das Substrat wird durch die Wildtypkinase sehr gut phosphoryliert (grün). Die Kinasemutante erreicht nach 30 min nur ein Drittel der wildtypischen Phosphorylierung (rot). B) 1D-PASA von GST-PTB₂₇₅. Die Wildtypkinase phosphoryliert überwiegend Serinreste, während die Phe-Mutante das Substrat ausschließlich an Tyrosinresten phosphoryliert

In Abbildung 5.4 ist zu sehen, dass das Substrat durch die Wildtypkinase deutlich schneller phosphoryliert wird, als durch die Phe-Mutante. Die Wildtypkinase überträgt nach 15 min ca. 30 pmol Phosphat auf das Substrat. Die Phe-Mutante kommt im selben Zeitraum auf nur etwa 8 Phosphate. Im Initialbereich ist zu sehen, dass die Wildtypkinase etwa fünfmal

schneller das Substrat umsetzt als die Phe-Kinase.

Die Abschwächung der Interaktion zwischen Kinase und Substrat hat zur Folge, dass die Phe-Mutante der Kinase das Substrat deutlich schlechter phosphoryliert.

Der Vergleich der Phosphoaminosäuren (8.2.10.4) des Substrats GST-PTB₂₇₅ zeigt, dass die Wildtypkinase überwiegend Serinreste, die Phe-Mutante hingegen ausschließlich Tyrosinresten des Substrats phosphoryliert (Abbildung 5.4 B).

Die Abschwächung der PTB-Bindung an den Juxtamembranbereich der Kinase hat zur direkten Folge, dass das Substrat nicht mehr an Serinresten phosphoryliert werden kann, wobei die allgemeine Transferaseaktivität der Kinase, für nicht bindende Substrate, durch die Substitution nicht beeinträchtigt wird.

5.2.3 Nachweis der Bindung von GST-PTB₂₇₅ an die IGF-Kinase

Um die Interaktion zwischen GST-Kinasen und GST-PTB₂₇₅ zu untersuchen, wurde ein Interaktions-Assay auf nativer PAGE durchgeführt. Hierzu wurde ein radioaktiv markierter N-Terminus der IGF-Kinase verwendet. Das Konstrukt GST-IGF_{NT} stellt den Juxtamembranbereich der IGF-Kinase von Aminosäure Arginin⁹⁴³ bis Glutamat¹⁰⁰⁷ dar. Der GST-IGF_{NT} besitzt selber keinerlei katalytische Aktivität. Das Protein GST-IGF_{NT} wurde zuerst von mir in *E.coli* exprimiert (8.2.2) und anschließend über Gluthation-Sepharose Affinitätschromatographie (8.2.3.1) bis zu einer Reinheit von 95% gereinigt (Reinigungsdokumentation im Anhang Seite 166, Abbildung 10.16). Im Anschluss wurden 1000 pmol GST-IGF_{NT} für 30 min mit 1 mM ATP und einer geringen Spezifischen Radioaktivität von 50 cpm/pmol ATP durch 50 pmol monomere IGF_{AC} katalytisch phosphoryliert. Zuvor wurde die monomere Kinase für 10 min in einer Konzentration von 10 µM mit 1 mM ATP autophosphoryliert und damit aktiviert.

Der nun radioaktiv phosphorylierte GST-IGF_{NT} (im folgenden $\gamma^{32}\text{P}$ -GST-IGF_{NT} genannt) wurde nun über eine Mini-GSH-Affinitätsreinigung (Säulenvolumen 300 µl) vom radioaktiven ATP und der monomeren IGF_{AC} gereinigt und durch je 50 µl Fraktionen von 10 mM reduziertem Gluthation eluiert. Die Kontrolle der Elution erfolgte durch Vermessen der einzelnen Eluatfraktionen im Cerenkov-Zähler, sowie über die Methode des Spot-Test (8.2.9.1). Die Eluate mit der höchsten Radioaktivität und Proteinkonzentration wurden vereinigt und bei -20°C gelagert.

Ergebnisse

Um die Interaktion zwischen $\gamma^{32}\text{P}$ -GST-IGF_{NT} und GST-PTB₂₇₅ nachzuweisen, wurden die beiden Komponenten in den Verhältnissen von $\gamma^{32}\text{P}$ -GST-IGF_{NT} zu GST-PTB₂₇₅ von 1:3, 1:2, 1:1 und 1:0,5 für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Interaktionsansätze wurden auf eine native PAGE aufgetragen. Als Kontrolle wurden $\gamma^{32}\text{P}$ -GST-IGF_{NT} und GST-PTB₂₇₅ einzeln aufgetragen. In Abbildung 5.5 sind die Coomassie gefärbte native PAGE der Interaktionsanalyse (A) und die Autoradiographie der nativen PAGE (B) abgebildet.

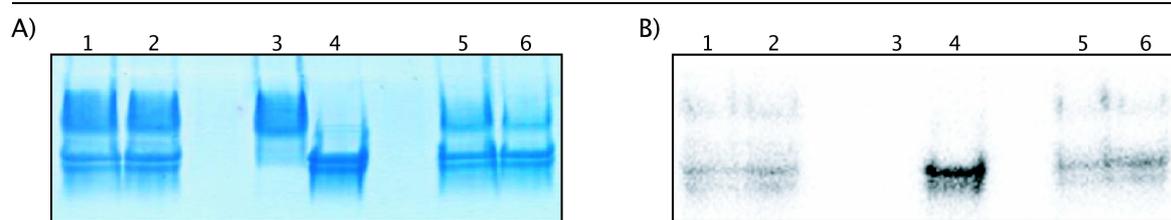


Abbildung 5.5.: Native PAGE zur Interaktion von radioaktiv phosphoryliertem GST-IGF_{NT} mit GST-PTB₂₇₅

A): Coomassie gefärbte native PAGE.

B): Autoradiographie des nativen Gels.

Die beiden Komponenten wurden in den Verhältnissen $\gamma^{32}\text{P}$ -GST-IGF_{NT} zu GST-PTB₂₇₅ von 1:3, 1:2, 1:1 und 1:0,5 für 20 min bei RT inkubiert.

1:Verhältnis von 1:3; 2:Verhältnis von 1:2; 3:Kontrolle GST-PTB₂₇₅; 4:Kontrolle $\gamma^{32}\text{P}$ -GST-IGF_{NT};

5:Verhältnis von 1:1; 6:Verhältnis von 1:0,5

In der nativen PAGE sind die Interaktionsansätze mit den verschiedenen Verhältnissen von GST-PTB₂₇₅ und $\gamma^{32}\text{P}$ -GST-IGF_{NT} dokumentiert (Spuren 1, 2, 5 und 6). Als Kontrolle wurde die GST-PTB₂₇₅ (Spur 3) sowie der radioaktiv markierte $\gamma^{32}\text{P}$ -GST-IGF_{NT} allein aufgetragen (Spur 4). Es ist zu erkennen, dass die beiden Proteine sich in ihrem Laufverhalten in der PAGE unterscheiden. Die GST-PTB₂₇₅ läuft im direkten Vergleich zum $\gamma^{32}\text{P}$ -GST-IGF_{NT} höher in der PAGE und wird deutlich von diesem getrennt.

Auf der Autoradiographie sind nur die Ansätze sichtbar, in denen $\gamma^{32}\text{P}$ -GST-IGF_{NT} vorliegt. Dies ist in den Interaktionsansätzen mit der GST-PTB₂₇₅ (Spuren 1, 2, 5 und 6) und der Kontrolle, in der nur der $\gamma^{32}\text{P}$ -GST-IGF_{NT} allein aufgetragen wurde (Spur 4), der Fall. In der Kontrolle ist zu sehen, dass der $\gamma^{32}\text{P}$ -GST-IGF_{NT} nur eine diskrete Bande im unteren Bereich der PAGE ausbildet. In den Interaktionsansätzen ist jedoch auch eine zweite Bande sichtbar. Diese zweite Bande läuft in der PAGE auf Höhe der GST-PTB₂₇₅. Da es sich um eine radioaktive Bande handelt, muss es eine Bande des $\gamma^{32}\text{P}$ -GST-IGF_{NT} sein. Somit wird

gezeigt, dass unter den gegebenen Bedingungen eine Interaktion zwischen dem $\gamma^{32}\text{P}$ -GST-IGF_{NT} und der GST-PTB₂₇₅ stattfindet und der $\gamma^{32}\text{P}$ -GST-IGF_{NT} in der PAGE nach oben shiftet.

5.2.4 Ist das Faltungsdimer GST von Substrat und Kinase der Grund für die Substrat-Kinase-Interaktion?

In dieser Arbeit wurde überwiegend mit dimeren Proteinen gearbeitet. Die GST-Form der IGF-Kinase ist als Modell für den Hormon-gebundenen und damit aktivierten Holorezeptor anerkannt^[45]. Die PTB-Domäne als dimeres Substrat ist hingegen nicht physiologisch. Daher ist fraglich, ob die Verwendung eines GST-Tags am Substrat der Grund für die Interaktion mit der Kinase ist. Ein Grund weshalb in dieser Arbeit mit GST-Fusioniertem Substrat gearbeitet wurde, ist der Umstand, dass die dimere Form der PTB-Domäne sehr stabil ist. Versuche, die PTB-Domäne bis Aminosäure Asparagin²⁷⁵ als monomeres Protein zu exprimieren gelangen nicht. Dieses Protein konnte zwar in *E.coli* exprimiert werden, eine Überführung in das Lysat war jedoch nicht möglich. Das Protein verblieb in *Inclusionbodies*. Versuche, die PTB unter denaturierenden Bedingungen aus *Inclusionbodies* zu reinigen, scheiterten an der Rückfaltung des Proteins.

Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, welchen Einfluss GST auf die Interaktion zwischen Kinase und Substrat, und damit auf die duale Kinaseaktivität der Kinase, hat. Hierzu wurde das Substrat GST-PTB₂₇₅ durch GST-TS-IGF_{ΔC} und GST-TS-IGF_{ΔC Phe} in Anwesenheit von freiem GST phosphoryliert. Als Kontrolle wurden die Ansätze zudem zusätzlich ohne GST phosphoryliert. Es wurden 5 μM GST-PTB₂₇₅ zeitabhängig durch je 1 μM der Kinasen GST-TS-IGF_{ΔC} und GST-TS-IGF_{ΔC Phe} unter radioaktiven Standardbedingungen (8.2.10) phosphoryliert (Abbildung 5.9). Die Ansätze enthielten zudem 15 μM freies GST. Zu den Zeitpunkten 1 min, 5 min, 15 min und 30 min wurden den Ansätzen je 30 μl entnommen, die Reaktion mit SDS-Probenpuffer abgestoppt, durch SDS-PAGE (8.2.9.3) aufgetrennt und mit kolloidaler Färbelösung angefärbt (8.2.9.7). Die einzelnen Banden wurden ausgeschnitten und ihre Radioaktivität mittels Cerenkov-Messung quantifiziert.

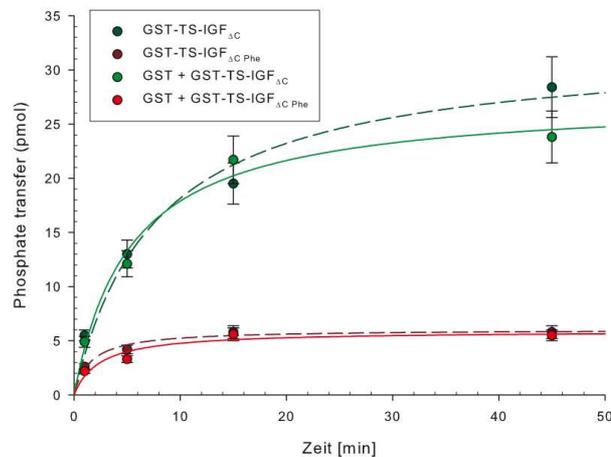


Abbildung 5.6.: Zeitabhängige Phosphorylierung von GST-PTB₂₇₅ durch GST-TS-IGF_{ΔC} und GST-TS-IGF_{ΔC Phe} ± 15 μM GST.

Aufgetragen ist der Phosphat Transfer in [pmol] gegen die Zeit in [min]. GST hat weder auf die Phosphorylierung der Wildtypkinase einen Einfluss (grün), noch auf die Phosphorylierung durch die bindungsdefiziente Phe-Mutante (rot)

In Abbildung 5.6 ist der zeitliche Verlauf der Phosphorylierung des Substrats GST-PTB₂₇₅ durch die beiden Kinasen gezeigt. Die Ansätze mit freiem GST sind durch durchgehende Linien, die jeweiligen Kontrollansätze in gestrichelten Linien dargestellt. Es ist zu sehen, dass die Phosphorylierungsverläufe beider Kinasen gleich sind. Für die Phosphorylierung von GST-PTB₂₇₅ durch die Wildtypkinase (grün) ist es unerheblich, ob GST im Ansatz ist oder nicht. In beiden Fällen wird nach 45 min etwa 30 pmol Phosphat auf das Substrat übertragen. Auch für die Phe-Mutante besteht kein Unterschied in der Phosphorylierung des Substrats. Sowohl im Ansatz mit freiem GST als auch in der Kontrolle wurden nach 45 min lediglich 5 pmol Phosphat übertragen. Auch die zuvor beschriebene Diskrepanz der Phosphorylierung von GST-PTB₂₇₅ zwischen Wildtypkinase und Phe-Mutante wird durch GST nicht aufgehoben.

5.2.5 Phosphorylierung der denaturierten GST-PTB₂₇₅

Dass die Bindung des Substrats GST-PTB₂₇₅ an die Kinase GST-TS-IGF_{ΔC} das Kriterium für deren duale Kinaseaktivität ist, sollte mittels Phosphorylierung von denaturiertem Substrat bestätigt werden. Die Denaturierung führt zum Verlust der nativen Sekundärstruktur der PTB, was zum Verlust der Interaktion mit der Kinase führen sollte.

Hierzu wurde das Substrat GST-PTB₂₇₅ durch eine Inkubation bei 95°C denaturiert und

anschließend auf Eis retemperiert. Das Substrat wurde durch die IGF-Kinase GST-TS-IGF_{ΔC} und die Serin-Kinase GST-Akt_{Oca} im Vergleich zu nativer GST-PTB₂₇₅ phosphoryliert (Abbildung 5.7). In diesem Versuch wurden 10 μM Substrat durch 2 μM GST-TS-IGF_{ΔC} bzw. 0,5 μM GST-Akt_{Oca} in je 30 μl für 30 min unter radioaktiven Standardbedingungen (8.2.10) phosphoryliert, und die Reaktion durch SDS-Probenpuffer abgestoppt. Die Proben wurden über eine SDS-PAGE (8.2.9.3) aufgetrennt, die Banden mit kolloidaler Färbelösung angefärbt (8.2.9.7), ausgeschnitten und ihre Radioaktivität mittels Cerenkov-Messung quantifiziert.

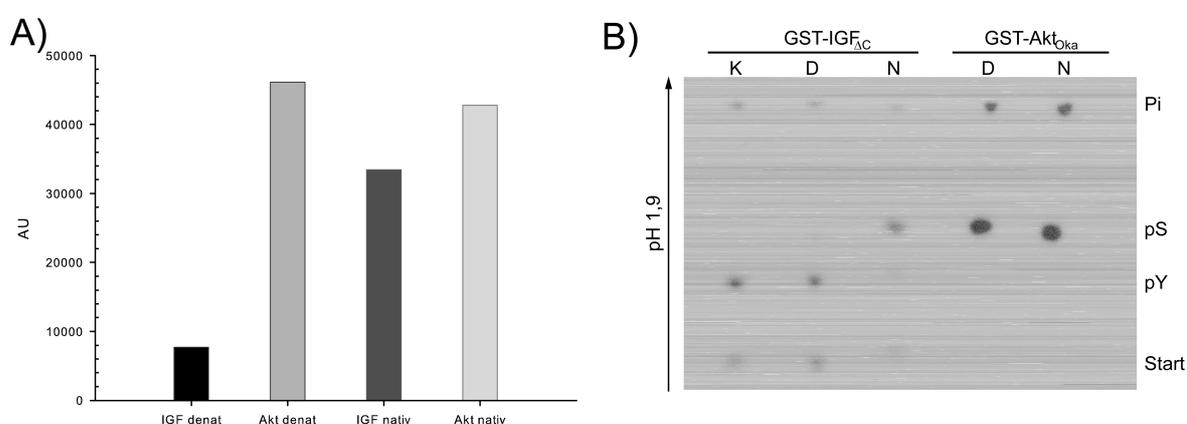


Abbildung 5.7.: Phosphorylierung von GST-PTB₂₇₅ im nativen und denaturierten Zustand durch GST-TS-IGF_{ΔC} und GST-Akt_{Oca}.

Aufgetragen ist der Phosphat Transfer in [AU] für die jeweilige Kinase (IGF = dunkel; Akt = hell). Die Phosphorylierung wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. Die Denaturierung erfolgte für 5 min bei 95°C mit anschließender Retemperierung auf Eis. Das Substrat wird von der IGF-Kinase nur im nativen Zustand phosphoryliert. Auf die Phosphorylierung durch die Akt-Kinase hat die Denaturierung keinen Einfluss. B) Auswertung der 1D-PASA (K: Kinasekontrolle; D: Denaturiert; N: nativ). Das denaturierte Substrat wird durch die IGF-Kinase nur an Tyrosin phosphoryliert. Auf die Phosphorylierung durch die Akt-Kinase hat die Denaturierung keinen Einfluss.

In Abbildung 5.7 A) ist die Radioaktivität des Substrats in arbiträren Einheiten (AU) dargestellt. Die Phosphorylierung durch die IGF-Kinase entspricht den dunkle Balken, die durch die Akt-Kinase den helle Balken. Es ist zu sehen, dass die IGF-Kinase nur die native PTB-Domäne phosphoryliert. Der Phosphat Transfer auf die denaturierte PTB entspricht nur einem Viertel des Transfers auf die native PTB-Domäne. Die Akt-Kinase phosphoryliert das Substrat GST-PTB₂₇₅ unabhängig von der Denaturierung. In beiden Fällen ist der Phosphat Transfer annähernd gleich. Der Vergleich der Phosphoaminosäuren

(Abbildung 5.7B) zeigt, dass die denaturierte PTB durch die IGF-Kinase ausschließlich an Tyrosinresten phosphoryliert wird. Die native PTB wird, wie schon in den vorangegangenen Versuchen gezeigt, überwiegend an Serinresten phosphoryliert. Auf die Akt-Kinase hat die Denaturierung auch in Bezug auf die Verteilung der Phosphoaminosäuren keinen Einfluss (Abbildung 5.7 B).

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Interaktion des nativen Substrats an die IGF-Kinase das entscheidende Kriterium für eine duale Aktivität der IGF-Kinase ist. Wird die Interaktion von Seiten des Substrats unterbunden, kommt es lediglich zu Tyrosinphosphorylierung. Dass auch die denaturierte PTB-Domäne sich grundsätzlich an Serinresten phosphorylieren lässt, wird durch die Kontrolle mit der Akt-Kinase gezeigt. Der Versuch schließt zudem aus, dass die Aufreinigung der GST-TS-IGF_{ΔC} additive Serinkinase enthält. Diese würden, wie mit der Akt-Kinase gezeigt, auch die denaturierte GST-PTB₂₇₅ an Serinresten phosphorylieren, da Serinkinase lediglich sequenzspezifisch sind und nicht auf die native Faltung ihrer Substrate angewiesen sind.

5.2.6 Phosphorylierung von GST-PTB₂₇₅ durch Kinasen mit mutierter Aktivierungsschleife

Innerhalb unserer Arbeitsgruppe wurden drei Kinase Mutanten kloniert, in denen je ein Tyrosin in der Aktivierungsschleife durch ein Phenylalanin substituiert wurde (LIRK_{Y1146F}, LIRK_{Y1150F}, LIRK_{Y1151F}). Diese Kinasen zeigen ein annähernd gleiches Verhalten in der Autophosphorylierung (siehe Abbildung 10.23 im Anhang und Diplomarbeit Moch^[159] und Sznepka^[160], 2008) jedoch mit abnehmender Fähigkeit zur „Auto-Serinphosphorylierung“. In der Substratphosphorylierung zeigen diese Kinase Mutanten jedoch große Unterschiede. In den Arbeiten von Moch und Sznepka wird die Auswirkung dieser Mutationen auf die Struktur des Aktiven Zentrums diskutiert.

Um zu überprüfen, in wieweit die Fähigkeit zur Serinphosphorylierung von der Struktur der Aktivierungsschleife abhängt, wurden die Kinase-Mutanten GST-LIRK_{Y1146F}, GST-LIRK_{Y1150F} und GST-LIRK_{Y1151F} verwendet, um das Substrat GST-PTB₂₇₅ zu phosphorylieren (Abbildung 5.8). Die Kinasen wurden mir in einer Reinheit von über 95% zur Verfügung gestellt.

In diesem Versuch wurde das Substrat GST-PTB₂₇₅ zeitabhängig durch die GST-Kinasen

GST-LIRK_{WT}, GST-LIRK_{Y1146F}, GST-LIRK_{Y1150F} und GST-LIRK_{Y1151F} phosphoryliert. Es wurden 5 μ M Substrat durch je 1 μ M Kinase phosphoryliert. Die Phosphorylierung wurde unter radioaktiven Standardbedingungen (8.2.10) durchgeführt. Zu den jeweiligen Zeitwerten wurden 30 μ l der Reaktion mit SDS-Probenpuffer abgestoppt, über SDS-PAGE (8.2.9.3) aufgetrennt, angefärbt (8.2.9.7) und die einzelnen Banden quantifiziert.

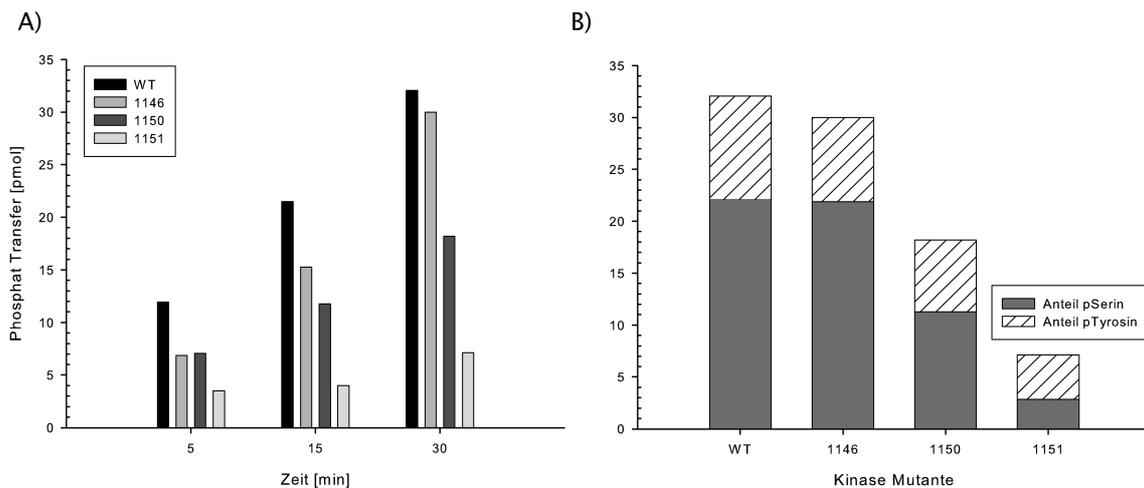


Abbildung 5.8.: Zeitabhängige Phosphorylierung von GST-PTB₂₇₅ durch Kinasen mit mutierter Aktivierungsschleife.

A) Aufgetragen ist der Phosphat Transfer in [pmol] durch die jeweilige Kinase mutante zu drei verschiedenen Zeitwerten in [min]. Die Mutante Y1146 verhält sich wie der Wildtyp. Die Mutante Y1150 phosphoryliert das Substrat deutlich schlechter als der Wildtyp, und die Kinase mutante Y1151F erreicht in der Substrat-phosphorylierung nur basale Aktivität.

B) Anteil an Phosphotyrosin und Phosphoserin der GST-PTB₂₇₅ nach 30 min Phosphorylierung durch die jeweilige Kinase Mutante. Während sich die Mutante Y1146 wie der Wildtyp verhält, phosphorylieren die Mutanten Y1150 und Y1151F deutlich weniger Serinreste des Substrats.

In Abbildung 5.8 A) ist der Phosphat Transfer auf das Substrats GST-PTB₂₇₅ zu drei verschiedenen Zeitpunkten durch die jeweilige Kinase Mutante dargestellt. Alle Kinase Mutanten zeigen im Vergleich zum Wildtyp herabgesetzte Fähigkeit zum Phosphat Transfer auf das Substrat. Die Mutante GST-LIRK_{Y1146F} zeigt bis 15 min einen geringeren Transfer als der Wildtyp, nach 30 min ist der Transfer annähernd gleich. Bei der Mutante GST-LIRK_{Y1150F} ist selbst nach 30 min der Transfer deutlich geringer als der Wildtyp. Die Kinase Mutante GST-LIRK_{Y1151F} erreicht in der Substratphosphorylierung lediglich basale Aktivität. In Abbildung 5.8 B) ist die Verteilung der Phosphoaminosäuren Phosphotyrosin (gestrichelt) zu Phosphoserin (grau) (8.2.10.4) gezeigt. Die Kinasen GST-LIRK_{Y1150F} und GST-LIRK_{Y1151F} phosphorylieren deutlich weniger Serinreste im Substrat (in grau), während der Anteil an Phosphotyrosin über alle Kinasen hinweg etwa gleich bleibt

(gestrichelt).

Dies zeigt, dass die Aktivierungsschleife der IGF-Kinase in einer richtigen Konformation vorliegen muss, um duale Kinaseaktivität zu gewährleisten. Substitutionen an Resten der Aktivierungsschleife der Kinase führen zu einer verminderten Fähigkeit, sich und Substrate dual zu phosphorylieren. Die Fähigkeit der Tyrosinphosphorylierung von bindenden Substraten ist durch diese Substitutionen jedoch nur geringfügig vermindert.

5.2.7 Konzentrationsabhängige Substratphosphorylierung von GST-PTB₂₇₅ durch GST-TS-IGF_{ΔC} und GST-TS-IGF_{ΔC Phe}

Das Substrat GST-PTB₂₇₅ zeichnet sich dadurch aus, dass es durch die IGF-1-Kinase und die IR-Kinase überwiegend an Serinresten phosphoryliert wird, jedoch nicht durch die bindingsdefizienten Phe-Mutanten dieser beiden Kinasen. Im folgendem Versuch sollte durch sukzessive Erhöhung der Substratkonzentration untersucht werden, in welchem stöchiometrischen Verhältnis die PTB-Domäne von der IGF-Kinase phosphoryliert wird.

Hierzu wurde das Substrat GST-PTB₂₇₅ in den Konzentrationen 0,25 μM, 0,5 μM, 1 μM, 2 μM, 4 μM und 8 μM für jeweils 5 min durch je 1 μM der Kinasen GST-TS-IGF_{ΔC} und GST-TS-IGF_{ΔC Phe} zeitabhängig unter radioaktiven Standardbedingungen (8.2.10) phosphoryliert (Abbildung 5.9). Zu den Zeitpunkten 0,5 min, 1 min, 2 min und 5 min wurden den Ansätzen je 30 μl entnommen, die Reaktion mit SDS-Probenpuffer abgestoppt, durch SDS-PAGE (8.2.9.3) aufgetrennt und mit kolloidaler Färbelösung angefärbt (8.2.9.7). Die einzelnen Banden wurden ausgeschnitten und die Radioaktivität mittels Cerenkov-Messung quantifiziert. Die zeitabhängigen Verläufe der einzelnen Phosphorylierungen wurden linear gefittet und die Steigung berechnet. Die Steigung wurde als Initialgeschwindigkeit in den folgenden Graphen übernommen und gegen die jeweilige Substratkonzentration aufgetragen.

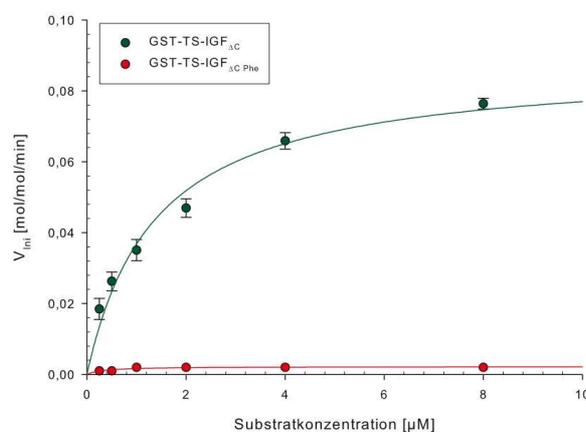


Abbildung 5.9.: Vergleich der Initialgeschwindigkeiten von GST-TS-IGF $_{\Delta C}$ und GST-TS-IGF $_{\Delta C}$ Phe für steigende Konzentrationen des Substrats GST-PTB $_{275}$.

Aufgetragen ist die Initialgeschwindigkeit der Phosphorylierung gegen die Substratkonzentration in [μM]. Das Substrat wird bei allen gemessenen Konzentrationen deutlich besser durch die Wildtypkinase phosphoryliert (grün). Für die Phe-Kinase konnte bei allen Substratkonzentrationen nur Background gemessen werden (rot). Die Initialgeschwindigkeit der Wildtypkinase nimmt mit steigender Substratkonzentration zu und erreicht ihr Maximum bei etwa 0,08 mol/mol/min

In Abbildung 5.9 ist die Initialgeschwindigkeit der Kinasen in Abhängigkeit der Substratkonzentrationen gezeigt. Es ist zu sehen, dass sich die Geschwindigkeit der Wildtypkinase (grün) mit steigender Substratkonzentration erhöht und ihr Maximum bei etwa 0,08 mol/mol/min erreicht. Die Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Geschwindigkeit erreicht wird, liegt bei etwa 1 μM Substrat. Dies entspricht der eingesetzten Kinasekonzentration. Für die bindingsdefiziente Phe-Kinase (rot) konnte bei keiner gemessenen Substratkonzentration im Bereich von 5 min ein realer Phosphat Transfer gemessen werden, der über dem Background lag. Die Ermittlung der Initialgeschwindigkeit ist somit mit einem großen Fehler versehen. Es wird jedoch deutlich, dass GST-PTB $_{275}$ kein Substrat für die GST-TS-IGF $_{\Delta C}$ Phe darstellt. Die Ermittlung der kinetischen Parameter, Maximalgeschwindigkeit und Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit, konnten nicht ermittelt werden.

5.2.8 Modulation der dualen Phosphorylierung durch Substratverlängerung

In den vorangegangenen Versuchen konnte experimentell belegt werden, dass durch die Ausbildung eines starken Komplexes zwischen Kinase und Substrat die duale

Kinaseaktivität auch für Substrate gezeigt werden kann. Als Modellsubstrat wurde bisher mit der PTB-Domäne des humanen IRS gearbeitet. Diese stellt nur einen sehr kurzen Teil des Scaffoldproteins dar. Fraglich war nun, ob sich die duale Kinaseaktivität der IGF-Kinase und der nah verwandten IR-Kinase auch auf längere Siquenzen des natürlichen Substrats IRS-1 übertragen lassen. Hinzu kommt die Frage, ob durch die Verwendung eines größeren Teils von IRS-1, das Substrat unabhängiger von der prominenten PTB-Bindung wird.

Hierzu wurde die PTB-Domäne in zwei Stufen verlängert. Im ersten Schritt wurde die PTB-Domäne bis zur Aminosäure Asparagin³⁷⁰ verlängert. Dies führte zum Konstrukt GST-PTB₃₇₀. Das Substrat wurde in unserer Arbeitsgruppe kloniert, von mir in *E.coli* exprimiert (8.2.2) und über GSH-Affinitätschromatographie (8.2.3.1) bis zu einer Reinheit von 95% gereinigt. Die Reiningungsdokumentation durch SDS-PAGE (8.2.9.3) ist im Anhang in Abbildung 10.15 auf Seite 165 hinterlegt.

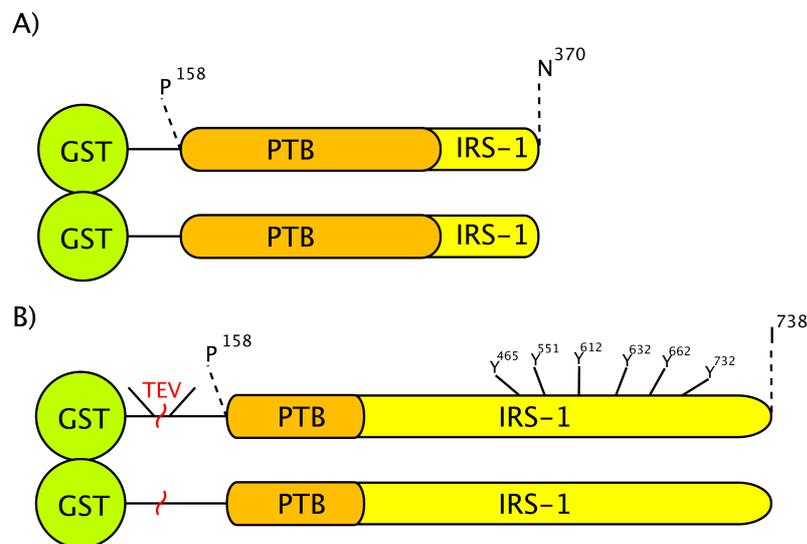


Abbildung 5.10.: Schematische Darstellung der Substrate GST-PTB₃₇₀ (A) und GST-TS-IRS-1₇₃₈ (B)

A) Das Substrat GST-PTB₃₇₀ entspricht der humanen PTB-Domäne des IRS-1 und ist bis zur Aminosäure Asparagin³⁷⁰ C-terminal verlängert. In der Verlängerung sind verschiedene Serinreste und Threoninreste vorhanden

B) Das Substrat GST-TS-IRS-1₇₃₈ entspricht dem humanen IRS-1 von Aminosäure Prolin¹⁵⁸ bis Isoleucin⁷³⁸. Es besteht aus der PTB-Domäne und reicht bis in die p30-Region hinein in der sechs Tyrosinreste in YxxM-Motiven liegen.

In einem zweiten Schritt wurde in unserer Arbeitsgruppe ein IRS-1-Konstrukt kloniert, das dem humanen IRS-1 von Aminosäure Prolin¹⁵⁸ bis Isoleucin⁷³⁸ entspricht. Das Konstrukt

GST-TS-IRS-1₇₃₈ wurde in einen Transfektionsvektor für *Sf9*-Zellen kloniert, welcher hinter dem GST-Tag eine Schnittstelle für die TEV-Protease enthält. Das Protein GST-TS-IRS-1₇₃₈ wurde von mir aus *Sf9*-Zellysat (8.2.1.4) durch GSH-Affinitätschromatographie (8.2.3.1) bis zu einem Reinheitsgrad von 90% gereinigt. Eine schematische Darstellung der beiden Konstrukte ist in Abbildung 5.10 dargestellt.

5.2.8.1 Das Substrat GST-PTB₃₇₀ wird durch die IGF-Kinase neben Serinresten auch an Threoninresten phosphoryliert

Das Substrat GST-PTB₃₇₀ beinhaltet die PTB-Domäne des humanen IRS-1 und ist bis zur Aminosäure Asparagin³⁷⁰ verlängert. In der C-terminalen Verlängerung befindet sich mit Serin³⁰⁶ ein weiteres Serin in einer Erkennungssequenz für die Akt-Kinase, sowie verschiedene Threoninreste in unterschiedlichen Sequenzumgebungen. Tyrosinreste sind in der C-terminalen Verlängerung nicht vorhanden (Abbildung 5.10 A).

In einem ersten Versuch wurden 5µM GST-PTB₃₇₀ durch je 1µM GST-TS-IGF_{ΔC} und GST-TS-IGF_{ΔC Phe} zeitabhängig phosphoryliert (Abbildung 5.11). Die Phosphorylierung wurde unter radioaktiven Standardbedingungen (8.2.10) durchgeführt. Zu den jeweiligen Zeitwerten wurden 30 µl der Reaktion mit SDS-Probenpuffer abgestoppt, über SDS-PAGE (8.2.9.3) aufgetrennt und angefärbt (8.2.9.7). Die einzelnen Banden wurden ausgeschnitten und ihre Radioaktivität mittels Cerenkov-Messung quantifiziert.

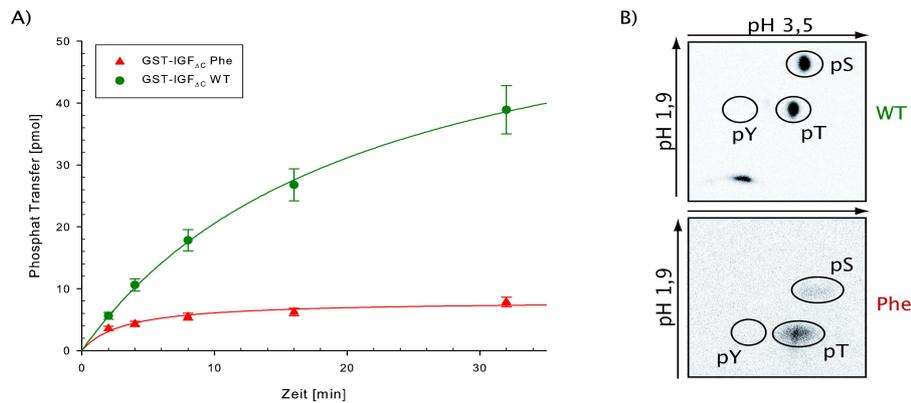


Abbildung 5.11.: Zeitabhängige Phosphorylierung von GST-PTB₃₇₀ durch GST-TS-IGF_{ΔC} WT und GST-TS-IGF_{ΔC} Phe (rot).

A) Aufgetragen ist der Phosphat Transfer in [pmol] gegen die Zeit in [min]. Das Substrat wird durch die Wildtypkinase (grün) viermal stärker phosphoryliert als durch die bindingsdefiziente Phe-Mutante (rot). B) 2D-PASA der durch die GST-Kinasen phosphorylierten GST-PTB₃₇₀. Das Substrat wird durch die Wildtypkinase massiv an Serin und Threoninresten phosphoryliert. Die Phe-Kinase phosphoryliert das Substrat ausschließlich an Threoninresten.

In Abbildung 5.11A ist der Phosphat Transfer auf das Substrat GST-PTB₃₇₀ durch die Kinasen GST-TS-IGF_{ΔC} (grün) und GST-TS-IGF_{ΔC} Phe (rot) gezeigt. Es ist zu sehen, dass das Substrat durch die Wildtypkinase zu allen Zeitpunkten deutlich besser phosphoryliert wird als durch die bindingsdefiziente Phe-Kinase. Die Wildtypkinase überträgt auf das Substrat nach 30 min etwa 40 pmol Phosphat. Die Phe-Kinase überträgt im gleichen Zeitraum nur 10 pmol Phosphat.

Der Vergleich der Phosphoamino säuren (8.2.10.4) des Substrats nach 30 min zeigt, dass die Wildtypkinase das Substrat zu gleichen Teilen an Serinresten und Threoninresten phosphoryliert. Die Phe-Mutante überträgt die Phosphate ausschließlich auf Threoninreste des Substrats.

Die Verlängerung des Substrats erweiterte die Spezifität der IGF-Kinase über Serinreste und Tyrosinreste hinaus. Werden der Kinase in bindenden Substraten auch Threoninreste angeboten, so werden auch diese phosphoryliert. Zudem konnte erstmals auch für die Phe-Mutante eine Erweiterung der Spezifität gezeigt werden. Auch die Phe-Mutante phosphoryliert das Substrat an Threoninresten, wenngleich der Gesamttransfer deutlich schlechter ist.

5.2.8.2 Konzentrationsabhängige Phosphorylierung von GST-PTB₃₇₀ durch GST-TS-IGF_{ΔC} und GST-TS-IGF_{ΔC Phe}

Im Anschluss sollte untersucht werden, in wie weit sich die Geschwindigkeit der Kinase ändert, wenn das Substrat neben Serinresten nun auch Threoninreste als Phosphat-Akzeptor anbietet.

Hierzu wurde der Versuch aus Kapitel 5.2.7, in dem das Substrat GST-PTB₂₇₅ konzentrationsabhängig phosphoryliert wurde, mit dem verlängerten Substrat GST-PTB₃₇₀ wiederholt.

Das Substrat GST-PTB₃₇₀ wurde in den Konzentrationen 1 μM, 3 μM, 5 μM, 10 μM und 15 μM für jeweils 5 min durch je 1 μM der Kinasen GST-TS-IGF_{ΔC} und GST-TS-IGF_{ΔC Phe} zeitabhängig unter radioaktiven Standardbedingungen (8.2.10) phosphoryliert (Abbildung 5.12). Zu den Zeitpunkten 0,5 min, 1 min, 2 min und 5 min wurden den Ansätzen je 30 μl entnommen, die Reaktion mit SDS-Probenpuffer abgestoppt, durch SDS-PAGE (8.2.9.3) aufgetrennt und mit kolloidalen Färbelösungen angefärbt (8.2.9.7). Die einzelnen Banden wurden ausgeschnitten, und ihre Radioaktivität mittels Cerenkov-Messung quantifiziert. Die Ermittlung der Initialgeschwindigkeiten erfolgte wie im obigen Versuch beschrieben.

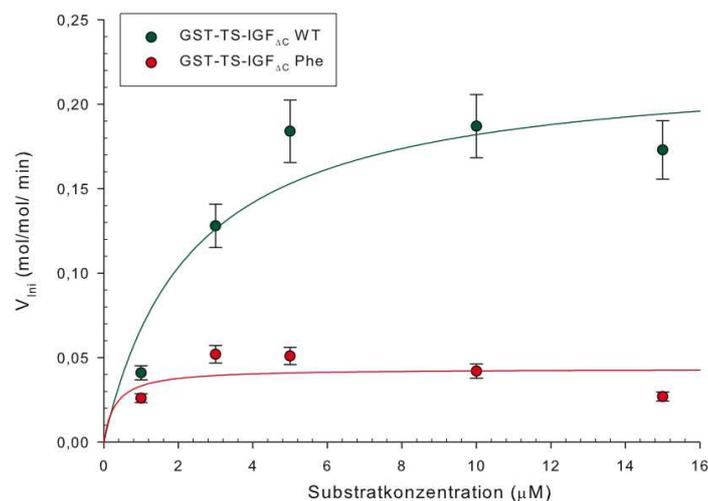


Abbildung 5.12.: Vergleich der Initialgeschwindigkeiten von GST-TS-IGF_{ΔC} und GST-TS-IGF_{ΔC Phe} für steigende Konzentrationen des Substrats GST-PTB₃₇₀.

Aufgetragen ist die Initialgeschwindigkeit der Phosphorylierung gegen die Substratkonzentration in [μM]. Das Substrat wird bei allen gemessenen Konzentrationen deutlich besser durch die Wildtypkinase phosphoryliert. Durch die Phe-Mutante wird das Substrat bei allen Konzentrationen nur marginal phosphoryliert.

In Abbildung 5.12 ist die Initialgeschwindigkeit der Kinasen bei den gegebenen Substratkonzentrationen angegeben. Es ist zu sehen, dass sich die Geschwindigkeit der Wildtypkinase (grün) mit steigender Substratkonzentration erhöht und ihr Maximum bei 5 μM Substrat mit etwa 0,17 mol/mol/min erreicht. Die Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Geschwindigkeit erreicht wird, liegt bei etwa 1 μM Substrat. Dies entspricht der eingesetzten Kinasekonzentration. Die bindungsdefiziente Phe-Kinase (rot) überträgt bei allen gemessenen Substratkonzentration nur sehr langsam Phosphat auf das Substrat. Die Phe-Kinase erreicht bei 3 μM Substrat ihre maximale Geschwindigkeit von etwa 0,05 mol/mol/min. Jedoch zeigt der Verlauf der Reaktion und der geringe Phosphat Transfer, dass dieser Wert mit einem hohen Fehler behaftet ist.

5.2.8.3 Das Substrat GST-TS-IRS-1₇₃₈ wird durch die IGF-Kinasen GST-TS-IGF _{ΔC} und GST-TS-IGF _{$\Delta\text{C Phe}$} an Serin-, Threonin- und Tyrosinresten phosphoryliert

Das Substrat GST-TS-IRS-1₇₃₈ besteht aus der humanen PTB-Domäne des IRS-1 und ist C-terminal bis zum Ende der p30-Region des IRS-1 verlängert. Die p30 Region entspricht der Hauptphosphorylierungsstelle des IRS-1. In dieser Region liegen sechs Tyrosine in YxxM-Motiven (Tyrosin⁴⁶⁵, Tyrosin⁵⁵¹, Tyrosin⁶¹², Tyrosin⁶³², Tyrosin⁶⁶² und Tyrosin⁷³²) welche ideale Substrate für die Kinasen des IR und des IGFIR darstellen (Abbildung 5.10B).

Für erste Versuche wurde zunächst die Kinase in ihrer monomeren Form verwendet (Abbildung 5.13A), da nicht klar war, ob dimere GST-Kinasen große dimere Substrate dual phosphorylieren können, oder ob es auf Grund von sterischen Behinderungen zu einer verminderten Phosphorylierung kommt.

Die monomeren Kinasen wurden durch eine Restriktion mit der TEV-Protease aus den GST-TS-IGF-Kinasen erhalten. Hierzu wurden die GST-Kinasen in einem Verhältnis von 1:20 mit rekombinanter TEV-Protease für 2 h bei 4°C verdaut. Anschließend wurde durch eine Kombination aus Mini GSH-Affinitätschromatographie (Säulenvolumen 400 μl) und Mini Ni-NTA-Affinitätschromatographie (Säulenvolumen 200 μl ; siehe Methodenteil 8.2.3.3) sowohl ungespaltene Kinase als auch abgespaltenes GST und die TEV-Protease aus dem Ansatz entfernt. Die monomeren IGF _{ΔC} Kinasen lagen im Durchfluss zu nahezu 100% rein vor. Die Dokumentation der Aufreinigung ist im Anhang in Abbildung 10.10

dargestellt. Die monomeren Kinasen TS-IGF_{ΔC} und TS-IGF_{ΔC Phe} wurden vor der Verwendung in Phosphorylierungsansätzen in einer Konzentration von 10 μM mit 1 mM ATP unter Standardbedingungen vorphosphoryliert und dann für die Substratphosphorylierung verdünnt.

Für die Untersuchung der Substratphosphorylierung von GST-TS-IRS-1₇₃₈ wurden 3 μM Substrat durch je 1 μM TS-IGF_{ΔC} und 1 μM TS-IGF_{ΔC Phe} unter radioaktiven Standardbedingungen (8.2.10) phosphoryliert. Zu den jeweiligen Zeitwerten wurden dem Ansatz 30 μl entnommen, die Reaktion mit SDS-Probenpuffer gestoppt und die Proben über eine SDS-PAGE (8.2.9.3) aufgetrennt. Die Banden wurden angefärbt (8.2.9.7), ausgeschnitten und ihre Radioaktivität mittels Cerenkov-Messung quantifiziert.

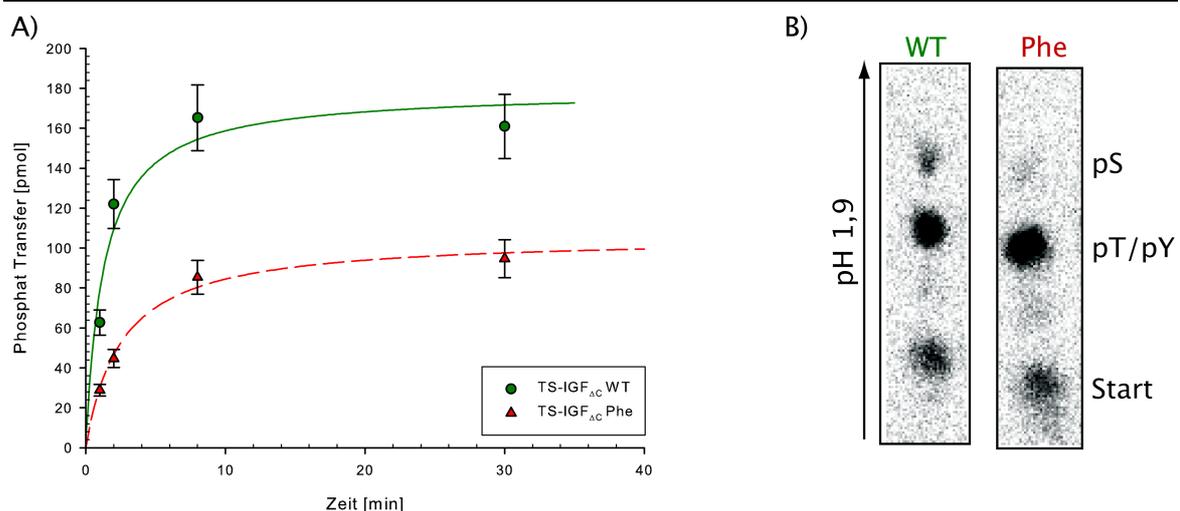


Abbildung 5.13.: Zeitabhängige Phosphorylierung von GST-TS-IRS-1₆₆₅ durch monomere IGF Kinasen.

Aufgetragen ist der Phosphat Transfer in [pmol] gegen die Zeit in [min]. In grün ist die Phosphorylierung durch TS-IGF_{ΔC} Wildtyp und in rot durch die bindingsdefiziente TS-IGF_{ΔC} Phe-Mutante. Das Substrat wird durch die Mutante nur zu gut 50% im Vergleich zum Wildtyp phosphoryliert. B) 1D-PASA des Substrats nach 30 min Phosphorylierung durch die verwendeten Kinasen. Die Wildtypkinase phosphoryliert neben Tyrosin und Threoninresten auch Serinreste innerhalb des Substrats 82D-Daten nicht gezeigt)

Wie in Abbildung 5.13 gezeigt, wird das Substrat durch beide Kinasen phosphoryliert. Die Wildtypkinase (grün) überträgt nach 8 min 160 pmol Phosphat auf das Substrat, die Phe-Mutante (rot) in vergleichbarer Zeit nur 80 pmol. Zudem ist im Initialbereich der Reaktion zu erkennen, dass die Wildtypkinase das Substrat etwa doppelt so schnell phosphoryliert wie die Phe-Mutante. Der Vergleich der Phosphoaminosäuren (Abbildung 5.13B) des Substrats zeigt, dass die Wildtypkinase das Substrat neben Tyrosinresten auch an Serinresten phosphoryliert. Die Auswertung der 2D-PASA erbrachte zudem einen hohen

Anteil an Phosphothreonin im Substrat (nicht gezeigt). Das Verhältnis von Phosphotyrosin zu Phosphothreonin und Phosphoserin wurde bestimmt auf 2:1:1 (pY:pT:pS). Die Phe-Kinase ist dazu nur marginal in der Lage. Die Kinasemutante phosphoryliert das Substrat überwiegend an Tyrosinresten und marginal an Threoninresten. Phosphoserin konnte nicht nachgewiesen werden.

Da das Substrat GST-TS-IRS-1₇₃₈ sehr groß ist und durch GST dimerisiert vorlag, wurde im nächsten Schritt das Substrat durch eine Restriktion mit der TEV-Protease monomerisiert. Hierzu wurde das Substrat für 1,5 h bei Raumtemperatur mit TEV-Protease behandelt und über eine Kombination von Ni-NTA-Affinitätschromatographie (8.2.3.2) und GSH-Affinitätschromatographie (8.2.3.1) aufgereinigt. Anschließend wurde das Substrat TS-IRS-1₇₃₈ durch ein 30k-Centricon in 50 mM Tris pH 7,5 umgepuffert und angereichert (8.2.8.1).

Im zweiten Versuch wurden 5 μ M des Substrats TS-IRS-1₇₃₈ durch je 1 μ M der GST-Kinasen GST-TS-IGF $_{\Delta C}$ und 1 μ M GST-TS-IGF $_{\Delta C}$ Phe unter radioaktiven Standardbedingungen (8.2.10) phosphoryliert (Abbildung 5.14A). Zu den jeweiligen Zeitwerten wurden dem Ansatz 30 μ l entnommen, die Reaktion mit SDS-Probenpuffer gestoppt und die Proben über SDS-PAGE (8.2.9.3) aufgetrennt. Die Banden wurden angefärbt (8.2.9.7), ausgeschnitten und ihre Radioaktivität mittels Cerenkov-Messung quantifiziert.

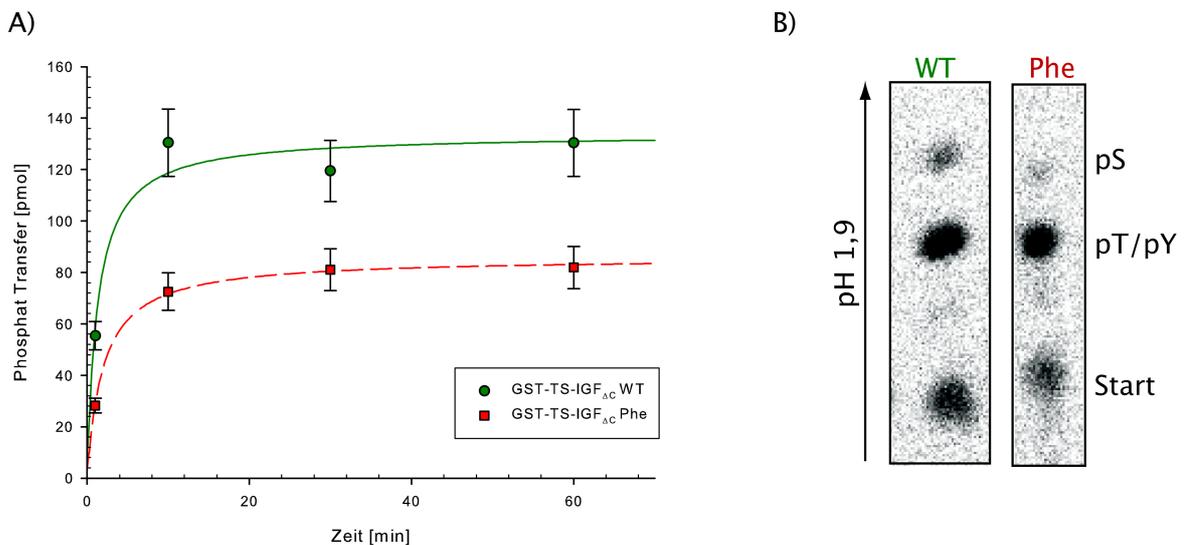


Abbildung 5.14.: Zeitabhängige Phosphorylierung von TS-IRS-1₆₆₅ durch dimere GST-IGF Kinasen.

A) Aufgetragen ist der Phosphat Transfer in [pmol] gegen die Zeit in [min]. In grün ist die Phosphorylierung durch GST-TS-IGF_{ΔC} Wildtyp und in rot durch die bindingsdefiziente GST-TS-IGF_{ΔC} Phe gezeigt. Das Substrat wird durch die Mutante nur zu ca. 65% im Vergleich zum Wildtyp phosphoryliert. B) 1D PASA des Substrats nach 30 min. Die Wildtypkinase überträgt bis zu 20% der Phosphate auf Serinreste, die Phe-Kinase nur etwa 5%.

In Abbildung 5.14A) ist der Phosphat Transfer durch die Wildtypkinase (grün) und die Phe-Mutante (rot) auf das monomere Substrat TS-IRS-1₇₃₈ gezeigt. Es ist zu sehen, dass die Wildtypkinase das Substrat deutlich schneller phosphoryliert als die bindingsdefiziente Phe-Mutante. Nach 10 min überträgt die Wildtypkinase das Maximum von etwa 140 pmol Phosphat auf das Substrat. Die Phe-Kinase phosphoryliert im selben Zeitraum das Substrat mit bis zu 80 pmol Phosphat.

Der Vergleich der Phosphoaminosäuren (8.2.10.4) des Substrats (Abbildung 5.14B) zeigt, dass das Substrat durch die Wildtypkinase bis zu 20% an Serinresten phosphoryliert wird. Die Phe Kinase überträgt etwa 5% der Phosphate auf Serinreste des Substrats.

Im Anschluss an diesen Versuch sollte das dimere GST-Substrat durch dimere GST-Kinasen phosphoryliert werden. Fraglich ist, ob dimere IGF-Kinasen in der Lage sind, große dimere Substrate zu binden und dual zu phosphorylieren, oder ob es auf Grund von sterischen Behinderungen zu keiner produktiven Komplexbildung zwischen Kinase und Substrat kommt.

Hierzu wurden 3 μM des Substrat GST-IRS-1₇₃₈ durch je 1 μM GST-TS-IGF_{ΔC} und GST-TS-IGF_{ΔC} Phe unter radioaktiven Standardbedingungen (8.2.10) phosphoryliert

Ergebnisse

(Abbildung 5.15A). Zu den jeweiligen Zeitwerten wurden dem Ansatz 30 μ l entnommen, die Reaktion mit SDS-Probenpuffer gestoppt und die Proben über eine SDS-PAGE aufgetrennt (8.2.9.3). Die Banden wurden mit kolloidalen Färbelösungen angefärbt (8.2.9.7), ausgeschnitten und ihre Radioaktivität mittels Cerenkov-Messung quantifiziert.

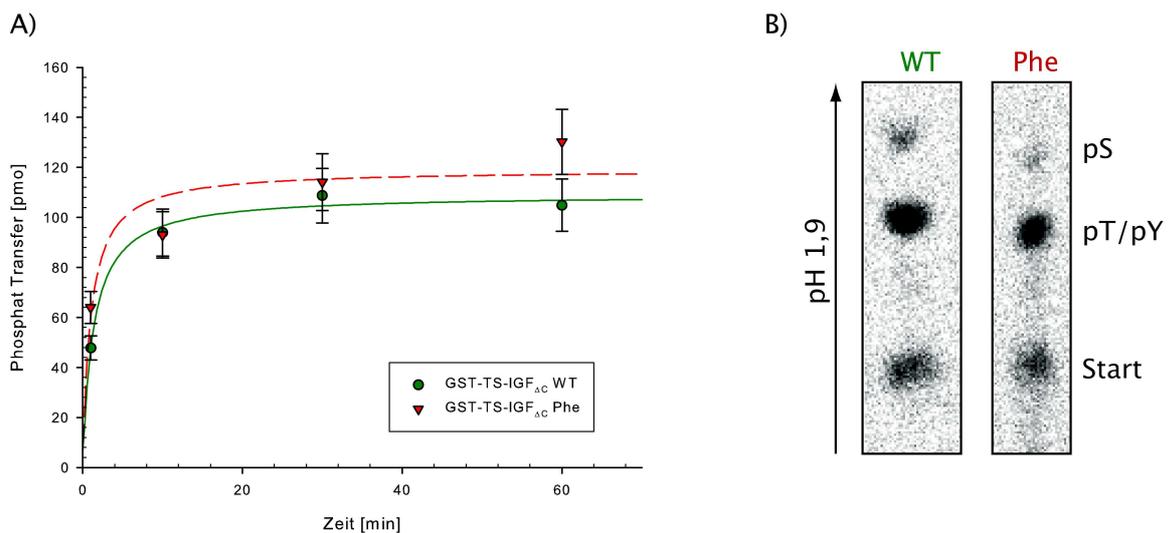


Abbildung 5.15.: Zeitabhängige Phosphorylierung von GST-TS-IRS-1₇₃₈ durch dimere GST-IGF Kinasen.

A) Aufgetragen ist der Phosphat Transfer in [pmol] gegen die Zeit in [min]. In grün ist die Phosphorylierung durch GST-TS-IGF $_{\Delta C}$ Wildtyp und in rot durch die bindingsdefiziente GST-TS-IGF $_{\Delta C}$ Phe. Das Substrat wird durch beide Kinasen gleichwertig phosphoryliert.

B) 1D-PASA des Substrats nach 30 min. Es ist zu erkennen, dass die Wildtypkinase das Substrat dual mit bis zu 15% Phosphoserin phosphoryliert. Die Phe-Kinase überträgt hingegen nur 5% der Phosphate auf Serinreste im Substrat.

In Abbildung 5.15A ist der zeitliche Phosphat Transfer auf GST-IRS-1₇₃₈ durch die dimeren GST-Kinasen GST-TS-IGF $_{\Delta C}$ (grün) und GST-TS-IGF $_{\Delta C}$ Phe (rot) gezeigt. Es ist zu sehen, dass beide Kinasen das Substrat gleich phosphorylieren. Es besteht keine Diskriminierung zwischen GST-TS-IGF $_{\Delta C}$ und GST-TS-IGF $_{\Delta C}$ Phe, welche in allen vorangegangenen Substratphosphorylierungen beobachtet wurde. Nach 20 min ist ein Maximum von etwa 130 pmol Phosphat durch beide Kinasen auf das Substrat übertragen worden. Auch im Initialbereich der Phosphorylierung verhalten sich beide Kinasen annähernd gleich.

Der Vergleich der Phosphoaminosäuren (8.2.10.4) des Substrats nach 30 min (Abbildung 5.15B) zeigt, dass die Wildtypkinase das Substrat neben Tyrosinresten auch bis zu 15% an Serinresten phosphoryliert. Die Phe-Mutante phosphoryliert das Substrat überwiegend an Tyrosinresten, jedoch ebenfalls mit bis zu 5% an Serinresten.

Durch die Kombination von GST-Kinasen und großen GST-Substraten kommt es zu keiner Diskriminierung im Phosphat Transfer zwischen der Kinase-Mutante und der Wildtypkinase. Zudem konnte erstmals gezeigt werden, dass auch die Phe-Mutante (GST-TS-IGF_{ΔC Phe}) durchaus in der Lage ist, Substrate dual an Serinresten und Threoninresten zu phosphorylieren. Jedoch ist die Phe-Mutante immer noch deutlich langsamer in der Phosphorylierung von Serinresten im Substrat.

5.3 Auswirkungen einer kovalenten Bindung zwischen Substrat und Kinase

In den vorangegangenen Versuchen wurde mit Substraten gearbeitet, welche über die PTB-“Docking“-Domäne an die Kinase zu binden. Wird diese Bindung auf Seiten der Kinase dadurch geschwächt, dass eine bindungsdefiziente Kinasemutante (Phe-Mutante) verwendet wird, so wird der Phosphat Transfer auf das Substrat signifikant verringert. Zudem ist keine duale Kinaseaktivität mehr messbar. Wird die Bindung auf Seiten des Substrats dadurch unterbrochen, z.B. dadurch dass das Substrat denaturiert wird, so kann auch die GST-TS-IGF_{ΔC} das Substrat nicht mehr dual phosphorylieren. Wird das Substrat verlängert, und somit unabhängiger von der reinen Komplexbildung durch die PTB-Domäne, so kann auch die sonst bindungsdefiziente Kinasemutante das Substrat dual phosphorylieren.

Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, wie Substrate phosphoryliert werden, wenn diese gleichsam kovalent an die Kinase gekoppelt sind. Die Auswirkungen, welche eine kovalente Kopplung von zwei Reaktanden hat, ist in der Literatur unter dem *Proximity Effekt* bekannt^[161-163]. Hierbei kommt es, je nach Länge und Flexibilität der Kopplung, zu einer Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit.

Zur Beantwortung der Fragestellung wurden zwei Hybride generiert. Die Hybride bestehen jeweils aus einer aktiven Kinaseuntereinheit und einer Untereinheit des Substrats GST-IRS-1₇₃₈. Die beiden Untereinheiten sind über das natürliche Faltungsdimer GST kovalent aneinander gekoppelt.

Die Hybride wurden durch Koexpression in *SF9*-Zellen exprimiert (8.2.1.4), und über eine GSH-Affinitätschromatographie (8.2.3.1) mit anschließender Anionenaustauscherchromatographie (8.2.3.4) gereinigt. Die Reinigungsdokumentation des Hybrides

GST-IRKD-IRS-1₇₃₈ ist im Anhang auf Seite 162 dargestellt (Abbildung 10.9). Auf diese Weise wurden zwei Hybride erzeugt: das Hybrid GST-IRKD-IRS-1₇₃₈ und das Hybrid GST-IRKD_{Phe}-IRS-1₇₃₈. Die beiden Hybride unterscheiden sich nur durch die Substitution des Tyrosins⁹⁶⁰ durch Phenylalanin in der Kinase GST-IRKD_{Phe}. Die beiden Untereinheiten der Hybride unterscheiden sich stark in ihrem Molekulargewicht. Die GST-IRS-1₇₃₈-Untereinheit ist etwa 116 kDa, die GST-IRKD-Untereinheit etwa 66 kDa groß. Dies ermöglicht eine genaue Trennung in der SDS-PAGE und eine exakte Zuordnung des Phosphat Einbaus in die einzelnen Untereinheiten.

Die Hybride wurden zeitabhängig unter radioaktiven Standardbedingungen (8.2.10) phosphoryliert (Abbildung 5.16). Zu den jeweiligen Zeitwerten wurden dem Ansatz 30 µl entnommen, die Reaktion mit SDS-Probenpuffer gestoppt und die Proben über eine SDS-PAGE (8.2.9.3) aufgetrennt. Die Banden wurden mit kolloidaler Färbelösung angefärbt (8.2.9.7), ausgeschnitten und ihre Radioaktivität mittels Cerenkov-Messung quantifiziert.

In Abbildung 5.16 ist der Phosphateinbau in die jeweiligen Untereinheiten der Hybride zu den gemessenen Zeitwerten gezeigt. In Abbildung 5.16 A (grün) ist der Phosphateinbau in die Wildtypkinase GST-IRKD (Dreiecke) und die GST-IRS-1 Untereinheit (Kreise) dargestellt.

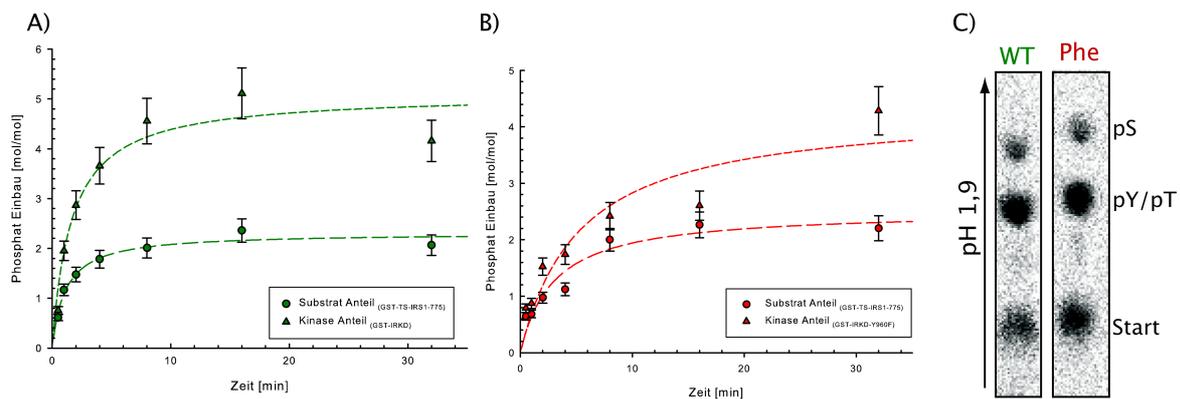


Abbildung 5.16.: Zeitabhängige Phosphorylierung der Hybride GST-IRKD-IRS-1₇₃₈ und GST-IRKD_{Phe}-IRS-1₇₃₈

Aufgetragen ist jeweils der Phosphat Transfer in [pmol] gegen die Zeit in [min]. Es ist kein Unterschied in der Phosphorylierung der beiden Hybride zu erkennen.

A) Zeitabhängige Phosphorylierung des Hybrides GST-IRKD-IRS-1₇₃₈

B) Zeitabhängige Phosphorylierung des Hybrides GST-IRKD_{Phe}-IRS-1₇₃₈

C) Vergleich der Phosphoaminosäuren der IRS-1-Untereinheit aus den beiden Hybriden. In beiden Hybriden wird das Substrat mit bis zu 30% an Serinresten phosphoryliert.

Es ist zu sehen, dass die Kinaseuntereinheit nach 15 min etwa 5 pmol Phosphat pro mol Kinase einbaut und in den nächsten 15 min wieder leicht dephosphoryliert wird. In die enzymatisch nicht aktive IRS-1-Untereinheit werden etwa 2 pmol Phosphat pro mol der Untereinheit eingebaut. In Abbildung 5.16 B (rot) ist der Phosphateinbau in die Kinasemutante GST-IRKD_{Phe} (Dreiecke) und die dazugehörige GST-IRS-1 Untereinheit (Kreise) dargestellt. Es ist zu sehen, dass die Kinaseuntereinheit etwa 3 pmol Phosphat pro mol Kinase einbaut. In die enzymatisch nicht aktive IRS-1-Untereinheit werden durch die Kinaseuntereinheit etwa 2 pmol Phosphat pro mol der Untereinheit eingebaut. Der Vergleich der Phosphoaminosäuren (8.2.10.4) der IRS-1-Untereinheit nach 30 min zeigt, dass beide Kinasen das Substrat im Hybrid gleich phosphorylieren. Die IRS-1-Untereinheit ist stark an Tyrosinresten phosphoryliert und weist ca. 30% Phosphoserin auf.

Durch die gleichsam kovalente Kopplung des Substrats an die Kinase wird die Diskriminierung zwischen der Phe-Mutante und der Wildtypkinase gänzlich aufgehoben. Zudem zeigt der Versuch, dass auch die Phe-Kinase das Substrat mit der selben Effizienz wie die Wildtypkinase phosphoryliert. Auch die Verteilung der Phosphoaminosäuren im Substrat zeigt, dass die Phe-Kinase in der Lage ist, Substrate dual zu phosphorylieren.

5.4 Bestimmung der Serinphosphorylierungsstelle

In den vorangegangenen Versuchen wurde deutlich, dass die IGF-Kinase und die Kinase des Insulinrezeptors neben ihrer Tyrosinkinasefunktion auch in der Lage sind Substrate an Serin und Threonin zu phosphorylieren. Die Voraussetzungen hierfür sind die Ausbildung eines stabilen Kinase-Substrat-Komplexes über die feste Bindung des Substrats an die Kinase und eine korrekte Konformation der Aktivierungsschleife innerhalb der Kinase. Bisher ist jedoch unklar, in welcher Sequenz- oder Strukturumgebung sich ein Serinsubstrat befinden muss, um durch die IGF-Kinase phosphoryliert zu werden.

Im folgendem sollte die Serinphosphorylierungsstelle innerhalb des Substrats GST-PTB₂₇₅ bestimmt werden, da dieses Substrat die deutlichste Serinphosphorylierung aufweist. Neben dem vorherrschenden Serinsignal wird Tyrosin nur marginal durch die IGF-Kinase phosphoryliert. Der C-Terminus weist eine Reihe von Serinresten auf, die alle als potenzielle Phosphorylierungsstellen für die IGF-Kinase in Frage kommen (Abbildung 5.17).

Messung quantifiziert.

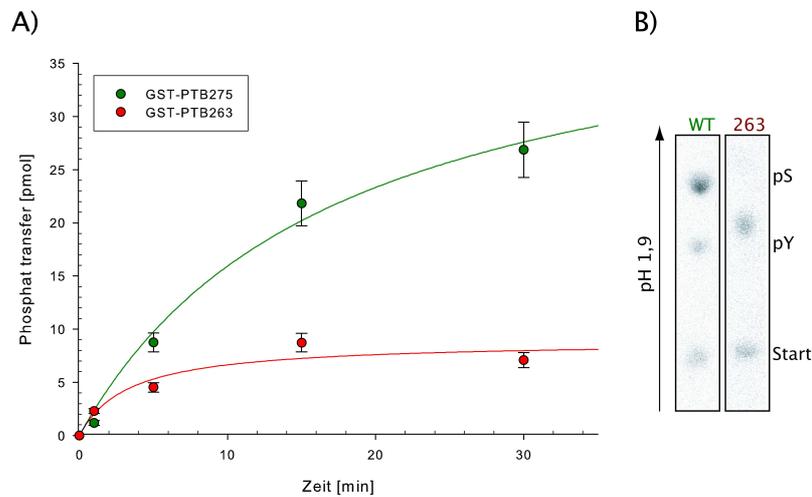


Abbildung 5.18.: Zeitabhängige Phosphorylierung von GST-PTB₂₆₃ durch GST-TS-IGF_{ΔC}

A) Aufgetragen ist der Phosphat Transfer in [pmol] gegen die Zeit in [min]. Die Phosphorylierung wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. Das C-terminal verkürzte Substrat (rot) wird im Vergleich zu GST-PTB₂₇₅ (grün) nur schwach phosphoryliert.

B) Auswertung der 1D-PASA. Das Substrat GST-PTB₂₆₃ wird nur an Tyrosin phosphoryliert (2D-Daten nicht gezeigt)

In Abbildung 5.18A) ist der Phosphat Transfer auf die beiden Substrate über einen Zeitraum bis 30 min gezeigt. Es ist zu sehen, dass das verkürzte Substrat durch die Kinase nur sehr schwach im Vergleich zur GST-PTB₂₇₅ phosphoryliert wird. Die Kinase überträgt nach 30 min ca. 28 pmol Phosphat auf das Substrat GST-PTB₂₇₅, während auf das kürzere Substrat GST-PTB₂₆₃ im gleichen Zeitraum nur 5 pmol Phosphat übertragen werden. Ein Vergleich der Phosphoaminosäuren (8.2.10.4) der Substrate nach 30 min zeigt, dass das verkürzte Substrat ausschließlich an Tyrosinresten phosphoryliert wurde, während das längere Substrat GST-PTB₂₇₅ überwiegend an Serinresten phosphoryliert wurde (Abbildung 5.18B). Dies spricht dafür, dass die Serinphosphorylierungsstelle für die IGF-Kinase C-terminal der Aminosäure Glutamat²⁶³ liegen muss.

5.4.2 Prinzip des Ala-Scans am Beispiel der Serinkinase Akt

Um Phosphorylierungsstellen innerhalb von Substraten zu lokalisieren, ist es üblich die möglichen Phosphorylaktzeptoren sukzessive zu substituieren. Substrate von Serinkinasen eignen sich hierfür sehr gut, da Serinkinasen sequenzspezifisch für die nähere Umgebung der Zielaminosäure sind. In den meisten Fällen von Serinkinasen reicht die Substitution

eines einzelnen Restes innerhalb der Zielsequenz aus, um einen Knock-Out zu erzeugen.

Am Beispiel der GST-PTB_{275 S270A} sollte das Prinzip des Ala-Scans für eine Serinkinase veranschaulicht und getestet werden. Als Modell für eine Serinkinase diente hierbei die Akt-Kinase. Schon die Substitution einer Aminosäure der Erkennungssequenz reicht aus, damit die Akt-Kinase ihre Substrate nicht mehr phosphorylieren kann.

Das Substrat GST-PTB_{275 S270A} wurde in unserer Arbeitsgruppe kloniert und charakterisiert, von mir in *E.coli* exprimiert (8.2.2) und über GSH-Affinitätschromatographie (8.2.3.1) bis zu einer Reinheit von 95% aufgereinigt.

Die GST-PTB_{275 S270A} wurde durch die GST-Akt_{Oca}-Kinase im direkten Vergleich zur Wildtyp PTB-Domäne GST-PTB₂₇₅ zeitabhängig phosphoryliert (Abbildung 5.19). In diesem Versuch wurden je 5 μ M Substrat durch 0,5 μ M GST-Akt_{Oca} phosphoryliert. Die Phosphorylierung wurde unter radioaktiven Standardbedingungen (8.2.10) durchgeführt. Zu den jeweiligen Zeitwerten wurden 30 μ l der Reaktion mit SDS-Probenpuffer abgestoppt, über SDS-PAGE (8.2.9.3) aufgetrennt und angefärbt (8.2.9.7). Die einzelnen Banden wurden ausgeschnitten und ihre Radioaktivität mittels Cerenkov-Messung quantifiziert.

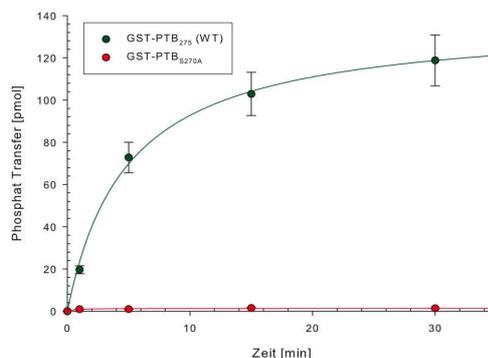


Abbildung 5.19.: Zeitabhängig Phosphorylierung von GST-PTB_{275 S270A} durch GST-Akt_{Oca}

Aufgetragen ist der Phosphat Transfer in [pmol] gegen die Zeit in [min]. Das Substrat mit der Substitution an Serin²⁷⁰ wird nicht mehr durch die Akt-Kinase phosphoryliert. Als Kontrolle ist wurde GST-PTB₂₇₅ durch die Akt Kinase phosphoryliert (grün)

Aus Abbildung 5.19 ist ersichtlich, dass die Akt-Kinase nicht mehr in der Lage ist das Substrat zu phosphorylieren, wenn das Serin²⁷⁰ durch Alanin substituiert wurde. In 30 min überträgt die Akt-Kinase auf das wildtypische Substrat etwa 120 pmol Phosphat. Auf die

Mutante GST-PTB_{275 S270A} konnte über den gesamten Zeitraum kein Phosphat Transfer gemessen werden. Dieses Beispiel veranschaulicht, dass durch ein Alanin-Scanning des C-Terminus der PTB-Domäne die Möglichkeit besteht, die Phosphorylierungsstelle der IGF-Kinase genau zu charakterisieren.

Um zu überprüfen, ob die Akt-Kinase grundsätzlich nur Serinreste innerhalb von Erkennungssequenzen phosphoryliert, wurde eine PTB-Mutante kloniert, in der das Serin²⁷⁰ durch ein Tyrosin substituiert wurde. GST-PTB_{S270Y} wurde von mir kloniert, in *E.coli* exprimiert, und über GSH-Affinitätschromatographie gereinigt.

Es wurden 5 µM GST-PTB_{S270Y} und 5 µM GST-PTB₂₇₅ durch 0,5 µM GST-Akt_{Oca} zeitabhängig unter radioaktiven Standardbedingungen phosphoryliert (8.2.10). Als Kontrolle wurden beide Substrate durch 1 µM GST-TS-IGF_{ΔC} phosphoryliert. Zu den jeweiligen Zeitwerten wurden 30 µl der Reaktion mit SDS-Probenpuffer abgestoppt, über SDS-PAGE (8.2.9.3) aufgetrennt und angefärbt (8.2.9.7). Die einzelnen Banden wurden ausgeschnitten und ihre Radioaktivität mittels Cerenkov-Messung quantifiziert.

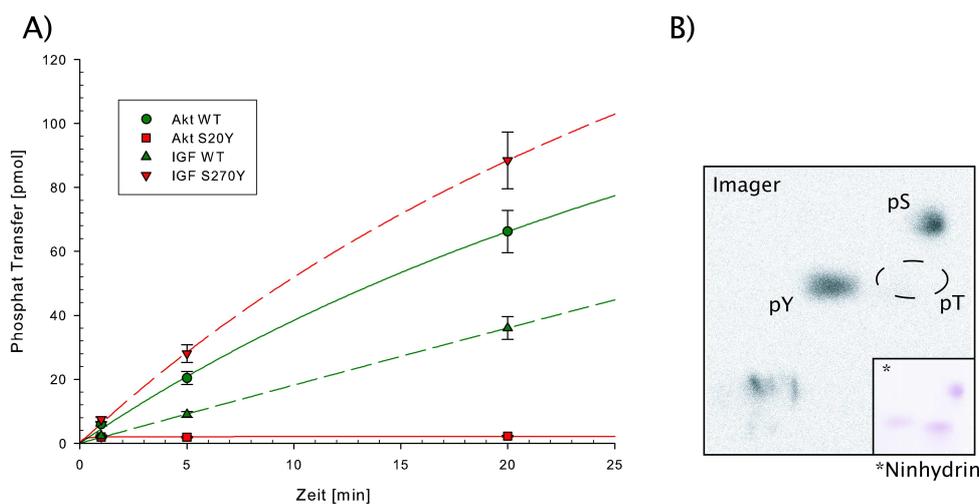


Abbildung 5.20.: Vergleichende zeitabhängige Phosphorylierung von GST-PTB_{S270Y} durch GST-TS-IGF_{ΔC} und GST-Akt_{Oca}

A) Kinetischer Verlauf der Reaktion. Aufgetragen ist der Phosphat Transfer in [pmol] gegen die Zeit in [min]. Farben: rot= GST-PTB_{S270Y}; grün= Wildtyp-PTB; Linien: durchgängige Linie= Akt-Kinase, gestrichelte Linie= IGF-Kinase. Das Substrat GST-PTB_{S270Y} wird durch die Akt Kinase nicht phosphoryliert. Die IGF-Kinase überträgt zu jedem Zeitpunkt etwa doppelt so viel Phosphat auf die Mutante wie auf die Wildtyp.
B) 2D-PASA der GST-PTB_{S270Y} phosphoryliert durch GST-TS-IGF_{ΔC} (Insert= Ninhydrin-Färbung). Die PTB-Mutante wird durch die IGF-Kinase neben Serin auch an Tyrosin phosphoryliert.

In Abbildung 5.20 A) ist zu sehen, dass die Substitution zur Folge hat, dass die PTB durch

die Akt-Kinase nicht mehr phosphoryliert wird. Auf die Mutante GST-PTB_{S270Y} konnte über den gesamten Zeitraum kein Phosphat Transfer gemessen werden. Jedoch kann sie durch die IGF-Kinase weiterhin phosphoryliert werden. Der Verlauf der IGF-Phosphorylierung von GST-PTB_{S270Y} ist dem des wildtypischen Substrats sehr ähnlich. Jedoch werden zu jedem Zeitpunkt etwa doppelt so viele Phosphate übertragen.

In der PASA des durch die IGF-Kinase phosphorylierten Substrats GST-PTB_{S270Y} ist zu sehen, dass auch in diesem Substrat starke Serinphosphorylierung neben Tyrosinphosphorylierung auftritt. Das Serinsignal liegt bei 50%.

Als Ergebnisse lassen sich festhalten, dass die Akt-Kinase ihre Substrate an spezifischen Serinresten innerhalb von Erkennungssequenzen phosphoryliert. Die Substitution eines Restes reicht aus, damit die Akt-Kinase Substrate nicht mehr phosphoryliert. Auch die Substitution durch einen anderen Phosphorylakzeptor wird durch die Akt-Kinase nicht toleriert.

5.4.3 Ermittlung der Serinphosphorylierungsstelle für die IGF-Kinase in GST-PTB₂₇₅ durch Alanin-Scanning

Das Ergebnis aus Kapitel 5.4.2 zeigt, dass bei einem Alanin-Scan meist die Substitution einer Aminosäure ausreicht, um einen Knock Out zu erzeugen. Das Prinzip wurde nun für die IGF-Kinase übernommen

In einem ersten Schritt wurde je ein einzelnes Serin aus dem C-terminalen Cluster durch Alanin substituiert. Dies führte zu den PTB Varianten GST-PTB_{S68A}, GST-PTB_{S70A}, GST-PTB_{S72A}, GST-PTB_{S73A}, GST-PTB_{S74A}. Alle PTB-Mutanten wurden von mir kloniert (8.1.2), in *E.coli* exprimiert (8.2.2) und jeweils über GSH-Affinitätschromatographie (8.2.3.1) bis zu einem Reinheitsgrad von 95% gereinigt. Als Beispiel ist die Reinigungsdokumentation der Mutante GST-PTB_{S74A} im Anhang in Abbildung 10.13 dargestellt.

Alle PTB-Mutanten wurden im direkten Vergleich zur wildtypischen PTB-Domäne durch die GST-TS-IGF_{ΔC} zeitabhängig phosphoryliert (Abbildung 5.21). In diesem Versuch wurden je 3 μM Substrat durch 1 μM Kinase unter radioaktiven Standardbedingungen (8.2.10) phosphoryliert. Zu den jeweiligen Zeitwerten wurden 30 μl der Reaktion mit SDS-Probenpuffer abgestoppt, über eine 12%ige SDS-PAGE (8.2.9.3) aufgetrennt und mit

kolloidalen Färbelösung angefärbt (8.2.9.7). Die einzelnen Banden wurden ausgeschnitten und ihre Radioaktivität mittels Cerenkov-Messung quantifiziert.

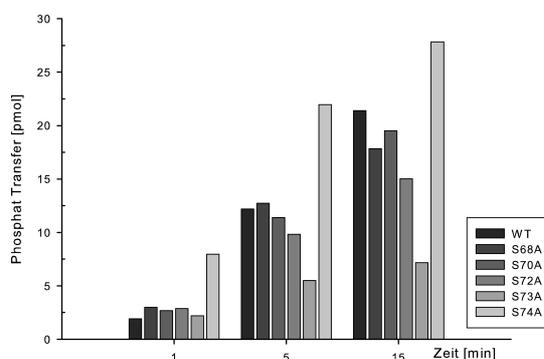


Abbildung 5.21.: Auswertung des Ala-Scans wenn je ein Serin des Clusters zu Alanin substituiert ist

Aufgetragen ist der Phosphat Transfer auf das jeweilige Substrat in [pmol] für drei Zeitwerte. Die Phosphorylierung erfolgte unter Standardbedingungen. Die Mutanten mit den Substitutionen an Serin²⁷⁰ und Serin²⁷³ werden deutlich schlechter phosphoryliert als der Wildtyp. Die Substitution an Serin²⁷⁴ wirkt sich positiv auf die Phosphorylierung durch die IGF-Kinase aus. Die Dokumentation der SDS-PAGE und des Imagerbildes, sowie die Auswertung der 1D-PASA sind im Anhang zu finden (Siehe Abbildung 10.20 und Abbildung 10.21)

In Abbildung 5.21 ist der Phosphat Transfer auf die einzelnen PTB-Mutanten durch die GST-TS-IGF_{ΔC} zu drei verschiedenen Zeitpunkten gezeigt. Die Mutante GST-PTB_{S73A} wird durch die Kinase nur noch gering phosphoryliert. Nach 15 min überträgt die Kinase nur 8 pmol Phosphat auf diese Mutante. Die Mutante GST-PTB_{S70A} wird ebenfalls geringer phosphoryliert als der Wildtyp. Nach 15 min werden auf die Mutante nur 12 pmol Phosphat übertragen. Die Mutante GST-PTB_{S74A} hebt sich sowohl von der Wildtyp-PTB als auch von allen anderen PTB-Mutanten ab. Zu allen Zeitpunkten wird diese Mutante deutlich besser phosphoryliert. Schon nach 5 min überträgt die Kinase auf die Mutante GST-PTB_{S74A} viermal mehr Phosphate als auf die Wildtyp-PTB. Nach 15 min wurden auf die Mutante GST-PTB_{S74A} 30 pmol Phosphat übertragen, auf die Wildtyp-PTB im selben Zeitraum etwa 25 pmol Phosphat.

Der Vergleich der Phosphoaminosäuren (8.2.10.4) nach 15 min der verschiedenen PTB-Mutanten ist in Tabelle 5.1 zusammengefasst. Die 1D-Phosphoaminosäureanalyse ist im Anhang in Abbildung 10.21 dargestellt.

Ergebnisse

Tabelle 5.1.: Prozentuale Phosphat-Verteilung auf die einzelnen Aminosäuren der untersuchten PTB Mutanten des ersten Alanin-Scans

	WT	S68A	S70A	S72A	S73A	S74A
Phosphotyrosin	20	20	20	20	<1	10
Phosphoserin	80	80	80	80	>99	90

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass alle PTB-Mutanten mit 80% überwiegend an Serinresten phosphoryliert werden. Hierbei verhalten sich die Mutanten GST-PTB_{S68A}, GST-PTB_{S70A} und GST-PTB_{S72A} wie der Wildtyp. Die Mutanten GST-PTB_{S73A} und GST-PTB_{S74A} werden sogar noch stärker an Serin phosphoryliert als der Wildtyp. In der Mutante GST-PTB_{S73A} war kaum Tyrosinphosphorylierung nachzuweisen, jedoch lag bei dieser Mutante auch der gesamte Phosphat Transfer unter dem des Wildtyps und der Mutante GST-PTB_{S74A} (vergleiche Abbildung 5.21)

Als Ergebnis lässt sich der der Alanin-Scan zusammenfassen, dass die Substitution jeweils nur eines Serins nicht zu einem *Knock Out* für die IGF-Kinase geführt hat. Jedoch werden die Mutanten, in denen die Serine 270 und 273 durch Alanin substituiert wurden, deutlich schlechter durch die IGF-Kinase phosphoryliert. Die PTB-Mutante in denen das C-terminale Serine²⁷⁴ substituiert wurde hebt sich sowohl in ihrem Phosphorylierungsverhalten, als auch in ihrer Phosphoaminosäurezusammensetzung vom Wildtyp und den anderen Mutanten ab. Die Substitution des Serins²⁷⁴ führt zu einer über alle Zeitwerte gemessenen Verbesserung der Phosphorylierung. Diese ist gerade im Initialbereich bis 5 min sehr deutlich gegenüber der Wildtyp-PTB-Domäne.

5.4.4 Vollständige Substitution des Serin-Clusters

Da der erste Alanin-Scan kein eindeutiges Ergebnis erbrachte, wurde nun versucht durch einen zweiten Alanin-Scan das Ergebnis zu präzisieren. In diesem Fall wurden durch Mutationen alle Serine bis auf ein einzelnes Serin des C-terminalen Clusters durch Alanin substituiert. Mit dieser Methode sollte die Serinphosphorylierungsstelle für die IGF-Kinase präzise bis auf eine Aminosäure bestimmt werden.

Dies führte zu den PTB Varianten GST-PTB_{S68}, GST-PTB_{S70}, GST-PTB_{S72}, GST-PTB_{S73} und GST-PTB_{S74}. Alle Mutanten verfügen jeweils nur noch um ein einzelnes Serinsubstrat im C-terminalen Cluster der PTB. Alle Anderen Serine wurden durch Alanin substituiert. Die

restlichen Aminosäuren wurden nicht verändert.

Alle PTB-Mutanten wurden von mir kloniert (8.1.3), in *E.coli* exprimiert (8.2.2) und jeweils über GSH-Affinitätschromatographie (8.2.3.1) bis zu einem Reinheitsgrad von 95% gereinigt.

Alle PTB-Mutanten wurden im Vergleich zur Wildtyp-PTB durch die GST-TS-IGF_{ΔC} zeitabhängig phosphoryliert (Abbildung 5.22). In diesem Versuch wurden, wie beim ersten Alanin-Scan aus Kapitel 5.4.3, je 3 μM Substrat durch 1 μM Kinase unter radioaktiven Standardbedingungen (8.2.10) phosphoryliert. Zu den jeweiligen Zeitwerten wurden 30 μl der Reaktion mit SDS-Probenpuffer abgestoppt, über SDS-PAGE (8.2.9.3) aufgetrennt und mit kolloidalen Färbelösungen angefärbt (8.2.9.7). Die einzelnen Banden wurden ausgeschnitten und ihre Radioaktivität mittels Cerenkov-Messung quantifiziert.

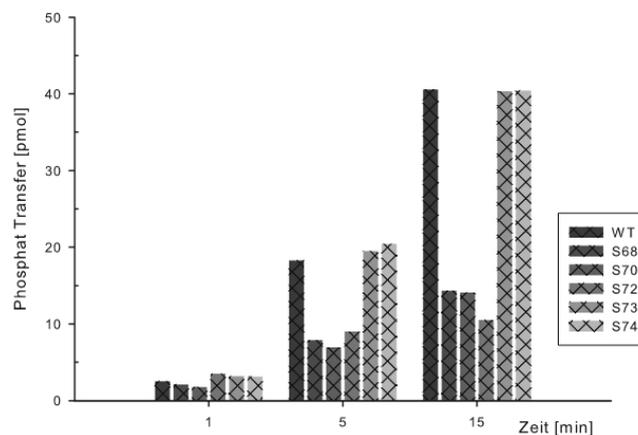


Abbildung 5.22.: Auswertung des zweiten Ala-Scans

Es wurden alle Serine bis auf je eine Ausnahme durch Alanin substituiert. Aufgetragen ist der Phosphat Transfer auf das jeweilige Substrat in [pmol] für drei Zeitwerte. Die Phosphorylierung erfolgte unter Standardbedingungen. Werden jeweils nur die Serine 268, 270 und 272 angeboten, so wirkt sich das negativ auf eine Phosphorylierung durch die IGF-Kinase aus. Werden nur die Serinen 273 und 274 angeboten, so ist die Phosphorylierung durch die IGF-Kinase vergleichbar mit dem Wildtyp. Diese PTB-Mutanten werden vergleichbar wie der Wildtyp phosphoryliert. Die Dokumentation der 1D-PASA ist im Anhang zu finden (Siehe Abbildung 10.22)

In Abbildung 5.22 ist der Phosphat Transfer durch die GST-TS-IGF_{ΔC} auf die verschiedenen Einzelserinmutanten der PTB zu drei verschiedenen Zeitpunkten im Vergleich zur Wildtyp PTB gezeigt. Es fällt auf, dass die beiden Mutanten GST-PTB_{S73} und GST-PTB_{S74} sich ähnlich verhalten wie der Wildtyp. Zu allen gemessenen Zeitpunkten

überträgt die GST-Kinase auf die PTB Varianten in etwa gleich viel Phosphat wie auf die Wildtyp-PTB. Die Einzelerinmutanten mit den Serinsubstraten 268, 270 und 272 hingegen werden deutlich schlechter durch die IGF-Kinase phosphoryliert als der Wildtyp. Nach 15 min wurden auf die drei Mutanten nur etwa ein viertel der Phosphate im direkten Vergleich zum Wildtyp übertragen.

Tabelle 5.2.: Prozentuale Phosphat-Verteilung auf die einzelnen Aminosäuren der untersuchten PTB Mutanten des zweiten Alanin-Scans

	WT	S68	S70	S72	S73	S74
Phosphotyrosin	20	40	20	10	<1	<1
Phosphoserin	80	60	80	90	>99	>99

In Tabelle 5.2 ist der Vergleich der Phosphoaminosäuren (8.2.10.4) nach 15 min für die verschiedenen PTB Mutanten gezeigt. Das Phosphoimage der PASA ist im Anhang in Abbildung 10.22 dargestellt. Es ist zu sehen, dass die Mutante GST-PTB_{S68} deutlich schlechter an Serinresten phosphoryliert wird als der Wildtyp. Die Mutanten GST-PTB_{S70} und GST-PTB_{S72} weisen in etwa das gleiche Phosphoaminosäurenverhältnis auf wie der Wildtyp. In den Mutanten GST-PTB_{S73} und GST-PTB_{S74} konnte fast kein Phosphotyrosin nachgewiesen werden. Der Phosphoserinanteil in diesen beiden Mutanten lag annähernd bei 100%.

Zusammenfassend konnte auch dieser Alanin-Scan keinen 100%igen *Knock Out* für die IGF-Kinase erzeugen. Jedoch sind die Serine 268, 270 und 272 schlechtere Substrate für die IGF-Kinase als die Serine 273 und 274. Werden nur noch die Serinsubstrate 273 oder 274 angeboten, so werden diese Reste sehr gut durch die IGF-Kinase phosphoryliert. Jedoch unterscheiden sich die PTB-Mutanten mit diesen Substitutionen in ihrer Spezifität deutlich vom Wildtyp. In diesen Mutanten konnte keine Tyrosinphosphorylierung mehr nachgewiesen werden.

5.4.5 Separation des Serinclusters

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die PTB-Domäne des humanen IRS-1 ein Substrat für die IGF-Kinase ist und dual neben Serinresten auch Tyrosinresten phosphoryliert werden. Durch die beiden Alanin-Scans konnte die Phosphorylierungsstelle für die IGF-Kinase auf zwei Serine in einem C-terminalen

Serincluster eingeschränkt werden. Aus den Ergebnissen der Alanin-Scans geht hervor, dass die IGF-Kinase ihre Substrate nicht nach einem sequenzspezifischen Mechanismus phosphoryliert. Fraglich war nun, ob sich diese Serine auch phosphoryliert werden, wenn sie in ihrer relativen Position im Substrat verschoben werden.

Hierzu wurde in zwei Schritten das Konstrukt His-PTB₂₆₃-SPEptid-rCys kloniert. In Abbildung 5.23 ist eine schematische Darstellung dieses Konstruktes gezeigt.

Die Klonierung erfolgte in zwei Schritten in den *E.coli* Expressionsvektor pet-NTHis-Tyrtide-TS-CTCys für kleine Peptide von Frau Wirtz aus unserer Arbeitsgruppe (Plasmidkarte im Anhang unter Abbildung 10.6, Seite 160).

Im ersten Schritt wurde das Serincluster der PTB hinter Tyrtide kloniert. Die Klonierung ist im Methodenteil in Kapitel 8.1.4 beschrieben. Tyrtide dient in diesem Vektor als Schüttelprotein zur Expression von kleineren Peptiden in *E.coli*. Dies führte zu dem Konstrukt His-Tyrtide-SPEptid-rCys (Abbildung 5.23A). Dieses Protein entstand als Zwischenprodukt der Klonierung. Jedoch konnte mit diesem Protein noch einmal unterstrichen werden, dass die Bindung des Substrats an die Kinase das entscheidende Merkmal dualer Kinaseaktivität der IGF-Kinase ist.

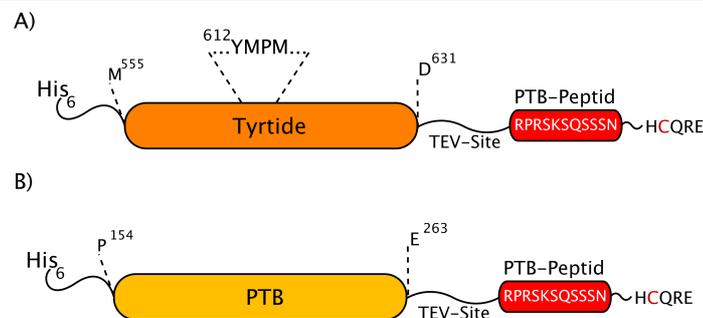


Abbildung 5.23.: Schematische Darstellung des Substrats His-Tyrtide-SPEptid-rCys (A) und His-PTB₂₆₃-SPEptid-rCys (B).

A) Das Substrat His-Tyrtide-SPEptid-rCys entspricht einem Teil der p30 Region des humanen IRS-1 mit einer Tyrosinphosphorylierungsstelle innerhalb eines YMxM-Motivs sowie dem C-terminalen Serin-Cluster der PTB-Domäne. Das Konstrukt zeichnet sich durch einen N-terminalen His-Tag, einer TEV-Proteaseschnittstelle zwischen den beiden IRS-1-Motiven sowie einem C-terminalen reaktiven Cysteins aus.
 B) Das Substrat His-PTB₂₆₃-SPEptid-rCys entspricht der PTB-Domäne des humanen IRS-1 von Aminosäure Prolin¹⁵⁸ bis Glutamat²⁶³ sowie dem C-terminalen Serin-Cluster der PTB-Domäne. Der weitere Aufbau entspricht dem Vorläuferkonstrukt His-Tyrtide-SPEptid-rCys

Im zweiten Schritt wurde Tyrtide aus dem Vektor ausgeschnitten und durch die humane PTB-Domäne von Aminosäure Prolin¹⁵⁸ bis Glutamat²⁶³ ersetzt. Dies führte zu dem

Konstrukt His-PTB₂₆₃-S₁Peptid-rCys. Die Klonierung ist in Kapitel 8.1.5 im Methodenteil beschrieben.

Zwischen der PTB und dem Serincluster in diesem Expressionsvektor liegt eine Schnittstelle für die TEV-Protease (ENLYFQG) (Abbildung 5.23 B). Somit sollte sich nach der Phosphorylierung durch die IGF-Kinase das Peptid von der PTB separieren und massenspektroskopisch vermessen lassen.

Beide Proteine wurden von mir kloniert, in *E.coli* exprimiert (8.2.2), und über Nickel-Chelat Affinitätschromatographie (8.2.3.2) bis zu einem Reinheitsgrad von 90% gereinigt. Die Reinigungsdokumentation für His-Tyrtide-S₁Peptid-rCys ist im Anhang in Abbildung 10.18 die Reinigungsdokumentation für His-PTB₂₆₃-S₁Peptid-rCys in Abbildung 10.19 dargestellt.

5.4.6 Das Serincluster der PTB ist kein Substrat für die IGF-Kinase, wenn es nicht mit dieser interagieren kann

Um zu bestätigen, dass für eine duale Substratphosphorylierung die Komplexbildung essenziell ist, wurde das Fusionsprotein aus Tyrtide und Serincluster durch die IGF-Kinase phosphoryliert. Tyrtide selbst bildet keinen Komplex mit der IGF-Kinase und wird lediglich an Tyrosinresten phosphoryliert. Als Kontrolle wurde das Protein auch durch die Akt-Kinase phosphoryliert (Abbildung 5.23A).

Es wurden 20 μ M Substrat durch 0,5 μ M GST-TS-IGF _{Δ C} bzw. 0,5 μ M GST-Akt_{Oca} phosphoryliert. Die Phosphorylierung wurde unter radioaktiven Standardbedingungen (8.2.10) durchgeführt. Zu den jeweiligen Zeitwerten wurden 30 μ l der Reaktion mit nativem-Probenpuffer abgestoppt, über eine native-PAGE (8.2.9.5) aufgetrennt und mit kolloidaler Färbelösung angefärbt (8.2.9.7). Die einzelnen Banden wurden ausgeschnitten und ihre Radioaktivität mittels Cerenkov-Messung quantifiziert.

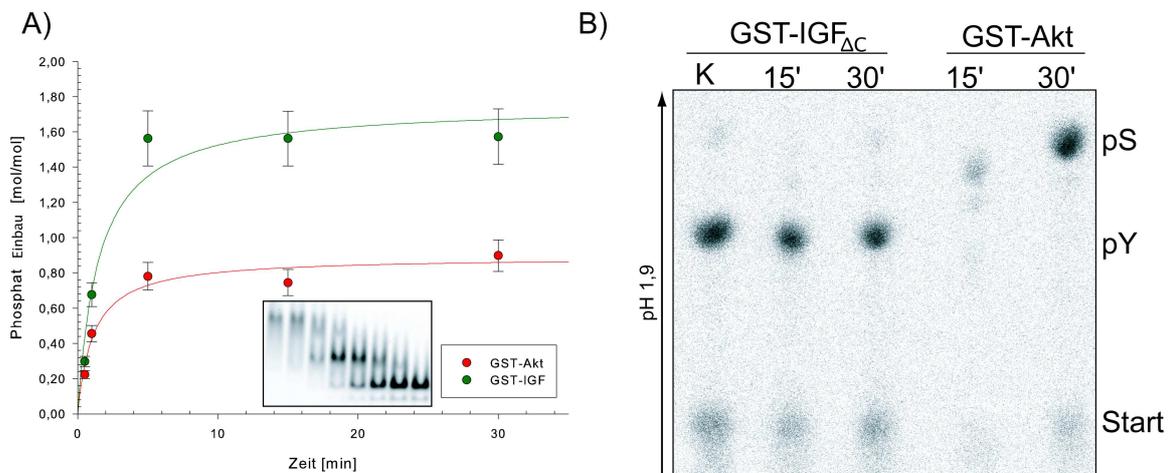


Abbildung 5.24.: Zeitabhängige Phosphorylierung von His-Tyrtide-SPEptid-rCys durch GST-TS-IGF $_{\Delta C}$ und GST-Akt $_{Oca}$.

A) Aufgetragen ist der Phosphat Transfer in [pmol] gegen die Zeit in [min]. Als Insert ist die native PAGE der IGF-Phosphorylierung gezeigt. Die Phosphorylierung wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. Das Substrat wird von beiden Kinasen phosphoryliert. Die Akt Kinase überträgt ca. 1 mol/mol (rot), die IGF-Kinase etwa 2 mol/mol (grün).

B) Auswertung der 1D-PASA. Das Substrat wird durch die IGF-Kinase nur an Tyrosin phosphoryliert, durch die Akt-Kinase ausschließlich an Serin (2D-Daten nicht gezeigt)

In Abbildung 5.24A) ist die zeitabhängige Phosphorylierung des Substrats His-Tyrtide-SPEptid-rCys durch die Kinasen GST-TS-IGF $_{\Delta C}$ (grün) und GST-Akt $_{Oca}$ (rot) gezeigt. Als Insert ist die native PAGE der Phosphorylierung durch die IGF-Kinase gezeigt. Die IGF-Kinase überträgt nach 5 min ein Maximum von annähernd 2 mol Phosphat pro mol Substrat. Dies entspricht der theoretisch vollständigen Phosphorylierung des Tyrosinsubstrates innerhalb des YMxM-Motivs sowie der Phosphorylierung des Tyrosins innerhalb der TEV-Proteaseschnittstelle (siehe Kapitel 5.1). Auch die PAGE bestätigt dieses Ergebnis. Das Substrat schieft in zwei Stufen. Während die ersten Zeitwerte nur eine Phosphorylierungsstufe aufweisen, ist das Substrat nach 32min vollständig phosphoryliert. Die Akt-Kinase zeigt ihr Maximum ebenfalls bei 5 min mit einem Phosphat Transfer von etwa 1 mol Phosphat pro mol Substrat. Dies entspricht der theoretisch vollständigen Phosphorylierung des Serins²⁷⁰ innerhalb des Clusters (siehe Kapitel 5.4.2).

Der Vergleich der Phosphoaminosäuren (8.2.10.4) des Substrats zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (Abbildung 5.24 B) zeigt bei der Phosphorylierung durch die IGF-Kinase ausschließlich Phosphotyrosin. Die IGF-Kinase ist nicht in der Lage, das Serincluster zu phosphorylieren, wenn das Substrat nicht die Bindungseigenschaften der PTB-Domäne

aufweist. Bei einer Phosphorylierung durch die Akt-Kinase wird das Substrat ausschließlich an Serinresten phosphoryliert. Hier hat die Klonierung hinter ein nicht interagierendes Protein keine Auswirkungen auf die Transferaseaktivität der Kinase.

5.4.7 Das Serincluster wird nicht durch die IGF-Kinase phosphoryliert, wenn es in seiner relativen Position innerhalb der PTB-Domäne verschoben wird

Im Konstrukt His-PTB₂₆₃-SPEptid-rCys ist das Serincluster C-terminal zur PTB-Domäne durch einen Linker verschoben. Somit ist fraglich ob es auch durch die IGF-Kinase zur Serinphosphorylierung dieses Substrats kommt.

Die zeitabhängige Phosphorylierung erfolgte unter radioaktiven Standardbedingungen. 10 µM His-PTB₂₆₃-SPEptid-rCys wurden durch 1 µM GST-TS-IGF_{ΔC} bzw. 0,5 µM GST-Akt_{Oca} Kinase phosphoryliert. (8.2.10). Zu den jeweiligen Zeitwerten wurden 30 µl der Reaktion mit SDS-Probenpuffer abgestoppt, über eine 15%ige SDS-PAGE (8.2.9.3) aufgetrennt und angefärbt (8.2.9.7). Die einzelnen Banden wurden ausgeschnitten und ihre Radioaktivität mittels Cerenkov-Messung quantifiziert.

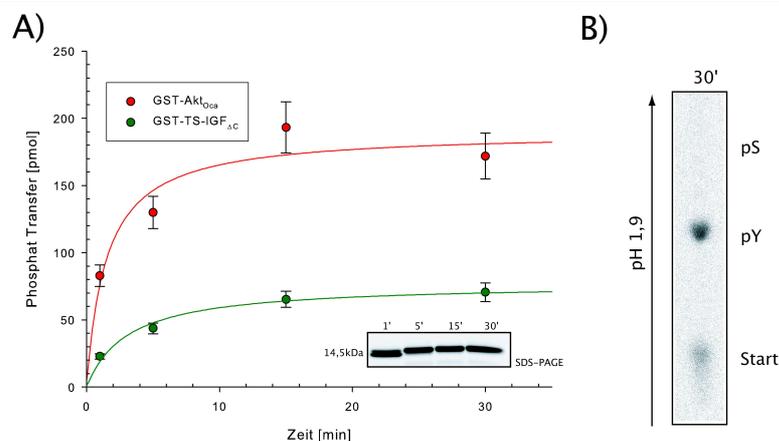


Abbildung 5.25.: Zeitabhängige Phosphorylierung von His-PTB₂₆₃-SPEptid-rCys durch GST-TS-IGF_{ΔC} (grün) und GST-Akt_{Oca}

A) Aufgetragen ist der Phosphat Transfer gegen die Zeit. Als Insert ist die SDS-PAGE der Phosphorylierung durch die Akt-Kinase gezeigt. Die Phosphorylierung wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. Das Substrat wird von beiden Kinasen phosphoryliert. Die Akt Kinase (rot) überträgt ca. 180 pmol Phosphat, die IGF-Kinase (grün) etwa 50 pmol auf das Substrat.

B) Auswertung der 1D-PAGE. Das Substrat wird durch die IGF-Kinase nur an Tyrosin phosphoryliert.

In Abbildung 5.25 A) ist der Phosphat Transfer auf das Konstrukt His-PTB₂₆₃-SPEptid-rCys durch die Kinasen GST-TS-IGF_{ΔC} (grün) und GST-Akt_{Oca} (rot) gezeigt. Als Insert ist die

SDS-PAGE der Phosphorylierung des Substrats durch die GST-Akt_{Oca} hervorgehoben.

Die IGF-Kinase überträgt nach 15 min ein Maximum von ca. 50 pmol Phosphat auf das Substrat. Dies entspricht einer Phosphorylierung von 0,16 pmol Phosphat pro pmol Substrat. Die Akt-Kinase überträgt im gleichen Zeitraum etwa 200 pmol Phosphat. Dies entspricht etwa 0,7 mol Phosphat pro mol Substrat.

Der Vergleich der Phosphoaminosäuren (8.2.10.4) des durch die IGF-Kinase phosphorylierten Substrats zeigt lediglich Phosphotyrosin. Das Substrat His-PTB₂₆₃-S₁Peptid-rCys verfügt zwar über die bindende PTB-Domäne, sowie über das Serincluster, wird aber nicht dual durch die IGF-Kinase an Serinresten und Tyrosinresten phosphoryliert. Gründe hierfür werden in der Diskussion erläutert.

5.4.8 Massenspektroskopische Analyse der phosphorylierten GST-PTB₂₇₅

Um das Ergebnis der beiden Alanin-Scans zu bestätigen, sollte das C-terminale Serincluster massenspektroskopisch untersucht werden. Die Analyse erfolgte durch das ZMMK-Service-Labor der Universität zu Köln (Abbildung 5.26).

Zunächst wurde das Substrat GST-PTB₂₇₅ durch GST-IGF_{ΔC} zeitabhängig unter Standardbedingungen phosphoryliert. Nach 30 min wurde die Reaktion durch SDS-Probenpuffer abgestoppt, die Probe bei 95°C denaturiert und der Ansatz über eine SDS-PAGE (8.2.9.3) aufgetrennt. Nach anfärben mit kolloidaler Färbelösung (8.2.9.7) wurde die PTB-Bande isoliert und dem Labor übersandt. Die Gelextraktion erfolgte durch das ZMMK. Das Protein wurde durch die Proteasen Trypsin und V8-Protease aus dem Gel extrahiert. Anschließend wurde der Verdau über eine C₁₈-Säule entsalzt, über eine Titandioxidsäule angereichert (TiO₂) und über eine LC-MS-MS-Analyse vermessen.

Zur internen Kontrolle wurde ein gleichwertiger Ansatz unter radioaktiven Standardbedingungen (8.2.10) phosphoryliert, mit SDS-Probenpuffer abgestoppt, über SDS-PAGE (8.2.9.3) aufgetrennt und die PTB-Bande isoliert. Die PTB wurde durch tryptische Elution aus dem Gel extrahiert, lyophilisiert, und anschließend durch saure Hydrolyse mit 6 N HCl für 2 h bei 110°C hydrolysiert (8.2.10.4). Die anschließende Phosphoaminosäureanalyse bestätigte einen Serinphosphatgehalt von über 80% in der Probe (nicht gezeigt).

Ergebnisse

In Abbildung 5.26 ist das Ergebnis des ZMMK-Service-Labors dargestellt. Die Analyse der einzelnen Fragmente zeigt, dass das Protein GST-PTB₂₇₅ vollständig ist, und aus 345 Aminosäuren besteht. Das Serincluster in einem 20 Aminosäurepeptid konnte allerdings nur zu 1,5% isoliert werden. Ein Peptid, das nur den letzten 8 Aminosäuren entspricht, konnte nicht aufgelöst werden.

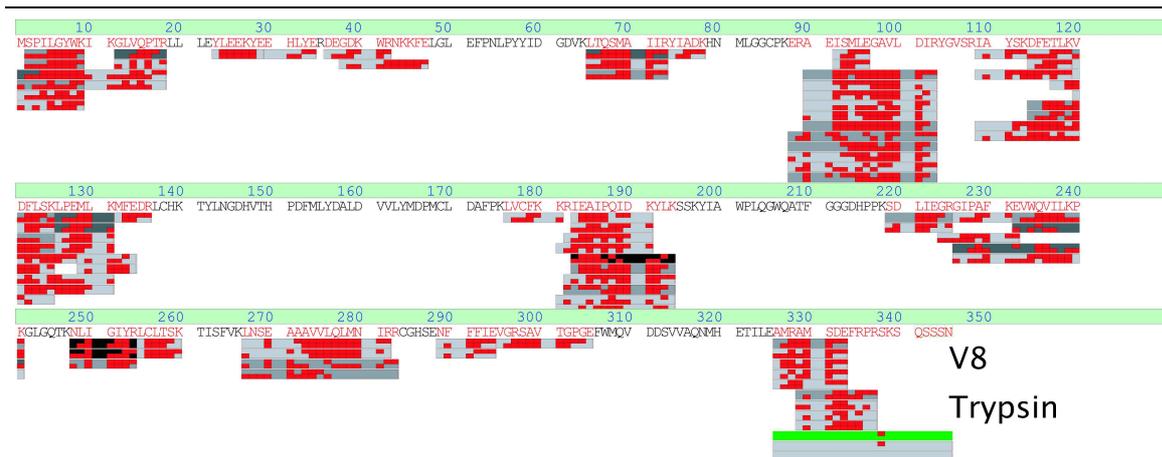


Abbildung 5.26.: Auswertung der Phosphoaminosäureanalyse durch das ZMMK-Service-Zentrum Köln

Das Protein wurde durch die Proteasen Trypsin und V8 aus dem Gel isoliert, und anschließend über LC-MS-MS analysiert. Die Balken entsprechen jeweils einem zugewiesenen Peak aus der LC-MS, die roten Markierungen, der Übereinstimmungen einer einzelnen Aminosäure aus der anschließenden MS-Analyse der einzelnen LC-Peaks

Die Analyse ergab, dass drei verschiedene Isoformen des Clusters vorliegen in denen Serinen 272, 273 und 274 phosphoryliert sind. Die MS-Analyse der drei Isoformen, zeigt jedoch nur zwei Übereinstimmungen von einzelnen Aminosäuren. Das gesamte Signal des Clusters ist zu schwach, um genauere Aussagen zu treffen.

5.4.9 Bromcyan Verdau (BrCN) der phosphorylierten GST-PTB₂₇₅

Da die Analyse durch das ZMMK zu keinem Ergebnis führte, wurde ein anderer Weg der Bestimmung der Phosphorylierungsstelle beschritten. Hierzu wurde sich der Technik des Bromcyan Verdaus (BrCN) bedient. Bromcyan spaltet die Aminosäurekette des Proteins stets auf der carboxyl-terminalen Seite des Methionins, das anschließend in ein C-terminales Homoserinlacton umgewandelt wird. Da Bromcyan spezifisch hinter Methionin spaltet, kann aus der Anzahl der im Protein enthaltenen Methionine die Anzahl der Fragmente vorausgesagt werden (siehe Tabelle 5.3).

Tabelle 5.3.: Übersicht der Peptide die durch einen BrCN-Verdau von GST-PTB₂₇₅ erwartet werden.

Gezeigt sind die jeweilige erwartete Masse und die Sequenz

Position	Masse [Da]	Sequenz
1-1	102.0549 118.0499	M
2-69	8185.2428 8201.2377	SPILGYWKIKGLVQPTRLLL EYLEEKYEHLHYERDEGDKW RNKKFELGLEFPNLPYYIDG DVKLTQSM
70-81	1396.7695 1412.7644	AIIRYIADKHNM
82-94	1342.6783 1413.7154 1358.6732	LGGCPKERAEISM
95-129	3955.1214 3971.1163	LEGAVLDIRYGVSRIAYSKD FETLKVDFLSKLPDM
130-132	343.2340 359.2289	LKM
133-154	2627.2095 2698.2467 2643.2044	FEDRLCHKTYLNGDHVTHPD FM
155-165	1266.6616 1282.6565	LYDALDVVLYM
166-168	314.1346 330.1296	DPM
169-279	12319.7507 12532.8621 12335.7457	CLDAFPKLVCFKKRIEAIPO IDKYLKSSKYIAWPLQGWQA TFGGGDHPPKSDLIEGRGIP APKEVMQVILPKKGLGQTKN LIGIYRLCLTSKTIISFVKLN SEAAAVVLQLM
280-308	3295.5853 3366.6225 3311.5803	NIRRCGHSENFVIEVGRSA VTGPGEFWM
309-319	1157.5433 1173.5382	QVDDSVVAQNM
320-327	895.4519 911.4469	HETILEAM
328-330	329.1932 345.1881	RAM
331-345	1711.7994	SDEFPRRSKKSQSSSN

In diesem Versuch, wurde die denaturierte und über eine SDS-PAGE gereinigte PTB durch BrCN aus dem Gel eluiert. Die Methode des BrCN-Verdau in den Methoden in Kapitel 8.2.11 beschrieben. 20 µg GS-PTB₂₇₅ wurden durch 8 µg GST-TS-IGF_{ΔC} bzw. 0,4 µg GST-Akt_{Oca} für 30 min unter radioaktiven Standardbedingungen (8.2.10) phosphoryliert. Anschließend wurden die Ansätze durch SDS-Probenpuffer gestoppt und über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Die PTB Bande wurde nach anfärben aus dem Gel isoliert, die Cerenkov-Strahlung vermessen und mehrfach mit MQ gewaschen. Die Peptide wurden durch die in Kapitel 8.2.11 beschriebene Methode aus dem Gel eluiert. Das Lyophilisat wurde in 30 µl Tris-Puffer pH 11 resuspendiert. 15 µl wurden auf einer Schägger-PAGE (8.2.9.4) aufgetragen und weiter analysiert. Die restlichen 15 µl wurden über eine *Reversed Phase* HPLC (8.2.3.7) analysiert. Die Schägger-PAGE wurde mit kolloidaler Färbelösung angefärbt und zudem über den Phosphoimager dokumentiert (Abbildung 5.27A). Die Eluate der *Reversed Phase* HPLC wurden einzeln gesammelt und die Radioaktivität über den Cerenkov-Zähler vermessen (Abbildung 5.27B). Zur besseren Dokumentation wird im folgenden die durch die GST-TS-IGF_{ΔC} phosphorylierte PTB-Domäne, „PTB_{IGF}“ genannt, die durch die GST-Akt_{Oca} phosphorylierte entsprechend

„PTB_{Akt}“.

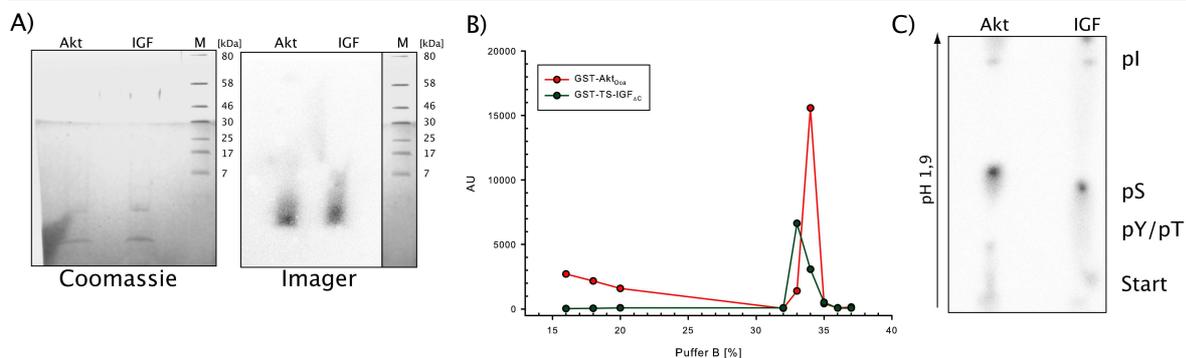


Abbildung 5.27.: BrCN Verdau der durch GST-Akt_{oca} und GST-TS-IGF_{ΔC} radioaktiv phosphorylierten GST-PTB₂₇₅.

A) Schägger-PAGE nach dem Verdau. Links: Coomassie gefärbtes Gel; Rechts: Imager Bild. Der Marker wurde auf das Imager Bild übertragen. Sowohl die IGF-Kinase als auch die Akt-Kinase phosphorylieren nur ein Peptid, welches kleiner als 7 kDa ist.

B) Reversed Phase Elutionsprofil der phosphorylierten PTB-Domäne. Die radioaktiven Peptide aus der Igf und Akt-Phosphorylierung eluieren beim gleichen Gehalt von Puffer B.

C) PASA der durch Reversed Phase eluierten Peptide. Das Peptid ist sowohl durch die Akt-Kinase, als auch durch die IGF-Kinase ausschließlich an Serin phosphoryliert.

In Abbildung 5.27A) ist die Coomassie gefärbte Schägger-PAGE, und das Phosphoimage gezeigt. Es ist zu sehen, dass durch den BrCN-Verdau der PTB_{Akt} und die PTB_{IGF} das gleiche Peptidschema entsteht. Der BrCN Verdau nicht durch die unterschiedliche Phosphorylierung beeinflusst. Im Phosphoimage ist zu sehen, dass in beiden Fällen nur eine Bande radioaktiv markiert ist. Das radioaktive Peptid der PTB_{Akt} läuft in der PAGE auf der gleichen Höhe wie das Peptid der PTB_{IGF} und ist deutlich kleiner als 7 kDa.

In Abbildung 5.27B) ist das Elutionsprofil der Reversed Phase HPLC für die PTB_{Akt} (rot) und PTB_{IGF} (grün) gezeigt. Es ist zu sehen, dass auch hier die PTB_{Akt} und PTB_{IGF} das gleiche Elutionsprofil zeigen. Nur ein Peptid bei ca. 32% Puffer B ist radioaktiv markiert.

Die PASA (8.2.10.4) der durch die Reversed Phase gereinigten Peptide zeigt, dass das Peptid der PTB_{IGF} nur Phosphoserin enthält. Als Kontrolle ist auch die PASA des Peptids der PTB_{Akt} aufgetragen.

Der Versuch zeigt, dass die IGF-Kinase ein oder mehrere Serinreste innerhalb der Sequenz NT-SDEFPRRSKSQSSSN-CT (Vergleiche Tabelle 5.3) phosphoryliert. Dies wird aus dem direkten Vergleich der durch die Akt-Kinase phosphorylierten PTB-Domäne deutlich. Der Versuch wurde unter nicht radioaktiven Bedingungen wiederholt und die Eluate der

Reversed Phase dem ZMMK-Service Labor übersandt. Jedoch konnte auch hier kein Ergebnis erzielt werden.

5.5 Auswirkungen der Proteinkomplexbildung auf nachgeschaltete Effektorinasen

Alle vorangegangenen Versuche wurden in vitro mit rekombinanten Proteinen durchgeführt. In vitro Kinase-Assays wurden benutzt, um die spezifischen Bedingungen der Substratphosphorylierung heraus zu arbeiten. Hierbei wurde deutlich, dass die Komplexbildung zwischen Kinase und Substrat eine zentrale Bedeutung für die duale Kinaseaktivität hat. Fraglich ist, wie sich Signalkomplexe auf nachgeschaltete Kinasen innerhalb des IGF-Signalweges auswirken (siehe Kapitel 3.6.1 in der Einleitung). Als Modell-Kinase, welche innerhalb des IGF-Signalweges für die Serinphosphorylierung von IRS-1 verantwortlich gemacht wird, wurde die Serinkinase GST-Akt_{Oca} verwendet.

Um den Phosphat Transfer der Akt-Kinase eindeutig zu identifizieren, wurde als Komplexbildner für die PTB-Domäne mit einer IGF-Kinase Mutante gearbeitet, in der das katalytische Aspartat zu Alanin substituiert worden ist (GST-IGF_{D→A}, vergleiche Kapitel 5.5.1). Die Kinase wurde durch monomere IGF-Kinase für 30 min phosphoryliert und über Gluthation-Sepharose Affinitätschromatographie (8.2.3.1) von ATP und der aktiven Kinase gereinigt. Ein Kinaseaktivitätstest der Aufreinigung mit einem artifiziellen Substrat zeigte keinen Phosphat Transfer (nicht gezeigt). Somit konnte gewährleistet werden, dass in den folgenden Versuchen der gemessene Phosphat Transfer auf das PTB-Substrat ausschließlich durch die Serinkinase GST-Akt_{Oca} stammt.

Ogihara et al. diskutierten, dass Proteine der 14-3-3 Familie mit einer Ablösung der PTB-Domäne vom Rezeptor in Verbindung stehen^[157]. Hierzu wäre ein Übergang von einem Kinase-IRS-1 Komplex in einen IRS-1-14-3-3-Komplex nötig. Hieraus lässt sich schließen, dass IRS-1 in der Zelle nie frei vorliegt und sich immer in einem Proteinkomplex befindet.

*Proteine der 14-3-3 Familie sind kleine, bis zu 30 kDa große, saure Proteine, welche in der Lage sind Homo- oder Heterodimere zu bilden und ubiquitär exprimiert werden. Die Bedeutung von 14-3-3 wurde in Experimenten mit *S.cerevisiae* illustriert, indem der Doppelknockout der beiden 14-3-3 Gene in einem lethalen Phänotyp resultierte^[164]. Zudem konnte gezeigt werden, dass 14-3-3 Genknockouts durch 14-3-3 Gene anderer*

Organismen kompensiert werden können^[165].

14-3-3 bindet seine Substrate an Phosphoserinen und steuert so verschiedene Signalwege in der Zelle. Durch ein Screening von Peptid-Bibliotheken wurden zwei Phosphopeptidmotive gefunden, an die alle bisher gefundenen 14-3-3 Isoformen binden. Diese beiden Motive sind $RSxpSxP$ und $RxxpSxP$, wobei das Phosphoserin durch Phosphothreonin ersetzt werden kann^[166]. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass 14-3-3 γ auch an unphosphorylierte Serine bindet. Die Wirkungsweise von 14-3-3 Proteinen zeigt sich in der Maskierung von sequenzspezifischen Bindemotiven, was sterische und strukturelle Konsequenzen hat. 14-3-3 kann zudem als Scaffold-Protein für andere Proteine agieren. So könnte z.B. eine Kinase an das erste 14-3-3-Monomer und das Kinasesubstrat an das zweite Monomer binden und so in räumliche Nähe gebracht werden. Als Beispiel hierfür gilt die Glykogen Synthase Kinase β ($GSK-3\beta$)^[167]. Kinase und Substrat können durch 14-3-3 kopräzipitiert werden. Weiterhin führt 14-3-3 zu einer verstärkten Phosphorylierung des Substrats Tau durch $GSK-3\beta$. Verschiedene 14-3-3 Isoformen (β , ϵ , γ und ζ) interagieren mit IRS-1. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass 14-3-3 γ sowohl mit dem Insulinrezeptor, dem IGF-1-Rezeptor und IRS-1 interagiert^[168]. Bindemotive für 14-3-3 finden sich innerhalb der PTB Domäne, in ihrer Nähe und zum Teil auch in der Nähe von YXXM Motiven innerhalb von IRS-1. So ist die Möglichkeit gegeben, dass 14-3-3 die Interaktion von IRS-1 mit dem IGF-1-Rezeptor der PI3-Kinase oder weiteren Kinasen oder Interaktionspartnern beeinflusst^[169,157]. In Kapitel 5.5.2 sollte untersucht werden, in wie weit die Akt-Kinase das PTB-Substrat phosphorylieren kann, wenn 14-3-3 zusätzlich im Phosphorylierungsansatz vorliegt. Hierzu wurde GST-14-3-3 γ verwendet.

Das Protein GST-14-3-3 γ wurde in unserer Arbeitsgruppe kloniert, von mir in *E.coli* exprimiert (8.2.2) und über Gluthation-Sepharose Affinitätschromatographie (8.2.3.1) bis zu einer Reinheit von 99% gereinigt. Die Reinigungsdokumentation über eine SDS-PAGE ist im Anhang in Abbildung 10.12 dargestellt.

Die folgenden Versuche wurde mit GST-PTB₃₇₀ durchgeführt (siehe schematische Darstellung in Abbildung 5.10). Dieses Substrat besitzt zwei Serine in Erkennungssequenzen für die Akt-Kinase.

5.5.1 Phosphorylierung von GST-PTB₃₇₀ durch die Akt-Kinase in Anwesenheit von GST-IGF_{D→A}

Im ersten Teil sollte untersucht werden welche Auswirkung die Anwesenheit von phosphorylierter IGF-Kinase im Ansatz auf die Phosphorylierung von GST-PTB₃₇₀ durch die Akt-Kinase hat. Hierzu wurde die oben beschriebene phosphorylierte IGF-Mutante GST-IGF_{D→A} verwendet, die selber katalytisch inaktiv ist.

10 μM der phosphorylierten Kinase GST-IGF_{D→A} wurden für 10 min mit 5 μM GST-PTB₃₇₀ auf Eis vorinkubiert und anschließend auf Raumtemperatur retemperiert. Als Vergleich wurde ein Ansatz ohne Zugabe von katalytisch inaktiver IGF-Kinase unter gleichen Bedingungen durchgeführt.

Anschließend wurde das Substrat durch 0,5 μM GST-Akt_{Oca} zeitabhängig unter radioaktiven Standardbedingungen phosphoryliert (8.2.10). Zu den jeweiligen Zeitwerten wurden 30 μl der Reaktion mit SDS-Probenpuffer abgestoppt, über SDS-PAGE (8.2.9.3) aufgetrennt und angefärbt (8.2.9.7). Die einzelnen Banden wurden ausgeschnitten und ihre Radioaktivität mittels Cerenkov-Messung quantifiziert.

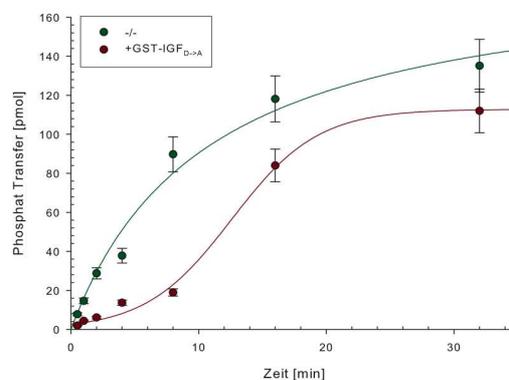


Abbildung 5.28.: Zeitabhängige Phosphorylierung des Substrats GST-PTB₃₇₀ durch GST-Akt_{Oca} ± GST-IGF_{D→A}.

Aufgetragen ist der Phosphat Transfer in [pmol] gegen die Zeit in [min]. Das Substrat wird durch die Akt-Kinase in Anwesenheit von GST-IGF_{D→A} (grün) bis etwa 8 min um den Faktor 5 schlechter phosphoryliert. Nach 8 min sinkt die Konkurrenz durch GST-IGF_{D→A} und GST-PTB₃₇₀ wird vergleichbar phosphoryliert wie ohne Zugabe von GST-IGF_{D→A} (rot)

In Abbildung 5.28 ist der Phosphat Transfer auf das Substrat GST-PTB₃₇₀ durch die GST-Akt_{Oca} gezeigt. In grün, der Kontrollansatz ohne Zugabe von katalytisch inaktiver IGF-Kinase, in rot in Anwesenheit von 10 μM GST-IGF_{D→A}. Die Akt-Kinase überträgt

unter Standardbedingungen nach 32 min etwa 140 pmol Phosphat auf das Substrat. Ist im Ansatz zusätzlich katalytisch inaktive IGF-Kinase vorhanden, so ändert sich der gesamte Kurvenverlauf von einer Sättigungskurve in einen sigmoidalen Verlauf. Die Akt-Kinase ist für einen Zeitraum bis 8 min stark gehemmt. Nach 8 min ist die Hemmung hingegen nicht mehr zu beobachten, und das Substrat wird deutlich schneller phosphoryliert. Auch wenn katalytisch inaktive IGF-Kinase im Ansatz ist, phosphoryliert die Akt-Kinase nach 30 min das Substrat mit bis zu 120 pmol Phosphat. Ein Phosphat Transfer auf die GST-IGF_{D→A} fand nicht statt (nicht gezeigt).

Um zu überprüfen, ob die zeitliche Retention der Akt-Phosphorylierung an einer Hemmung der Kinaseaktivität der Akt durch die IGF-Kinase liegt, wurde der Versuch mit dem artifiziellen Substrat Crosstide an Stelle von PTB wiederholt (Abbildung 5.29). Crosstide ist ein aus 11 Aminosäuren bestehendes Peptid, welches die Sequenz *GRxRxxSFAEG* besitzt und durch die Akt-Kinase sehr gut phosphoryliert wird^[170].

In diesem Versuch wurden 30 µM Crosstide in Anwesenheit von 5µM GST-IGF_{D→A} durch 0,5 µM GST-Akt_{Oca} zeitabhängig unter radioaktiven Standardbedingungen (8.2.10) phosphoryliert. Gleichzeitig wurde ein Ansatz ohne Zugabe von katalytisch inaktiver Kinase phosphoryliert. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden dem Ansatz 10 µl entnommen und auf p81-Papier aufgetragen, die Reaktion mit 5% TCA-Probenpuffer abgestoppt und die Membran wie unter Kapitel 8.2.10 „Dot-Blot auf Phosphozellulose-Papier“ beschrieben gewaschen und ausgewertet.

In Abbildung 5.29 ist der Phosphat Transfer auf das Substrat Crosstide durch die GST-Akt_{Oca} gezeigt. In grün ist der Transfer ohne Zugabe von GST-IGF_{D→A}, in rot der Transfer in Anwesenheit der katalytisch inaktiven Kinase gezeigt. Es ist zu sehen, dass in beiden Fällen das Substrat Crosstide durch die Akt gleichwertig phosphoryliert wird. In diesem Versuch ist es unerheblich, ob katalytisch inaktive IGF-Kinase in der Reaktion anwesend ist oder nicht.

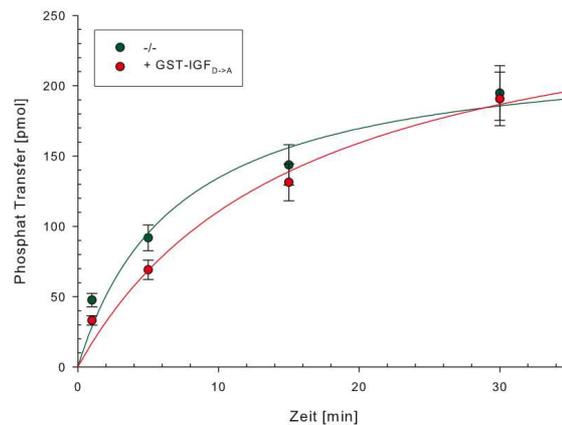


Abbildung 5.29.: Zeitabhängige Phosphorylierung des Substrats Crosstide durch GST-Akt_{Oca} ± GST-IGF_{D→A}.

Aufgetragen ist der Phosphat Transfer in [pmol] gegen die Zeit in [min]. Das Substrat wird durch die Akt-Kinase in beiden Versuchen vergleichbar phosphoryliert.

Somit konnte gezeigt werden, dass nicht die eigentliche Transferaseaktivität der Akt-Kinase durch die katalytisch inaktive-Kinase gehemmt wird. Die zeitliche Verzögerung der PTB-Phosphorylierung resultiert somit aus der Interaktion zwischen IGF-Kinase und PTB-Domäne.

5.5.2 Phosphorylierung von GST-PTB₃₇₀ durch die Akt-Kinase in Anwesenheit von GST-14-3-3 γ

Wie in Kapitel 5.5 beschrieben, bindet 14-3-3 γ an Serinreste von Proteinen, und steuert somit viele Signalwege. Unter anderem bindet 14-3-3 γ an IRS-1. Es ist fraglich, wie sich die Serinkinase Akt in Anwesenheit von 14-3-3 γ gegenüber dem Substrat GST-PTB₃₇₀ verhält (Abbildung 5.30). Hierzu wurden 15 μ M GST-14-3-3 γ für 10 min mit 5 μ M GST-PTB₃₇₀ auf Eis vorinkubiert und anschließend auf Raumtemperatur retemperiert. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Zugabe von GST-14-3-3 γ unter gleichen Bedingungen durchgeführt.

Anschließend wurde das Substrat durch 0,5 μ M GST-Akt_{Oca} unter radioaktiven Standardbedingungen phosphoryliert (8.2.10). Zu den jeweiligen Zeitwerten wurden 30 μ l der Reaktion mit SDS-Probenpuffer abgestoppt, über SDS-PAGE (8.2.9.3) aufgetrennt und angefärbt (8.2.9.7). Die einzelnen Banden wurden ausgeschnitten und ihre Radioaktivität mittels Cerenkov-Messung quantifiziert.

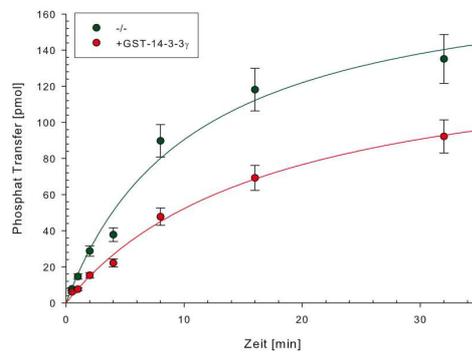


Abbildung 5.30.: Zeitabhängige Phosphorylierung des Substrats GST-PTB₃₇₀ durch GST-Akt_{Oca} \pm GST-14-3-3 γ .

Aufgetragen ist der Phosphat Transfer in [pmol] gegen die Zeit in [min]. Das Substrat wird durch die Akt-Kinase ohne Zugabe von GST-14-3-3 γ über den gesamten Zeitraum bis 32 min um den Faktor 3 besser phosphoryliert (grün).

In Abbildung 5.30 ist der Phosphat Transfer auf das Substrat GST-PTB₃₇₀ durch die Serinkinase GST-Akt_{Oca} gezeigt. Es ist zu sehen, dass die PTB in Anwesenheit von GST-14-3-3 γ deutlich schlechter durch die Akt-Kinase phosphoryliert wird als in der Kontrolle ohne Zugabe von 14-3-3 γ . Nach 30 min überträgt die Kinase etwa 140 pmol Phosphat auf das Substrat. Im Ansatz mit 14-3-3 γ werden im selben Zeitraum nur etwa 80 pmol Phosphat übertragen.

Um zu überprüfen, ob die verminderte PTB-Phosphorylierung in Anwesenheit von 14-3-3 γ an einer verminderten Transferaseaktivität auf Seiten der Kinase liegt, wurde der Versuch mit dem artifiziellen Substrat Crosstide wiederholt (Abbildung 5.31). In diesem Versuch wurden 30 μ M Crosstide in Anwesenheit von 10 μ M GST-14-3-3 γ durch 0,5 μ M GST-Akt_{Oca} zeitabhängig unter radioaktiven Standardbedingungen (8.2.10) phosphoryliert. Gleichzeitig wurde ein Ansatz ohne Zugabe von 14-3-3 γ phosphoryliert. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden dem Ansatz 10 μ l entnommen und auf p81-Papier aufgetragen, die Reaktion mit 5% TCA-Probenpuffer abgestoppt und die Membran wie unter Kapitel 8.2.10 „Dot-Blot auf Phosphozellulose-Papier“ beschrieben gewaschen und ausgewertet.

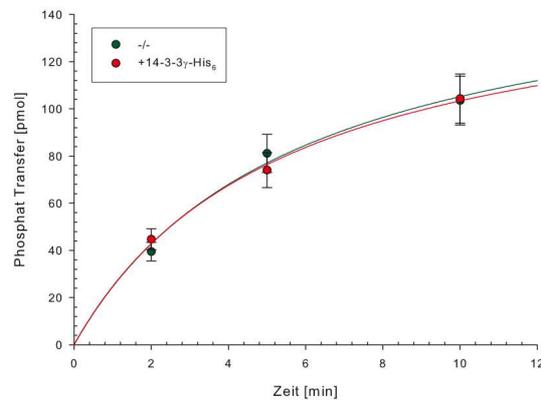


Abbildung 5.31.: Zeitabhängige Phosphorylierung von Crosstide durch GST-Akt_{Oca} ± GST-14-3-3γ.

Aufgetragen ist der Phosphat Transfer in [pmol] gegen die Zeit in [min]. Das Substrat wird durch die Akt-Kinase in beiden Versuchen gleich phosphoryliert.

In Abbildung 5.31 ist der Phosphat Transfer auf das Substrat Crosstide durch die Serinkinase GST-Akt_{Oca} gezeigt: in grün der Kontrollansatz ohne Zugabe von GST-14-3-3γ und in rot der in Anwesenheit von 10 μM GST-14-3-3γ. Es ist zu sehen, dass GST-14-3-3γ keinen Einfluss auf die Transferaseaktivität der Akt-Kinase hat. In beiden Versuchen wurde das Substrat gleich phosphoryliert. Nach 10 min wurden etwa 120 pmol Phosphat auf das Substrat übertragen. Die Transferase Aktivität der Akt-Kinase wird nicht durch 14-3-3 gehemmt.

Zur Kontrolle, ob 14-3-3 auch die Interaktion zwischen der IGF-Kinase und der PTB-Domäne hemmt, wurde die PTB-Phosphorylierung durch GST-TS-IGF_{ΔC} in Anwesenheit von 14-3-3 untersucht. Hierzu wurden 15 μM GST-14-3-3γ für 10 min mit 5 μM GST-PTB₃₇₀ auf Eis vorinkubiert und anschließend auf Raumtemperatur retemperiert. Als Vergleich wurde ein Ansatz ohne Zugabe von 14-3-3 gleich behandelt. Anschließend wurde das Substrat durch 1 μM GST-TS-IGF_{ΔC} zeitabhängig unter radioaktiven Standardbedingungen phosphoryliert (8.2.10). Zu den jeweiligen Zeitwerten wurden 30 μl der Reaktion mit SDS-Probenpuffer abgestoppt, über SDS-PAGE (8.2.9.3) aufgetrennt und angefärbt (8.2.9.7). Die einzelnen Banden wurden ausgeschnitten und ihre Radioaktivität mittels Cerenkov-Messung quantifiziert.

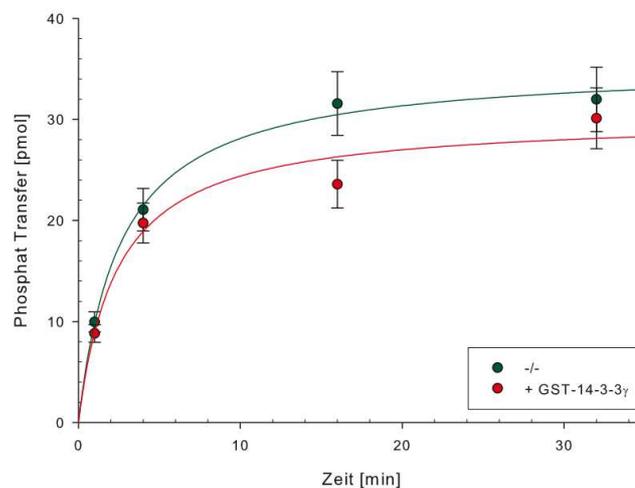


Abbildung 5.32.: Zeitabhängige Phosphorylierung von GST-PTB₃₇₀ durch GST-TS-IGF _{Δ C} \pm GST-14-3-3 γ

Aufgetragen ist der Phosphat Transfer in [pmol] gegen die Zeit in [min]. Das Substrat wird in beiden Versuchen gleich durch die IGF-Kinase phosphoryliert (Kontrolle ohne Zugabe von 14-3-3 in grün).

In Abbildung 5.32 ist der Phosphat Transfer auf das Substrat GST-PTB₃₇₀ durch die GST-TS-IGF _{Δ C} in Anwesenheit von GST-14-3-3 γ (rot), sowie die Kontrolle ohne 14-3-3 (grün) gezeigt. Die PTB-Domäne wird in beiden Fällen gleich durch die IGF-Kinase phosphoryliert. Nach 30 min werden etwa 30 pmol Phosphat auf das Substrat übertragen.

GST-14-3-3 γ hat keinen Einfluss auf die Interaktion zwischen PTB und IGF-Kinase. Trotz Serinphosphorylierung des Substrats kommt es durch 14-3-3 γ zu keiner Auflösung des Kinase-Substrat-Komplexes. Dieses würde sich in einer gesteigerten Substratphosphorylierung widerspiegeln.

5.5.3 **Kompetition der Akt-Phosphorylierung durch GST-IGF_{D \rightarrow A} und GST-14-3-3 γ**

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Bindungspartnern der PTB-Domäne eine Phosphorylierung durch die Akt-Kinase erschweren. Im Fall der katalytisch inaktiven IGF-Kinase (Kapitel 5.5.1), wurde die Akt-Kinase über einen Zeitraum von 8 min gehemmt, und das Substrat anschließend doch fast vollständig phosphoryliert (siehe Abbildung 5.28).

Im Falle von GST-14-3-3 γ (Kapitel 5.5.2) wurde die PTB-Domäne über den gesamten Zeitraum von 30 min schlechter phosphoryliert. Jedoch war der Effekt der Hemmung

durch 14-3-3 nicht so deutlich wie die Hemmung durch katalytisch inaktive IGF-Kinase (siehe Abbildung 5.30).

Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, wie die Akt-Kinase die PTB-Domäne phosphoryliert, wenn zwei Bindungspartner im Phosphorylierungsansatz anwesend sind (Abbildung 5.33).

Hierzu wurden 5 μM GST-PTB₃₇₀ mit 10 μM vorphosphorylierter GST-IGF_{D→A} und 15 μM GST-14-3-3 γ für 15 min auf Eis vorinkubiert, bei Raumtemperatur retemperiert und anschließend durch 0,5 μM GST-Akt_{Oca} unter radioaktiven Standardbedingungen (8.2.10) phosphoryliert. Zu den jeweiligen Zeitwerten wurden 30 μl der Reaktion mit SDS-Probenpuffer abgestoppt, über eine SDS-PAGE (8.2.9.3) aufgetrennt und mit kolloidaler Färbelösung angefärbt (8.2.9.7). Die einzelnen Banden wurden ausgeschnitten und ihre Radioaktivität mittels Cerenkov-Messung quantifiziert.

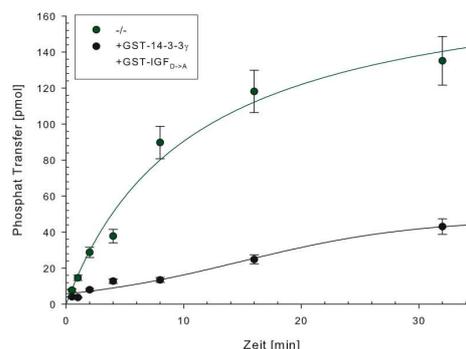


Abbildung 5.33.: Zeitabhängige Phosphorylierung des Substrats GST-PTB₃₇₀ durch GST-Akt_{Oca} \pm GST-14-3-3 γ und GST-IGF_{D→A}.

Aufgetragen ist der Phosphat Transfer in [pmol] gegen die Zeit in [min]. Das Substrat wird durch die Akt-Kinase durch die Anwesenheit von GST-14-3-3 γ und GST-IGF_{D→A} über den gesamten Zeitraum um den Faktor 4 schlechter phosphoryliert (schwarz).

In Abbildung 5.33 ist der Phosphat Transfer durch die Serinkinase GST-Akt_{Oca} auf das Substrat GST-PTB₃₇₀ in Anwesenheit von GST-IGF_{D→A} und GST-14-3-3 γ gezeigt. Es ist zu sehen, dass die Akt-Kinase in Anwesenheit der beiden Bindungspartner das Substrat deutlich langsamer phosphoryliert als in der Kontrolle. Nach 30 min überträgt die Kinase etwa 140 pmol Phosphat auf das Substrat. Liegen im Ansatz zusätzlich katalytisch inaktive IGF-Kinase und 14-3-3 vor, so überträgt die Kinase im selben Zeitraum nur etwa 40 pmol Phosphat.

Dies zeigt, dass die PTB-Domäne in einem Proteinkomplex deutlich schlechter durch die Akt-Kinase phosphoryliert wird. Die hier gewählten Bedingungen spiegeln immer noch nicht das *Molekular Crowding* in einer Zelle wieder, zeigen jedoch eindrucksvoll, dass nachgeschaltete Serinkinasen ihre Substrate nicht mit den kinetischen Parametern phosphorylieren, welche unter Laborbedingungen gemessen werden, wenn ihre Substrate in Proteinkomplexen vorliegen.

5.5.4 Sequenzielle Phosphorylierung durch zwei Kinasen

Um zu überprüfen ob die Serinphosphorylierung allein ausreicht, um den Proteinkomplex aus IGF-Kinase und PTB-Domäne zu lösen, wurde die PTB sequenziell durch zwei Kinasen phosphoryliert.

Zunächst sollte mit diesem Versuch untersucht werden, ob eine durch die Akt-Kinase phosphorylierte PTB sich zusätzlich an Serinresten durch die IGF-Kinase phosphorylieren lässt. Dies sollte nicht möglich sein, da eine nicht bindende PTB-Domäne durch die IGF-Kinase nicht phosphoryliert wird (vergleiche Kapitel 5.2.5). Als Kontrolle wurde der Versuch *vice versa* durchgeführt.

Zunächst wurden mit nur einer Kinase (0,5 μM GST-Akt_{Oca} bzw. 1 μM GST-TS-IGF _{ΔC}) 3 μM GST-PTB₂₇₅ für 30 min unter radioaktiven Standardbedingungen mit 0,5 mM ATP vorphosphoryliert. Nach 10 min, 20 min und 30 min wurden dem Ansatz 30 μl entnommen, mit SDS-Probenpuffer abgestoppt, über eine SDS-PAGE (8.2.9.3) aufgetrennt, angefärbt (8.2.9.7) und die einzelnen Banden quantifiziert. Der maximale Einbau wurde durch den Vergleich des 20 min und 30 min Wertes ermittelt. Unter den gegebenen Bedingungen, haben beide Kinasen das Substrat nach ihren Möglichkeiten maximal phosphoryliert. Anschließend wurde die zweite Kinase, sowie erneut 0,5 mM ATP hinzu gegeben und zu den jeweiligen Zeitpunkten dem Ansatz 30 μl entnommen, mit SDS-Probenpuffer abgestoppt und über eine SDS-PAGE (8.2.9.3) aufgetrennt, angefärbt (8.2.9.7) und die einzelnen Banden quantifiziert (Abbildung 5.34).

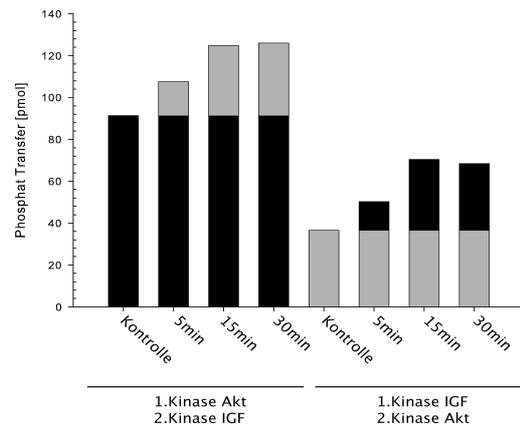


Abbildung 5.34.: Sequenzielle Phosphorylierung von GST-PTB₂₇₅ durch zwei unterschiedliche Kinasen.

Im Ersten Fall wurde zuerst 30 min mit der GST-Akt_{Oca} im zweiten Fall 30 min mit der GST-TS-IGF_{ΔC} unter radioaktiven Standardbedingungen phosphoryliert. Im Anschluss wurde zeitabhängig mit der jeweils anderen Kinase nachphosphoryliert. Aufgetragen ist der Phosphat Transfer auf das Substrat zu den Zeitpunkten 5,15,30 min und der Kontrolle mit nur einer Kinase. Sowohl die IGF-Kinase, als auch die Akt-Kinase phosphorylieren das vorphosphorylierte Substrat. Ist die PTB durch Akt vorphosphoryliert, überträgt die IGF-Kinase bis zu 30 pmol Phosphat zusätzlich. Ist die PTB durch die IGF-Kinase vorphosphoryliert, so erreicht die Akt-Kinase nicht den gleichen Einbau wie in eine unphosphorylierte PTB (30 pmol Phosphat statt 90 pmol)

In Abbildung 5.34 ist der Phosphat Transfer auf das Substrat GST-PTB₂₇₅ durch die Kinasen GST-Akt_{Oca} und GST-TS-IGF_{ΔC} gezeigt. Im ersten Fall wurde die PTB durch die Akt-Kinase vorphosphoryliert. Hier konnte ein maximaler Einbau von etwa 90 pmol gemessen werden. Dies entspricht ca. 1 mol Phosphat pro mol Substrat. Durch die IGF-Kinase konnten im Anschluss innerhalb von 30 min noch 30 pmol Phosphat übertragen werden. Somit wurden nach insgesamt 1 h durch beide Kinasen etwa 1,3 mol Phosphat pro mol Substrat übertragen. Im Fall, dass die IGF-Kinase die PTB vorphosphoryliert, wurde nur ein Phosphat Transfer von ca. 30 pmol nach 30 min erreicht. Die Akt-Kinase überträgt in 30 min nur etwa 30 pmol Phosphat zusätzlich auf das Substrat. Somit konnte in dieser Kombination nur etwa 0,6 mol Phosphat pro mol Substrat übertragen werden.

Die IGF-Phosphorylierung der vorphosphorylierten PTB-Domäne unterscheidet sich nicht von der Phosphorylierung des unphosphorylierten Substrats. In beiden Fällen werden etwa 30 pmol Phosphat auf die PTB übertragen. Dies zeigt noch einmal, dass das Serin²⁷⁰ nicht zwangsläufig durch die IGF-Kinase phosphoryliert wird. Zudem zeigt dieses Versuch auch, dass eine an Serin²⁷⁰ phosphorylierte PTB-Domäne durchaus ein Substrat für die IGF-

Kinase ist. Da die PTB nur dann phosphoryliert wird, wenn sie einen Komplex mit der Kinase eingehen kann, zeigt dies, dass die Serinphosphorylierung allein nicht der Grund für eine Auflösung des Kinase-Substrat-Komplexes ist. Die Akt-Kinase kann eine durch die IGF-Kinase phosphorylierte PTB nicht mehr vollständig phosphorylieren. In dieser Kombination werden nur 30% des maximalen Phosphat Transfers erreicht. Gründe hierfür werden in der Diskussion erläutert.

6 Diskussion

Der Insulinrezeptor (IR) und der nah verwandte *insulin-like growth factor-1 receptor* (IGF-1R) sind Mitglieder der Familie der transmembranständigen Rezeptortyrosinkinasen (RTK). Nach Stimulation durch Insulin zeigt der IR in der Autophosphorylierung eine duale Aktivität, d.h. Phosphorylierung von Tyrosin- und Serinresten. Wird die lösliche Insulinrezeptorkinase als dimeres GST-Fusionsprotein exprimiert, so zeigt diese Kinase auch in der Autophosphorylierung duale Aktivität. Duale Substratphosphorylierung durch IR bzw. IGF-1R konnte nur beobachtet werden, wenn im Phosphorylierungsansatz Poly-Lysin als „Vernetzer“ in äquimolaren Konzentrationen vorlag^[43]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch die lösliche Kinasedomäne IGF-1R in der Lage ist, Substrate multiple an Tyrosin-, Threonin- und Serinresten zu phosphorylieren. Die Bedingungen hierfür sind die Bildung eines stabilen Kinase-Substratkomplexes über Bindungseigenschaften, die strukturell entfernt von der katalytischen Spalte der Kinase liegen. Wird diese Bindung auf Seiten des Substrats oder der Kinase pertubiert, so verliert die IGF-Kinase die Fähigkeit zur dualen Aktivität. Zudem ist die richtige Konformation der Aktivierungsschleife entscheidend für die duale Kinaseaktivität. Für das Substrat GST-PTB₂₇₅, welches die Phosphotyrosin-bindende Domäne (PTB) des Insulinrezeptorsubstrat 1 (IRS-1) als GST-getagtes Dimer darstellt, konnte zudem die Phosphorylierungsstelle der IGF-Kinase bis auf drei Serine in einem C-terminalen Serincluster eingegrenzt werden. Wird dieses Cluster um wenige Aminosäuren verschoben, so ist die IGF-Kinase nicht mehr in der Lage, das Substrat an Serinresten zu phosphorylieren. Ob die duale Kinaseaktivität der IGF-Kinase sich bei der Signalweiterleitung auswirken kann, wurde durch Konkurrenzexperimente mit der Serinkinase Akt untersucht und wird hier weiter diskutiert.

6.1 Duale Proteinkinasen

Proteinkinasen sind Phosphoryltransferasen, die je nach Phosphorylakzeptor, klassischerweise in zwei Klassen unterteilt werden: Serin/Threonin-Kinasen und Tyrosinkinasen^[171]. In den meisten Proteinkinasen ist diese Unterteilung empirisch leicht zu überprüfen und klar unterscheidbar, wenn Substrate der einen oder der anderen Klasse eingesetzt werden. Als Beispiel sei hier die Akt-Kinase als Vertreter einer Serin/Threonin-Kinasen zu nennen. Diese Kinase phosphoryliert ihre Substrate an spezifischen Serinresten

Diskussion

innerhalb von Erkennungssequenzen. Wird das Serin durch ein Tyrosin substituiert, so ist die Kinase nicht in der Lage, das Tyrosin zu phosphorylieren (Abbildung 5.20, Seite 61). Tyrosinkinassen hingegen phosphorylieren ihre Substrate nicht nach einem sequenzspezifischen Mechanismus. Für die Kinasen des Insulinrezeptors und des nah verwandten IGF-1-Rezeptors ist lediglich bekannt, dass sie Tyrosin in einer sauren Sequenzumgebung präferieren^[172]. Jedoch ist bisher unbekannt, worin die Substratspezifität bei Tyrosinkinassen begründet ist.

Tabelle 6.1.: Eigenschaften der möglichen dualen Protein Kinasen nach Lindberg et al. (TIBS 1992)^[5]

verwendete Bezeichnungen: NT: nicht getestet; PTK: Proteintyrosinkinase; anti-P.Tyr: Antikörper gegen Phosphotyrosin.

Name	Organismus	Phosphoaminosäuren nach Autophosphorylierung	PTK Substrate in trans	bakterieller anti-P.Tyr
wee1	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	P.Tyr = P.Ser	Angiotensin II	NT ^a
Clk	Maus	P.Tyr = P.Ser	Poly(Glu,Tyr)	Ja
ERK1	Mensch	P.Tyr = P.Thr	NT	NT
ERK2	Mensch	P.Tyr = P.Thr	NT	NT
mik1	<i>S. pombe</i>	NT	NT	NT
Spk1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P.Ser, P.Thr >> P.Tyr	Poly(Glu,Tyr)?	Ja
Tik	Maus	P.Ser, P.Thr >> P.Tyr	NT	Ja
PYT	Mensch	P.Thr >> P.Tyr	NT	Ja
Mck1	<i>S. cerevisiae</i>	P.Tyr = P.Ser?	Poly(Glu,Tyr)	NT
DPYK1	<i>Dictyostellium discoideum</i>	P.Tyr?	NT	Ja
DPYK2	<i>D. discoideum</i>	P.Tyr?	NT	Ja

Darüber hinaus lassen sich auch klare Unterschiede in der Primärstruktur von Tyrosinkinassen und Ser-/Thr-Kinasen feststellen (Vergleiche Kapitel 3.2.2 in der Einleitung). In wenigen Fällen jedoch werden Proteinkinassen beschrieben, die über duale Spezifität verfügen, indem sie in der Lage sind, neben Serin-/Threoninresten auch Tyrosinreste zu phosphorylieren (Tabelle 6.1)^[5]. Einer der wenigen bis heute zweifelsfrei anerkannten Kinasen mit dualer Spezifität ist die Mitogen-aktivierte-Proteinkinase aus der MEK-Familie, die die Mitogen-aktivierten Proteinkinassen (MAPK) durch Phosphorylierung der konservierten Sequenz TxY aktivieren^[173]. In der Literatur ist deutlich belegt, dass die Insulinrezeptorkinase hinsichtlich der Autophosphorylierung über duale Spezifität verfügt^[174-176,158]. In der vorliegenden Arbeit konnte hinreichend beschrieben werden, wie auch Substrate ohne die Zugabe von Polylysin durch die IGF-Kinase und die nah verwandte lösliche Insulinrezeptorkinasedomäne (IRKD) dual

phosphoryliert werden können.

6.2 Proteinbindung im zellulären Kontext

In Signalnetzwerken gibt es keine optimale Affinität für Protein-Protein Interaktionen, aber eine große Bandbreite an Dissoziationskonstanten, welche für die jeweilige biologische Aufgabe maßgeschneidert ist. Es ist biochemisch korrekt zu vermuten, dass starke Protein-Protein-Interaktionen ein hohes Maß an Spezifität hervorbringen und biologisch mehr relevant sind, als relativ schwache Interaktionen. Starke Interaktionen sind langlebig, was in manchen Bereichen wichtig sein kann. Aber es ist klar, dass solche Interaktionen nicht immer die nötige Flexibilität aufweisen, die eine Zelle für eine dynamische Antwort bei sich ändernden externen Bedingungen braucht. Affinitäten im mikromolaren Bereich bedeuten nicht gleich den Verlust der Spezifität. Tatsächlich konnte für SH2- und SH3-Domänen gezeigt werden, dass eine gesteigerte Affinität zu einem Motiv die Spezifität zwischen Kinase und Substrat herabsetzt^[177,178]. Die Auflösung dieses Paradoxons könnte darin liegen, dass gesteigerte Bindung an eine optimale Sequenz zu einer Absperrung von verlagerten Motiven des Substrats führt und dies die Spezifität der Kinase herabsetzt^[179]. Auf dieses Modell von Pawson *et al.* soll später näher eingegangen werden.

6.3 Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten Kinasen

In der vorliegenden Arbeit konnte für verschiedene Substrate gezeigt werden, dass diese durch die IGF-Kinase und die nah verwandte Kinase des Insulinrezeptors (IR) neben Tyrosinresten auch an Serinresten und Threoninresten phosphoryliert werden können. *In vivo* bindet IRS-1 über seine PTB-Domäne an den Juxtamembranbereich des Rezeptors. Die Bindung erfolgt über ein NPEpY-Motiv. Wird das Tyrosin in diesem Motiv durch Phenylalanin substituiert, so geht die Phosphorylierung von IRS-1 *in vivo* um 80% zurück^[153]. In der vorliegenden Arbeit wurde neben der wildtypischen Form der IGF-Kinase mit einer Kinase-Mutante gearbeitet, in der Tyrosin⁹⁵⁰ innerhalb des NPEY-Motivs durch Phenylalanin substituiert wurde. Dies entspricht derselben Substitution, die White *et al.* 1985 für den Insulinrezeptor benutzt haben. Zudem wurde überwiegend mit der durch GST dimerisierten, löslichen Form der Kinase gearbeitet. GST-Kinasen stellen ein Modell für den Hormon-gebundenen und damit aktivierten

Holorezeptor dar^[45] und weisen eine gesteigerte Aktivität im Vergleich zu monomeren Kinasen auf.

GST-Kinasen können effizient in hoher Ausbeute und Reinheit aus *Sf9*-Zellkultur gewonnen werden, zumal bei der Reinigung die Möglichkeit der zusätzlichen Affinitätschromatographie besteht. Somit konnten die Kinasen in dieser Arbeit nahezu homogen (100% rein) erhalten werden. Versuche in unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die IGF-Kinase in allen Reinheitsstufen duale Kinaseaktivität besitzt. Sowohl die Wildtypkinase GST-TS-IGF_{ΔC} als auch die Mutante GST-TS-IGF_{ΔC Phe} wurden über das gleiche Reinigungsprotokoll bestehend aus Affinitäts-, Anionenaustauscher- und anschließender Gelfiltrationschromatographie gereinigt. Dies gewährleistet, dass die Aufreinigungen frei von additiven Serinkinasen als Kontamination sind.

Die Wahl von C-terminal verkürzten Kinasen ergab sich aus der Überlegung, dass mögliche Interaktionen zwischen dem C-Terminus und dem Substrat die Auswirkungen der Substitution im N-Terminus abschwächen könnten.

Um auszuschließen, dass die Substitution innerhalb des Juxtamembranbereichs einen Einfluss auf die Transferaseaktivität der Kinase hat, wurden beide Kinasen in Auto- und Substratphosphorylierung eines artifiziellen Substrats eingesetzt und verglichen. Als Cofaktor wurde in den Phosphorylierungsansätzen Mg²⁺ verwendet. Auf das größere Mn²⁺ Ion, wie es Yuan *et al.* verwendet haben, um duale Kinaseaktivität für die Phosphorylase-Kinase zu messen^[25], wurde verzichtet. Aus den Versuchen geht eindeutig hervor, dass die Substitution keinen Einfluss auf die Kinaseaktivität hat (Abbildung 5.2, Seite 34). Die duale Autophosphorylierung beider Kinasen beschränkte sich auf die Phosphorylierung eines artifiziellen Serinrestes im N-terminalen Linker zwischen GST und Kinase (Daten nicht gezeigt). Dieses Serin ist ein Resultat der *BamHI*-Klonierungsschnittstelle im Transfektionsvektor pAc-G2T.

Mit dem artifiziellen Substrat Tyrtide-His₆ wurde keine duale Kinaseaktivität gemessen, obwohl auch dieses Substrat über die artifizielle Serinphosphorylierungsstelle in der *BamHI*-Klonierungsschnittstelle verfügt. Jeglicher Phosphat Transfer erfolgte ausschließlich auf Tyrosinreste des Substrats. Auch das Substrat GST-IGF_{D→A} wurde durch beide Kinasen ausschließlich an Tyrosinresten phosphoryliert. Das Substrat GST-IGF_{D→A}

verfügt in seinem C-Terminus über Serinreste welche in der Autophosphorylierung der katalytisch aktiven Form dieser Kinase durchaus phosphoryliert werden. Diese Serine werden in einer Substratphosphorylierung von GST-IGF_{D→A} nicht durch die GST-TS-IGF_{ΔC} Kinasen phosphoryliert.

Sowohl Tyrtide als auch GST-IGF_{D→A} zeichnen sich dadurch aus, dass sie nicht über weitere Bindungen außer der Substratstabilisierung im katalytischen Zentrum der Kinase mit dieser interagieren. Diese Versuche zeigen, dass die GST-IGF-Kinasen eine intrinsische duale Kinaseaktivität für die Autophosphorylierung besitzen. Substrate die nicht mit der Kinase interagieren, werden jedoch nicht durch diese an Serinresten phosphoryliert.

Die katalytisch inaktive Kinase stellt jedoch ein besonderes Substrat dar. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass der monomere Vertreter der katalytisch inaktiven Kinase durch die monomere aktive Kinase durchaus dual an Serinresten und Tyrosinresten phosphoryliert wird^[44]. Hier wird postuliert, dass die Dimerisierung, und damit großflächige Interaktion beider Kinasen, duale Kinasespezifität induziert, wobei jeweils eine Kinase des Dimeres mit der inaktiven Form wechselwirken kann.

6.4 Duale Substratphosphorylierung durch die IGF-Kinase

In dieser Arbeit wurde mit verschiedenen Varianten des humanen Insulinrezeptorsubstrat-1 (IRS-1) gearbeitet. Die Substrate stellen alle die Phosphotyrosin-bindende Domäne (PTB) nach Eck *et al.* von Aminosäure Prolin¹⁵⁸ bis Glutamat²⁶³ dar (Ref.^[55]), die jeweils C-terminal verlängert wurden. Der überwiegende Anteil der Versuche dieser Arbeit wurden mit dem Substrat GST-PTB₂₇₅ durchgeführt, welches bis zur Aminosäure Arginin²⁷⁵ reicht und ein C-terminales Serincluster mit einschließt.

GST-Kinasen sind für Interaktionsversuche mit Substraten, die an den Juxtamembranbereich der Kinase binden, umstritten. GST-Kinasen zeichnen sich zwar durch eine gesteigerte Auto- und Substratphosphorylierung aus^[45], jedoch konnte für diese Kinasen bisher nicht gezeigt werden, dass das für die Interaktion mit der PTB-Domäne entscheidende Tyrosin⁹⁵⁰ in der GST-TS-IGF_{ΔC} (respektive Tyrosin⁹⁶⁰ in der GST-IRKD) phosphoryliert wird.

Die GST-PTB₂₇₅ wird durch die Wildtypkinase GST-TS-IGF_{ΔC} mit über 70% deutlich an Serinresten phosphoryliert. Die Kinasemutante GST-TS-IGF_{ΔC Phe} ist hierzu nicht in der

Lage (Abbildung 5.4, Seite 36), obwohl beide Kinasen die gleiche Aktivität gegenüber nicht bindenden Substraten zeigen (vergleiche Abbildung 5.2B, Seite 34). Das beweist zum einen, dass Tyrosin⁹⁵⁰ dem Phenylalanin an dieser Stelle für eine Bindung mit der PTB bevorzugt wird. Dies spricht für eine N-terminale Phosphorylierung von GST-Kinasen. Jedoch konnte diese Phosphorylierung in der Autophosphorylierung nicht nachgewiesen werden. Sowohl die GST-TS-IGF_{ΔC} als auch die GST-TS-IGF_{ΔC Phe} wurden mit 4 mol Phosphat pro mol Kinase phosphoryliert (Abbildung 5.2A, Seite 34). Die Substitution in der Mutante sollte sich in einem um 1 mol pro mol verringerten Phosphateinbau zeigen. GST-Kinasen eignen sich nicht für eine Auftrennung in der nativen PAGE. Jedoch konnte mit den monomerisierten Vertretern dieser Kinasen in einer nativen PAGE gezeigt werden, dass die Phe-Mutante der Kinase eine Phosphorylierungsstufe weniger aufweist als die Wildtypkinase.

Die Interaktion zwischen Kinase und Substrat führt zu dualer Kinaseaktivität der IGF-Kinase. Dies wurde in unserer Arbeitsgruppe schon für die lösliche Insulinrezeptorkinase gezeigt^[180]. Jedoch wurde für die Substratphosphorylierung durch die Insulinrezeptorkinase das größere Mn²⁺ Ion verwendet und mit monomeren Kinasen gearbeitet, welche nicht die hohe Reinheit der GST-Kinasen aufwiesen. Da sowohl GST-TS-IGF_{ΔC} als auch GST-TS-IGF_{ΔC Phe} über das identische Reinigungsprotokoll aufgearbeitet und über Auto- und Substratphosphorylierung normiert wurden, ist es höchst unwahrscheinlich, dass additive Serinkinasen nur in der Aufreinigung der Wildtypkinase verbleiben. Ist nun die deutliche Serinphosphorylierung der PTB durch die IGF-Kinase begründet, oder sind Serinkinasen in der Aufreinigung der PTB selbst hierfür verantwortlich? Um auch dieses ausschließen zu können, wurde GST-PTB₂₇₅ unter radioaktiven Standardbedingungen mit Magnesium und ATP ohne Zugabe einer weiteren Kinase über eine Zeit von 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es konnte kein Phosphat Transfer auf die PTB gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Somit ist als Phosphoryldonor ATP in Verbindung mit einer aktiven Kinase notwendig, um das Substrat PTB zu phosphorylieren.

Bei der Verwendung von GST-Konstrukten stellt sich immer die Frage, ob nicht der GST-Tag eines Proteins mit dem GST-Tag des anderen Proteins interagiert. Dies konnte durch eine Phosphorylierung von GST-PTB₂₇₅ in Anwesenheit von freiem GST

ausgeschlossen werden (Abbildung 5.6, Seite 40). GST hat keinen Einfluss auf die Interaktion zwischen Kinase und Substrat und damit auf die Serinphosphorylierung der durch GST dimerisierten PTB-Domäne. Durch eine native PAGE mit dem phosphoryliertem N-Terminus der Kinase wurde gezeigt, dass GST-Kinase und GST-Substrat einen nachweisbaren stabilen Proteinkomplex bilden (Abbildung 5.5, Seite 38).

Dass die duale Kinaseaktivität der IGF-Kinase in der Bindung des Substrats begründet ist, wird dadurch unterstrichen, dass eine denaturierte PTB-Domäne durch die Wildtypkinase nicht mehr an Serinresten, sondern ausschließlich an Tyrosinresten phosphoryliert wird (Abbildung 5.7, Seite 41). Im Gegensatz dazu ist dies unter nativen Bedingungen möglich. Die Denaturierung hatte lediglich einen Verlust der sekundären Struktur zur Folge, was die unveränderte Phosphorylierung durch die Akt-Kinase zeigt. Dass denaturierte Substrate nicht mehr phosphoryliert werden, wurde schon für die *C-terminal Src-Kinase* (Csk) gezeigt^[181].

Diese Ergebnisse sind kohärent zu Beobachtungen, dass idealisierte Substratpeptide, die durch Mutationsanalysen von natürlichen Kinasesubstraten erzeugt wurden, nicht annähernd so gut phosphoryliert werden wie die natürlichen/nativen Substrate der entsprechenden Kinase^[182,183]. Diese Substratpeptide weisen nicht die native Sekundärstruktur der natürlichen Substrate auf. Als Beispiel sei hier wieder die Csk genannt. Ein kombinatorischer Peptidscan der Csk-Phosphorylierungsstelle in der C-terminalen Sequenz der Src-Kinase erbrachte nur Peptidsubstrate, die um ein vielfaches schlechter umgesetzt werden. Auch die Beobachtungen, dass Substrate in Anwesenheit von niedermolekularen Komplexbildnern (wie Polylysin) durch Kinasen deutlich stärker phosphoryliert werden, korreliert zu den von mir gefundenen Ergebnissen^[184,185]. Auch hier findet sich ein Beispiel für die Csk. Die Untersuchungen zum Mechanismus der Substraterkennung brachten ein artifizielles Random-Peptid mit vier N-terminalen Lysinen hervor, dass um den Faktor 500 besser durch die Csk phosphoryliert wird als das natürliche Substrat^[186]. Aus der Literatur lässt sich somit schließen, dass die Steigerung der Bindung zwischen Kinase und Substrat immer zu einer erhöhten Aktivität der Kinase führt. Über die Steigerung oder Änderung der Spezifität einer Kinase ist in der Literatur nichts beschrieben.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Bindung des Substrats über seine PTB-Domäne an eine Tyrosinkinase, Serinreste innerhalb des Proteins phosphoryliert werden können. Wird die Serinphosphorylierungsstelle aus der PTB-Domäne (siehe folgendes Kapitel) hinter ein nicht bindendes Substrat kloniert, so kann in diesem Protein keine Serinphosphorylierung durch die IGF-Kinase nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass der Komplex aus Substrat und Kinase von grundsätzlicher Bedeutung für eine duale Kinaseaktivität der IGF-Kinase ist.

Doch ist die Bindung des Substrats an die Kinase die einzig ausreichende Bedingung für duale Kinaseaktivität? Die Versuche mit Kinase-Varianten mit mutierter Aktivierungsschleife zeigen, dass eine weitere Bedingung für duale Kinaseaktivität erforderlich ist. Kinasen, in denen die Aktivierungsschleife durch Substitutionen der Tyrosinauto-phosphorylierungsstellen mutiert wurde, weisen nicht die gleiche katalytische Spezifität wie die Wildtypkinase auf. Sie unterscheiden sich nicht in der Autophosphorylierung jedoch in der Fähigkeit, Substrate zu phosphorylieren. Zudem sind sie nur bedingt in der Lage, sich und Substrate an Serinresten zu phosphorylieren. Die Kinasemutanten GST-LIRK_{Y1150F} und GST-LIRK_{Y1151F} zeigen deutlich verminderte Serinphosphorylierung des Substrats GST-PTB₂₇₅ (Abbildung 5.8, Seite 43). Der Anteil an Phosphotyrosin hingegen ist in etwa vergleichbar wie bei der Wildtypkinase. Dies zeigt, dass die Konformation der Aktivierungsschleife entscheidenden Einfluss auf die duale Kinaseaktivität hat. Wird die Struktur der Aktivierungsschleife verändert, weist die Kinase keine duale Kinaseaktivität auf. Während Tyrosine diese veränderte Konformation tolerieren, scheinen kürzere Serin- und Threoninreste nicht mehr innerhalb der Struktur aus katalytischer Schleife, Aktivierungsschleife und P+1-Schleife für den Phosphat Transfer stabilisiert zu werden und können damit als Substrate nicht mehr erkannt werden.

Die Phe-Mutante der IGF-Kinase ist jedoch grundsätzlich dazu fähig, Substrate an Serinresten zu phosphorylieren. Wird das Substrat verlängert, so dass die Bindung der PTB-Domäne an den Juxtamembranbereich nur noch einen Teil zur Gesamtinteraktion zwischen Substrat und Kinase beiträgt, so wird auch duale Kinaseaktivität in der Phe-Mutante beobachtet. Wird das Substrat gleichsam kovalent an die Kinase gekoppelt, so ist kein Unterschied zwischen der Phe-Kinase und der Wildtypkinase festzustellen. Beide Kinasen phosphorylieren das Substrat an Threonin-, Serin-, und Tyrosinresten

(Abbildung 5.16, Seite 56).

6.4.1 Bestimmung der Serinphosphorylierungsstelle der IGF-Kinase von GST-PTB₂₇₅

Um die Serinphosphorylierungsstelle für die IGF-Kinase in GST-PTB₂₇₅ zu identifizieren, wurde zunächst eine kürzere Variante der PTB kloniert. Diese Variante entsprach der PTB-Domäne nach Eck *et al.*^[55]. Durch Charakterisierung dieses Substrats wurde die Phosphorylierungsstelle auf das C-terminale Serincluster eingegrenzt (Abbildung 5.18, Seite 59). Dieses Ergebnis wurde durch einen Bromcyanverdau (BrCN) der phosphorylierten PTB-Domäne bestätigt. Durch den Verdau entsteht ein 16 Aminosäuren langes Peptid mit einer Phosphorylierungsstelle für die Akt-Kinase (Tabelle 5.3, Seite 73). Ein Vergleich der Phosphopeptide durch eine Schägger-PAGE und eine Reversed Phase Analyse (Abbildung 5.27, Seite 74) zeigt, dass die IGF-Phosphorylierung auf dem gleichen Peptid liegt wie die Akt-Phosphorylierung.

Wird das C-terminale Serincluster um einen Linker in seiner räumlichen Lage verändert, so wird es durch die IGF-Kinase nicht mehr phosphoryliert. Dies lässt auf einen ersten Blick vermuten, dass die IGF-Kinase ihre Substrate nicht sequenzspezifisch, sondern nach ihrer räumlichen Positionierung und Zugänglichkeit phosphoryliert.

Dazu wurden zwei Alanin-Scans dieses Serinclusters im Substrat durchgeführt. Bei einem Alanin-Scan werden sukzessive alle möglichen Phosphorylierungsstellen für eine Kinase durch Alanin substituiert. Wird eine Mutante mit einer Alanin-Substitution nicht mehr durch die Kinase phosphoryliert, so ist eine Phosphorylierungsstelle für die Kinase identifiziert.

Im Falle des ersten Alanin-Scans wurden zwei PTB-Mutanten gefunden, die einen geringeren Phosphat Transfer zeigten als der Wildtyp. In diesen Mutanten wurden die Serine 270 und 273 durch Alanin substituiert. Diese beiden Serinreste stellen somit potentielle Phosphorylierungsstellen für die IGF-Kinase dar. Der Vergleich der Phosphoaminosäuren zeigte jedoch, dass beide Substrate weiterhin überwiegend an Serin phosphoryliert werden. Zudem wurde der Phosphat Transfer auf beide Mutanten, im Vergleich zum Wildtyp, lediglich halbiert. Somit scheint die IGF-Kinase auf andere Serinreste auszuweichen, wenn diese Serine nicht als Phosphorylakzeptoren zur Verfügung

stehen. Die IGF-Kinase ist, anders als die Serinkinase Akt, nicht sequenzspezifisch in der Wahl ihrer Phosphorylierungsstellen. Ein weiteres Ergebnis dieses Alanin-Scans war die Mutante GST-PTB_{S74A}, welche stärker phosphoryliert wurde als der Wildtyp und zudem auch einen größeren Anteil an Phosphoserin aufwies. Die Substitution an dieser Stelle scheint die Konformation des C-Terminus so verändern, dass weitere Serine durch die IGF-Kinase phosphoryliert werden können.

Bei einem zweiten Alanin-Scan wurden bis auf je ein Serin alle anderen Serine des Clusters durch Alanin substituiert. Hierdurch konnte die Phosphorylierungsstelle der IGF-Kinase bis auf zwei Reste genau eingegrenzt werden (Abbildung 5.22, Seite 65). Werden nur die Serine 268, 270 oder 272 der IGF-Kinase angeboten, so geht die Phosphorylierung im Vergleich zum Wildtyp stark zurück. Werden lediglich die Serine 273 oder 274 angeboten, so verhalten sich diese PTB-Mutanten wie der Wildtyp. Ein Vergleich der Phosphoaminosäuren zeigt, dass in den beiden Mutanten GST-PTB_{S73} und GST-PTB_{S74} nur Serinreste phosphoryliert wurden. In der Mutante, in der nur das Serin 268 als Phosphorylakzeptor verblieb (GST-PTB_{S68}), ging der Anteil an Phosphoserin auf 60% zurück. Dies zeigt erneut, dass die IGF-Kinase, anders als die Akt-Kinase nicht sequenzspezifisch ist. Die IGF-Kinase präferiert die Serine 273 und 274. Werden diese aber durch Alanin substituiert, so werden andere Serine in räumlicher Nähe phosphoryliert. Für die Kinase des Insulinrezeptors ist ein ähnlicher Fall in der Literatur beschrieben. Lewis *et al.* 1990 beschreiben, dass die Serine 1293 oder 1294 nach Insulin Stimulation des Rezeptors phosphoryliert werden. Dies geschah allerdings erst 2 h nach der Insulinstimulation und nur zu einem marginalen Anteil von 2%^[176]. Unsere Arbeitsgruppe konnte für den Insulinrezeptor und die lösliche Insulinrezeptorkinasedomäne die Serine 1275 und 1309 eindeutig als Autophosphorylierungsstellen identifizieren^[41,174]. Hierbei trat 30 min nach Insulinstimulation die Serinphosphorylierung mit 40% deutlich hervor^[41]. Diese Phosphorylierungen schließen zudem die Anwesenheit von *insulin-sensitive serin kinases* (IRSK) aus. Auch dieser Fall zeigt, dass eine Tyrosinkinase nicht sequenzspezifisch ist, sondern ihre Substrate nach Erreichbarkeit phosphoryliert. In diesem Fall werden die Serine 1275 und 1309 in unterschiedlichen Sequenzumgebungen präferiert.

Bei der Substitution von je vier Resten durch Alanin ist nicht zu erwarten, dass die native

Sekundärstruktur des Clusters erhalten bleibt. Somit ist ein Vergleich zwischen dem ersten Alanin-Scan und dem zweiten Alanin-Scan nicht ohne weiteres möglich. Es fällt jedoch auf, dass Serin²⁷⁴ und Serin²⁷³ Schlüsselpositionen im C-Terminus der PTB-Domäne besetzen. Wird Serin²⁷³ allein substituiert, so geht der Phosphat Transfer auf diese Mutante zurück. Wird nur dieses Serin als Phosphorylakzeptor angeboten, so ist der Phosphat Transfer vergleichbar mit dem der Wildtyp-PTB. Wird Serin²⁷⁴ allein substituiert, so wird die resultierende Mutante stärker durch die IGF-Kinase phosphoryliert. Wird nur dieses Serin der IGF-Kinase angeboten, so wird diese PTB-Mutante ebenfalls stärker phosphoryliert als der Wildtyp. Dies spricht für eine Konkurrenz der Phosphorylierung durch das Serin²⁷⁴.

6.4.2 Bewertung der massenspektroskopischen Auswertung

In Kapitel 5.4.8 (*Massenspektroskopische Analyse der phosphorylierten GST-PTB₂₇₅*, Seite 71) wurde eine Probe der durch GST-TS-IGF_{AC} phosphorylierten GST-PTB₂₇₅ durch das Service-Labor des ZMMK Köln massenspektroskopisch analysiert. Als Kontrolle wurde dem Labor zudem eine durch die Akt-Kinase phosphorylierte PTB-Domäne übersandt. Für die Akt-Kinase ist in der Literatur das Serin²⁷⁰ in der PTB-Domäne als Phosphorylierungsstelle beschrieben^[187]. Schon vor diesem Schritt gingen Proben der phosphorylierten PTB-Domäne an unterschiedliche Labore zur massenspektroskopischen Analyse. Kein einziges Labor konnte das C-terminale Serincluster isolieren und massenspektroskopisch vermessen.

Die Gelextraktion wurde von Seiten des Labors durchgeführt. Es wurden zwei verschiedene Proteasen verwendet: zum einen Trypsin, zum anderen V8-Protease. Die Analyse erfolgte, indem zuerst die erzeugten Fragmente über eine C₁₈-Säule entsalzt, die Phosphopeptide dann über eine Titandioxidsäule (TiO₂) angereichert und über eine LC-MS-MS-Analyse untersucht wurden.

Beide Proteasen erzeugen jedoch nur Fragmente, in denen das Serincluster gespalten vorliegt. Die Ausbeute eines 20 Aminosäurereste langen Peptid-Fragmentes, das das gesamte Serincluster enthält, lag nur bei 1,5% und ergab drei verschiedene Isoformen. Versuche von Seiten des Labors, die Gelextraktionsbedingungen zu ändern und so eine größere Ausbeute des Fragmentes zu erhalten, schlugen jedoch fehl. Das größte Problem

das bewältigt werden musste, lag darin, dass das Fragment nicht auf der C₁₈-Säule verbleibt, da es zu hydrophil ist. Somit kann es nicht über die nachgeschaltete TiO₂-Säule angereichert werden. Versuche das Laufmittel von reiner Ameisensäure auf eine Mischung mit 0,1% Trifluoressigsäure (TFA), sowie statt einer C₁₈-Säule eine *High-Carb*-Vorsäule zu verwenden, gelangen nicht. Zudem konnte auch für die interne Kontrolle mit der durch die Akt-Kinase phosphorylierten PTB kein Ergebnis erzielt werden. Somit ist das Ergebnis mit Vorsicht zu bewerten.

Da die drei Isoformen des C-terminalen Fragments insgesamt nur zu 1,5% vorlagen, war die Signalstärke sehr schwach. In der zweiten MS-Analyse konnte in zwei Isoformen nur jeweils eine Aminosäure exakt zugewiesen werden. Zudem konnte nicht unterschieden werden, welche phosphorylierte Isoform des Clusters häufiger auftritt.

Aus diesem Grund wurde ein Bromcyanverdau (BrCN) durchgeführt. Dieser erzeugt ein Peptid-Fragment von 16 Aminosäuren und ca. 1,8 kDa, welches das gesamte Serincluster enthält. Der Verdau wurde sowohl über eine Schägger-Peptid-PAGE, als auch über eine *Reversed-Phase*-HPLC analysiert. In beiden Fällen korrelierten die Ergebnisse des durch die IGF-Kinase phosphorylierten Substrats mit der Kontrolle des durch die Akt-Kinase phosphorylierten Substrats. Dies unterstreicht noch einmal, dass die IGF-Kinase ein Serin auf dem selben Peptidfragment phosphoryliert wie die Akt-Kinase, und bestätigt die Ergebnisse des Alanin-Scannings. Proben der *Reversed-Phase* Analyse wurden ebenfalls an das ZMMK weitergeleitete. Jedoch konnte auch in diesem Fall kein Ergebnis erzielt werden.

In der Literatur werden die Serine 265, 302, 307, 312, 325 und 358 des humanen IRS-1 als potentielle Phosphorylierungsstellen angegeben. Diese Angaben erfolgten aus Phosphopeptidkartierungen und massenspektroskopischen Analysen. Nach den Erkenntnissen, die aus der Massenspektroskopie gezogen werden können, ist es fraglich, ob die Serine 268-274 auch natürliche Phosphorylierungsstellen darstellen. Peptide die zu hydrophil sind, werden nicht analysiert und werden daher auch in der Literatur nicht beschrieben.

Eine weitere Möglichkeit, warum die Massenspektroskopie zu keinem Ergebnis führte, besteht darin, dass das Stop-Codon bei der Expression von GST-PTB₂₇₅ überlesen wird.

Somit würde der C-Terminus um drei Aminosäuren verlängert werden, und Signale aus der MS-Analyse können keiner Sequenz zugeordnet werden. Alle Konstrukte die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind auf DNA-Ebene sequenziert worden und weisen keinerlei Abweichungen zur erwarteten Sequenz auf. Daher ist die Einschätzung des Labors nicht zutreffend. Es bleibt zu erwähnen, dass es dem Labor nicht gelungen ist, die Phosphorylierungsstelle der Akt-Kinase, welche in der Literatur beschrieben ist^[187], zu bestätigen.

6.5 Kinetische Untersuchungen der dualen Phosphorylierung

Ein Vergleich der Geschwindigkeiten der Tyrosin- mit der Serinphosphorylierung der IGF-Kinase zeigt, dass die Serinphosphorylierung deutlich langsamer als die Tyrosinphosphorylierung ist. Ein Vergleich der Initialgeschwindigkeiten für das Substrat GST-IGF_{D→A} mit denen für das Substrat GST-PTB₂₇₅ (Tabelle 6.2) verdeutlicht, dass die Serinphosphorylierung mit 0,08 mol/mol/min 20 mal langsamer ist als die Tyrosinphosphorylierung. Daher ist klar, dass lange Zeit angenommen wurde, dass die Serinphosphorylierung der Tyrosinphosphorylierung zeitlich nachfolgt. Vergleicht man die Geschwindigkeit mit der GST-PTB₃₇₀ durch die IGF-Kinasen phosphoryliert wird, so ist zu erkennen, dass das Substrat um den Faktor 2 schneller phosphoryliert wird als GST-PTB₂₇₅.

Tabelle 6.2.: Vergleich der maximalen Initialgeschwindigkeiten der GST-TS-IGF_{ΔC} Kinasen für verschiedene Substrate.

	GST-TS-IGF _{ΔC}	GST-TS-IGF _{ΔC} Phe
	V _{Max} [mol/mol/min]	V _{Max} [mol/mol/min]
GST-IGF _{D→A}	2,2 ± 0,1	2,2 ± 0,1
GST-PTB ₂₇₅	0,08 ± 0,01	n.b.
GST-PTB ₃₇₀	0,17 ± 0,01	0,03 ± 0,02
GST-PTB _{S270Y}	0,4 ± 0,03	0,03 ± 0,02

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch schon nach 1 min Serinphosphorylierung im Substrat GST-PTB₂₇₅ nachgewiesen werden. Aus den Daten lässt sich schließen, dass die IGF-Kinase Tyrosinreste vor Threonin- und Serinresten präferiert. Dieses Prinzip ist allerdings nicht allgemein gültig. Wird ein Tyrosinrest in einer nicht optimalen Position

angeboten, so wird er durch die bindungsdefiziente IGF-Kinase nicht phosphoryliert. Die PTB-Domäne besitzt in ihrer Struktur ein einzelnes Tyrosin im β 2-Faltblatt. Die Hydroxylgruppe des Tyrosins ist in der Sekundärstruktur in das Lumen des Proteins gerichtet. Daher ist es in der nativen PTB-Domäne kein optimales Substrat für die Kinase. Zudem zeigt der Versuch mit der PTB-Mutante GST-PTB_{S270Y} (vergleiche Abbildung 5.20, Seite 61) dass die Serinphosphorylierung parallel zur Tyrosinphosphorylierung erfolgt. Zu jedem Zeitwert ist der Phosphat Transfer auf diese Mutante doppelt so hoch wie im Wildtyp. Obwohl ein Tyrosinrest vorhanden ist, wird es jedoch durch die Phe-Mutante vergleichbar schlecht phosphoryliert wie das Wildtypsubstrat. Dies zeigt, dass sowohl für die Serin- als auch für die Tyrosinphosphorylierung die räumliche Position der Aminosäure im Protein von entscheidender Bedeutung für die Kinase ist. Das Tyrosin an Position 270 in der PTB-Domäne ist somit für eine freie Phosphorylierung misspositioniert und kann nicht durch die Phe-Mutante phosphoryliert werden. Somit lässt sich schlussfolgern, dass die Position des Phosphorylakzeptors einen Einfluss auf die Spezifität einer Tyrosinkinase hat.

6.6 Mechanistische Überlegungen der dualen Kinaseaktivität

Welche kinetischen Parameter der Serinphosphorylierung durch die IGF-Kinase werden durch die Bindung der PTB geändert? In der Literatur wird beschrieben, dass durch die Bindung des Substrats an die Kinase sich der K_M für das Substrat ändert, jedoch nicht der V_{Max} der Reaktion^[8,188]. Andere Literaturstellen beschreiben, dass sich durch die Bindung des Substrats der K_M nicht ändert, sich aber der Umsatz, angegeben als k_{cat} , durch die Bindung deutlich verschlechtert^[101]. Um dieses Paradoxon aufzuklären, möchte ich ein Modell aufstellen. In diesem Modell wird gedanklich zwischen dem Substrat an sich, der Aminosäure als Phosphat-Akzeptor, und dem gesamten Protein unterschieden. Im Fall von GST-PTB₂₇₅ dient der PTB-Anteil bis Aminosäure Glutamat²⁶³ des Substrats als „Docking“-Protein, das den ersten Kontakt zwischen Kinase und Substrat herstellt. Dieser Teil des Proteins wird nicht durch die Kinase phosphoryliert, was mit Versuchen mit GST-PTB₂₆₃ gezeigt werden konnte (Abbildung 5.18, Seite 59). Der Kontakt erfolgt über den β 5-Strang und der C-terminalen α -Helix der PTB und den N-Terminus der Kinase^[55]. Im Modell wird die PTB-Domäne gedanklich in ein „Docking“-Protein und das eigentlich zu phosphorylierende Serin eingeteilt. Die IGF-Kinase wird in eine Interaktionsseite des

katalytischen Zentrums und die PTB-Bindestelle als Partner für das Docking-Protein, aufgliedert.

Mit Hilfe dieses Modells lassen sich die verschiedenen kinetischen Parameter der Substratphosphorylierung von GST-PTB₂₇₅ durch die IGF-Kinase erklären. Der K_M für das Serinsubstrat im PTB-Protein ist im direkten Vergleich zu einem Tyrosinsubstrat sehr hoch. Dies wird durch Versuche mit der Phe-Mutante offensichtlich. Auch bei hohen Konzentrationen von GST-PTB₂₇₅ wird das Serinsubstrat nicht phosphoryliert (Abbildung 5.9, Seite 45 und Abbildung 5.12, Seite 49). Serin- und Threoninreste werden durch die Struktur der P+1-Schleife der Rezeptortyrosinkinase allein nicht optimal positioniert, dass ein Phosphat Transfer erfolgen kann. Dieser Parameter wird nicht durch die Bindung des PTB-Proteins beeinflusst. Lediglich wird durch das PTB-Docking-Protein bei Bindung an den Juxtamembranbereich der Kinase die lokale Konzentration des Serinsubstrates im aktiven Zentrum der Kinase auf ein Niveau gehoben, dass der hohe K_M überschritten und der Phosphat Transfer ermöglicht wird. Der Phosphat Transfer erfolgt dann in der gleichen Geschwindigkeit wie auf einen Tyrosinrest. Dies wird zum einen durch das frühe zeitliche Auftreten der Serinphosphorylierung gezeigt, zum anderen spricht die parallele Phosphorylierung von Serin- und Tyrosinresten im Substrat GST-PTB_{S270Y} für eine vergleichbar schnelle Phosphorylierung von Tyrosin- und Serinresten.

Für das Gesamtprotein GST-PTB₂₇₅ konnte weder für die Wildtyp-Kinase noch für die bindungsdefiziente Phe-Mutante ein K_M -Wert und ein V_{Max} -Wert ermittelt werden. Diese Parameter beruhen auf einer Michaelis Menten Kinetik. Fraglich ist, ob bei der Phosphorylierung der PTB-Domäne eine solche kinetische Betrachtung zulässig ist.

Bei der Phosphorylierung des Substrats durch die Wildtypkinase fällt auf, dass in jeder durchgeführten Phosphorylierungsreaktion nicht das gesamte Substrat im Ansatz phosphoryliert wird. Es wurde in fast allen Phosphorylierungsreaktionen 1 μ M IGF-Kinase verwendet. Auf das Substrat wurden etwa 0,3 mol Phosphat pro 1 mol Substrat übertragen. Die Akt-Kinase überträgt in diesem Zeitraum etwa 1 mol Phosphat pro 1 mol Substrat. Wie ist dies zu erklären?

Da die Bindung des Gesamt-Proteins GST-PTB₂₇₅ an die Kinase das entscheidende Kriterium für eine Serinphosphorylierung ist, werden alle Substrate im Ansatz, welche

nicht an die Kinase binden, folglich nicht an Serinresten phosphoryliert. Für „freie“ Substrate ist der K_M des Serinsubstrates zu hoch, als dass sie durch die Kinase in Lösung phosphoryliert würden. Für „gebundene“ Substrate wird dies durch die Erhöhung der lokalen Konzentration des Serinrestes möglich, wie es im PTB-Kinasekomplex der Fall ist. In diesem Modell ist die Kinase der limitierende Faktor. Es werden nur gebundene Substrate phosphoryliert. Im Ansatz sind jeweils 30 pmol Kinase anwesend (1 μ M in 30 μ l). Dies korreliert mit dem Phosphat Transfer auf das Substrat im Ansatz. Auch der Plot der Initialgeschwindigkeiten der Kinase bei verschiedenen Substratkonzentrationen (Abbildung 5.9, Seite 45) zeigt, dass die halbmaximale Geschwindigkeit bei etwa 1 μ M Substratprotein erreicht wird. Dies entspricht der eingesetzten Kinasekonzentration. Versuche, in denen die Kinasekonzentration variiert wurde, zeigten, dass sich nicht die Geschwindigkeit der Phosphorylierung änderte, sondern der maximale Transfer auf GST-PTB₂₇₅ mit der Kinasekonzentration korreliert (nicht gezeigt). Aus diesen Gründen ist die Verwendung der Parameter K_M und V_{Max} für die Phosphorylierung des Substrats GST-PTB₂₇₅ nicht zulässig, da bei einem stöchiometrischen 1:1 Verhältnis von Enzym zu Substrat nicht von Michaelis Menten Kinetik gesprochen werden kann. Nur die Substrate werden umgesetzt, die über ihre PTB-Domäne an die Kinase binden.

Wie passen nun die Versuche, welche mit Kinasen mit mutierter Aktivierungsschleife durchgeführt wurden, in das Modell? Grundsätzlich ist durch NMR Untersuchungen bekannt, dass Proteinstrukturen in ständiger Bewegung sind^[189]. Die Kinasemutanten GST-LIRK_{Y1150F} und GST-LIRK_{Y1151F} übertrugen jeweils nur sehr wenig Phosphate auf Serinreste des Substrats GST-PTB₂₇₅ (Abbildung 5.8, Seite 43). Die Bindung des Substrats ist durch das Docking-PTB-Protein bei diesen Kinase nicht gestört, da sich diese Mutationen nicht auf die Bindung über den N-Terminus auswirken. Jedoch scheint durch Mutationen in der Aktivierungsschleife die Affinität für Serinsubstrate weiter erhöht zu werden, da sich die Sekundärstruktur des katalytischen Zentrum verändert.

Diese Kinase Mutanten phosphorylieren auch Tyrosinsubstrate schlechter. Somit hat sich durch die Mutation auch der „ K_M “ für Tyrosinreste erhöht. In der Autophosphorylierung an Tyrosinresten zeigt sich jedoch kein Unterschied zwischen den Kinase-Mutanten (Abbildung 10.23, Seite 169 im Anhang). Da das Substrat (das einzelne Tyrosin) an die Kinase gekoppelt ist, erhöht sich die lokale Konzentration des Substrats im katalytischen

Zentrum, der „K_M“ für die Reaktion wird überschritten und eine Phosphorylierung des Tyrosinrestes wird möglich.

In der Literatur ist dieses Prinzip auch als *Proximity Effect* bekannt^[161-163]. Hierbei wird durch die Kopplung zweiter Reaktanden durch einen aliphatischen Linker die Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen den Reaktanden möglich. Je nach Länge und Flexibilität des Linkers wird die Reaktion überhaupt erst ermöglicht, oder die Geschwindigkeit deutlich erhöht.

Das Prinzip des *Proximity Effects* wurde in dieser Arbeit durch die Kopplung von Kinase und Substrat über das Faltungsdimer GST erreicht (Abbildung 5.16, Seite 56). Für die Wildtypkinase reicht es aus, dass das Substrat über den N-Terminus mit der Kinase eine stabile Kopplung eingeht, um Serinphosphorylierung zu ermöglichen. Für die Phe-Mutante, welche bindungsdefizient für die PTB-Domäne ist, ist die stabile Verbindung zwischen Kinase und Substrat über GST notwendige Bedingung, um Serinreste im Substrat zu phosphorylieren.

Auch der Alanin-Scan kann mit dem Modell in Einklang gebracht werden (Kap 5.4.3 und Kap 5.4.4). Die Ergebnisse zeigen, dass mehr als ein Serin durch die IGF-Kinase phosphoryliert werden kann (Abbildung 5.21, Seite 63 und Abbildung 5.22, Seite 65). Im Fall der PTB-Mutante, in der das Serin²⁷⁴ substituiert wurde, konnte sogar ein erhöhter Phosphat Transfer als für das wildtypische Substrat gemessen werden. Es scheint, dass jedes Serin einen eigenen „K_M“ für die Phosphorylierung durch die Kinase hat. Für drei Serine im C-terminalen Serincluster liegt dieser „K_M“ in einem Bereich, der durch eine Bindung der PTB-Domäne an die Kinase erreicht wird. Dieses scheint für die Serine Serin²⁷², Serin²⁷³ und Serin²⁷⁴ zu gelten.

Warum wird nun die PTB-Domäne nicht mehr an Serinresten phosphoryliert, wenn das Serincluster um einen Linker verschoben wird (vergleiche Kapitel 5.4.7, Abbildung 5.25, Seite 70)? Eine Möglichkeit besteht darin, dass die Flexibilität des Linkers den Effekt der Bindung durch die PTB-Domäne in einer Art kompensiert, dass der „K_M“ für das Serin nicht mehr erreicht wird. Andererseits ist es möglich, dass durch den Linker das Serinsubstrat in seiner globalen Position verschoben wird, und nicht mehr in das aktive Zentrum der Kinase reicht.

Das Modell von Pawson *et al.* spricht für die Verlagerung des Serinsubstrates^[179]. Die Bindung der PTB an die NPEY Sequenz der Kinase führt zu einer Abschirmung des verlagerten Serinclusters, da es nicht bis in das katalytische Zentrum der Kinase hinein reicht. Versuche mit der EGF-Rezeptorkinase sprechen ebenfalls für diese Möglichkeit. Das Konstrukt GST-EGF entspricht der löslichen Kinasedomäne des EGF-Rezeptors von Arginin⁶⁴⁷ bis Alanin¹¹⁸⁶ und enthält C-terminal ein PTB-Bindemotiv in Form der Sequenz NPEY. GST-EGF wurde mir über Affinitätschromatographie gereinigt zur Verfügung gestellt. Eine Phosphorylierung von GST-Y-PTB (vergleiche Kap. 5.1) durch die GST-EGF zeigte ausschließlich Tyrosinphosphorylierung (nicht gezeigt). Der Phosphat Transfer ist vergleichbar mit dem der Phe-Mutante der Insulinrezeptorkinase in Kap. 5.1. Die PASA dieses Versuches zeigte ausschließlich Tyrosinphosphorylierung. Dies spricht für eine „falsche Positionierung“ des Serinsubstrates, so dass es nicht mehr in das aktive Zentrum dieser Kinase reicht und somit nicht phosphoryliert werden kann.

Dass die Spezifität von Tyrosinkinasen in der Komplexbildung aus Substrat und Kinase über Bindungsstellen außerhalb des katalytischen Zentrums begründet ist, wurde bisher in der Literatur nicht beachtet. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch Komplexbildung nicht nur die katalytische Effizienz gesteigert wird, sondern darüber hinaus Tyrosinkinasen ihre Spezifität auf andere Phosphorylaktzeptoren erweitern.

Arbeiten über duale Phosphatasen zeigen, dass dieses allgemeine Prinzip auch bei dieser Enzymklasse greift und anerkannt ist. Am Beispiel der Cdc25-Phosphatase konnten Sohn *et al.* nachweisen, dass der Austausch von wenigen, nicht katalytisch aktiven Resten an der Oberfläche des Proteins ausreicht, die Aktivität der Phosphatase um das 600fache zu senken^[190]. Dieses Prinzip der „Hot-Spot“-Proteininteraktion wurde erstmals parallel von Clackson *et al.* und Schreiber *et al.* 1995 beschrieben^[102,103]. Der Austausch des einzelnen Tyrosins⁹⁵⁰ in der PTB-Bindedomäne der Kinase greift dieses Prinzip auf und führt ebenfalls zu einer deutlichen Abschwächung der Interaktion zwischen Kinase und Substrat. Als Konsequenz daraus ergibt sich eine Verringerung der Kinaseaktivität und Spezifität gegenüber dem natürlichen Substrat IRS-1.

6.7 Wirkt sich der IGF-Kinase-Substrat-Komplex auf nachgeschaltete Serinkinasen aus?

Im Mittelpunkt meiner Arbeit stand die Frage, ob die Ausbildung von Proteinkomplexen

Einfluss auf die Spezifität der Kinase hat. Als Modellreaktion wurde von mir die Interaktion der IGF-1-Rezeptorkinase (IGF-1R) mit der Phosphotyrosin-bindenden Domäne des IRS-1 (PTB) untersucht. Die PTB-Domäne wurde von mir ausgewählt, da sie den ersten Kontakt zwischen dem aktivierten Rezeptor und dem Substrat in der Signalkaskade des IGF-1R und des nah verwandten Insulinrezeptors herstellt.

Die Serinphosphorylierung dieser Domäne des IRS-1 wird für den Abschaltmechanismus der IRS-1-Rezeptor-Wechselwirkung verantwortlich gemacht^[191,192]. Für die beobachtete Serinphosphorylierung von IRS-1 werden in der Literatur unterschiedliche Serinkinasen beschrieben^[193]. Der IGF-1-Rezeptor wird, da es sich um eine Rezeptortyrosinkinase handelt, nicht zu den Kinasen gezählt, die IRS-1 an Serinresten phosphorylieren. Die grundlegenden Überlegungen der Serinphosphorylierung von IRS-1, und den damit verbundenen Konsequenzen für die folgende Signalverarbeitung, beruhen überwiegend auf *in vivo* Versuchen in unterschiedlichen Zelltypen. In allen Versuchen wurden die verwendeten Kinasen und Substrate in den Zellen durch Transfektion überexprimiert, um einen Effekt gegenüber den verwendeten Kontrollzellen zu messen. Jedoch wurde bei diesen Überlegungen der Autoren außer acht gelassen, dass IRS-1 als direktes Substrat des IGF-1-Rezeptors und Insulinrezeptors ein Scaffold-Protein darstellt. Einer der wichtigsten Parameter in Signalkomplexen ist die Konzentration der Scaffold Proteine. Locasale *et al.* weisen darauf hin, dass die Konzentration an Scaffold Proteinen die Aktivierungszeit des Signalosoms stark beeinflusst^[127]. Zudem konnten Levchenko *et al.* zeigen, dass es einer optimalen Scaffold Konzentration bedarf, um einen gesteigerten Signaloutput zu bekommen^[126]. Damit ist fraglich, wie Ergebnisse zu bewerten sind, die auf einer Überexpression von IRS-1 beruhen^[194].

In dieser Arbeit wurden alle Kinase-Assays *in vitro* durchgeführt, um die spezifischen Bedingungen der Substratphosphorylierung der PTB-Domäne herauszuarbeiten. Dies ermöglichte die genaue Zuordnung des jeweiligen Phosphat Transfers zu einer Kinase. Im letzten Teil dieser Arbeit wurde durch Konkurrenzexperimente untersucht, in wie weit nachgeschaltete Serinkinasen fähig sind, Substrate zu phosphorylieren, wenn diese sich in Signalkomplexen befinden. Als nachgeschaltete Serinkinase diente die später im IGF-Signalweg aktivierte Akt-Kinase. Als Kompetitoren wurde sowohl der N-Terminus der IGF-Kinase als auch die volllängen, katalytisch inaktive IGF-Kinase verwendet

(Kapitel 5.5.1). Weiter wurde auch das in Säugetierzellen ubiquitär exprimierte Protein 14-3-3 eingesetzt (Kapitel Fehler: Referenz nicht gefunden5.5.2).

Wird das Substrat GST-PTB₃₇₀ in einem Komplex mit der IGF-Kinase in einen Akt-Kinase-Assay phosphoryliert, so verläuft die zeitliche Phosphorylierung sigmoidal (Abbildung 5.28, Seite 77). Am Anfang der Reaktion ist die Phosphorylierung durch die Akt-Kinase gehemmt. Diese Hemmung geht aber im zeitlichen Verlauf der Reaktion zurück, und das Substrat wird nach 30 min etwa gleich stark phosphoryliert wie das freie Substrat. Das Substrat GST-PTB₃₇₀ zeichnet sich gegenüber GST-PTB₂₇₅ dadurch aus, dass im C-Terminus ein weiteres Serin mit der Akt-Erkennungssequenz lokalisiert ist. Der sigmoidale Verlauf der Phosphorylierung von GST-PTB₃₇₀ kann auf zwei Wegen erklärt werden.

In der Literatur wird das Modell von Obberghen *et al.* präferiert, in dem IRS-1 zuerst schwach an Serin phosphoryliert wird, dann vollständig vom Rezeptor dissoziiert^[155] und anschließend stark an Serin phosphoryliert wird. Es ist jedoch möglich, dass es durch die Phosphorylierung dieser flexiblen Region der PTB-Domäne lediglich zu einer Konformationsänderung kommt. Diese Konformationsänderung hat nicht die Auflösung des Rezeptor-Substrat-Komplexes zur Folge. Es werden lediglich weitere Phosphorylierungsstellen innerhalb des Substrats für die Phosphorylierung zugänglich gemacht. Wird innerhalb von GST-PTB₃₇₀ ein Serin durch die Akt phosphoryliert, so wird durch die Konformationsänderung auch das zweite Serin für die Phosphorylierung zugänglich. Ein phosphorylierungsbedingter Konformationswechsel erklärt zudem, warum die IGF-Kinase nicht das gesamte Substrat im Ansatz phosphoryliert, obwohl das Substrat überwiegend an Serinresten phosphoryliert wird. Das Substrat dissoziiert auch nach der Serinphosphorylierung nicht von der Kinase, sondern erfährt lediglich eine Konformationsänderung. Da der Komplex nicht aufgehoben wird, werden die „freien“ Substrate nicht durch die IGF-Kinase phosphoryliert.

Ebenfalls für einen phosphorylierungsbedingten Konformationswechsel des C-Terminus der PTB-Domäne spricht das Ergebnis der sequenziellen Phosphorylierung der PTB-Domäne durch die IGF-Kinase und die Akt-Kinase (Kapitel 5.5.4). In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung durch die Akt-Kinase keinen Einfluss auf die Phosphorylierung durch die IGF-Kinase hat. Dies spricht zum einen dafür, dass die

IGF-Kinase ein anderes Serin phosphoryliert als die Akt-Kinase. Weiterhin zeigt dieser Versuch aber auch, dass eine bereits serinphosphoryliertes PTB-Domäne ein Substrat für die IGF-Kinase darstellt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass für eine duale Phosphorylierung von Substraten ein stabiler Kinase-Substrat-Komplex vorliegen muss. Folglich dürfte nach dem Modell von Obberghen *et al.* (Ref^[155]) die IGF-Kinase die Serinphosphorylierte PTB nicht mehr als Substrat erkennen. Dies ist jedoch nicht der Fall. Hingegen zeigt der Versuch, dass die Akt-Kinase bei IGF-vorphosphorylierter PTB nicht den gleichen Phosphat Transfer erreicht wie bei unphosphorylierter PTB. Dies spricht für einen phosphorylierungsbedingten Konformationswechsel des C-Terminus.

Ein Vergleich der Phosphorylierung von GST-PTB₃₇₀ durch die Akt-Kinase mit einer Mutante, in der eine Phosphorylierungsstelle substituiert wurde (= GST-PTB_{370 S270A}), zeigt, dass eine Konkurrenz durch katalytisch inaktive IGF-Kinase nicht vollständig ist (Abbildung 6.1). Die Phosphorylierung erfolgte unter radioaktiven Standardbedingungen. Es wurden je 3 µM Substrat zuerst mit 10 µM phosphorylierter GST-IGF_{D→A} für 15 min auf Eis vorinkubiert und anschließend auf Eis retemperiert. Anschließend wurde das Substrat durch 0,5 µM GST-Akt_{Oca} zeitabhängig phosphoryliert. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden dem Ansatz 30 µl entnommen, über SDS-PAGE aufgetrennt und über eine Autoradiographie dokumentiert.

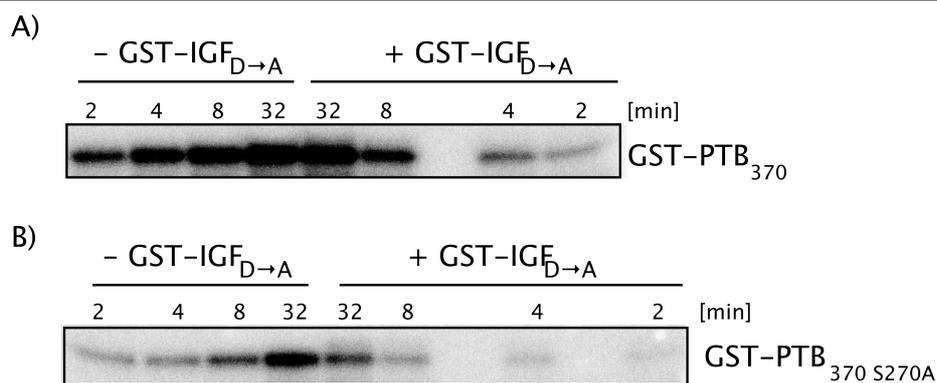


Abbildung 6.1.: Autoradiographie der durch GST-Akt_{Oca} phosphorylierten GST-PTB₃₇₀ (A) und GST-PTB_{370 S270A} (B) in Anwesenheit von GST-IGF_{D→A}.

Die katalytisch inaktive IGF-Kinase wirkt kompetitierend auf die Akt-Kinase. Bei beiden Substraten kommt es zu einer verringerten Phosphorylierung des Substrats, wenn GST-IGF_{D→A} im Ansatz vorliegt.

In Abbildung 6.1 ist zu sehen, dass die Mutante mit nur einer Akt-Phosphorylierungsstelle im Vergleich zur Wildtyp-PTB schlechter phosphoryliert wird. Ist nun GST-IGF_{D→A} im

Ansatz, so wird die Akt bei der Phosphorylierung der Wildtyp-PTB über einen Zeitraum von 8 min inhibiert. Nach 32 min ist die Phosphorylierung vergleichbar mit der Phosphorylierung ohne Zugabe von GST-IGF_{D→A}. Bei der Mutante ist dieser inhibierende Effekt des IGF-Kinase-PTB-Komplexes über den gesamten Zeitraum von 32 min wirksam. Es scheint, als ob durch den Komplex aus PTB und IGF-Kinase, ein Serin für die Akt Kinase nicht mehr zugänglich ist. Durch die Phosphorylierung eines Serins kann es zu einer Konformationsänderung des C-Terminus kommen, und beide Serinreste für die Akt-Kinase zugänglich werden.

Dass in der PTB-Mutante im Kinase-Substratkomplex überhaupt Phosphorylierung auftritt, zeigt, dass der Komplex aus IGF-Kinase und PTB nicht starr ist. Während die PTB-Domäne an die Kinase gebunden ist, ist dies für den flexiblen C-Terminus der PTB-Domäne keine unmittelbare Voraussetzung.

Werden nun GST-PTB₃₇₀ und GST-14-3-3 γ in einen Kinase-Assay mit der Akt-Kinase eingesetzt, so wird das Substrat über den gesamten Zeitraum von 30 min schlechter phosphoryliert als das freie Substrat (Abbildung 5.30, Seite 80); folglich konkurriert 14-3-3 mit der Akt-Kinase um das Substrat. In der Literatur wird beschrieben, dass 14-3-3 überwiegend an Phosphoserine in Proteinen bindet^[166]. In unserer Arbeitsgruppe konnte wiederholt gezeigt werden, dass 14-3-3 auch mit unphosphorylierten Serinresten interagiert^[168].

Werden GST-IGF_{D→A} und GST-14-3-3 γ als Kompetitoren in der Phosphorylierungsreaktion verwendet, so wurde ein starker Rückgang des Phosphat Transfers beobachtet. (Abbildung 5.33, Seite 83). In diesem Fall war die Gesamte Proteinkonzentration im Ansatz sehr hoch (1,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ zu sonst üblichen 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Dies spricht für das von Pawson *et al.* beschriebene Modell^[179], in dem durch Bindung zweier Proteine Bindungsstellen oder Phosphorylierungsstellen für andere Kinasen oder Phosphatasen sterisch abgeblockt werden. Ein weiterer Aspekt der hohen Proteinkonzentration ist die Viskosität des Phosphorylierungsansatzes und das Diffusionsverhalten aller beteiligten Moleküle. 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ bzw. 1,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ spiegeln nicht die Proteinkonzentrationen des Zytoplasmas von intakten Zellen wieder, die das so genannte *molecular crowding* verursachen^[195]. Jedoch müssen auch diese Effekte für eine

Spezifitätsbestimmung einer Kinase berücksichtigt werden. Somit ist es fraglich, ob in intakten Zellen die Akt-Kinase als nachgeschaltete Serinkinase das Substrat IRS-1 in dem Maße phosphorylieren kann, wie dies in der Literatur beschrieben wird.

Dadurch dass sich IRS-1 in einem Komplex mit dem Rezeptor befindet, und damit die Aspekte des *molecular crowding* und der Abschirmung durch andere Proteine entfallen, birgt dieses Modell der intrinsischen Serin-/Threoninkinaseaktivität der IGF-1R-Kinase und der IR-Kinase die Möglichkeit einer homologen Desensibilisierung.

6.8 Resümee und Ausblick

Die MEK-Kinase ist als ein anerkannter Vertreter dualen Kinasen in Säugern. Die strukturelle Aufklärung der MEK-Kinase erbrachte keine Aufschlüsse über den Mechanismus der dualen Kinaseaktivität^[10]. Unsere Arbeitsgruppe konnte schon für den Insulinrezeptor und die lösliche Insulinrezeptorkinasedomäne (IRKD) duale Aktivität in der Autophosphorylierung zeigen. Für duale Substratphosphorylierung durch die IRKD war bisher immer die Verwendung von Polylysin oder Histon2B als molekulare Vernetzer notwendig. Die Determinanten der dualen Kinaseaktivität blieben bisher ungeklärt.

Für Tyrosinkinasen ist bekannt, dass diese Substratpeptide und Substrate, welche nicht mit der Kinase interagieren, deutlich langsamer phosphorylieren als die entsprechenden bindenden Substrate^[183,185,186,196]. Dies vernachlässigt den Gedanken, dass Tyrosinkinasen mit ihren natürlichen Substraten immer Komplexe über „Docking“-Domänen wie die SH2-Domäne oder die PTB-Domäne eingehen^[179]. Somit muss der Gedanke der Aktivität und Spezifität von Tyrosinkinasen neu überdacht werden.

In dieser Arbeit wird ein Modell vorgestellt, das nicht nur die Spezifität von Tyrosinkinasen, sondern zudem auch die Begründung der dualen Kinaseaktivität erklärt. Dieses Modell trennt die Interaktion von Substrat und Kinase über „Docking“-Interaktionen von der Interaktion der Phosphorylakzeptoren mit dem katalytischen Zentrum. Der Mechanismus der Phosphorylierung ist somit nicht durch die kinetischen Parameter einer Michaelis-Menten-Kinetik zu beschreiben, da Kinase und Substrat einen 1:1-Komplex bilden und somit eine „quasi“-intramolekulare Reaktion durchführen. Durch dieses Modell lässt sich die Spezifität von Tyrosinkinasen erklären, indem einer Kinase für jeden Phosphorylakzeptor im Substratprotein eine Präferenz zugeordnet werden kann.

Diese Präferenz wird zum einen durch die Eigenschaften des Kinase-Substrat-Komplexes bestimmt. Hier ist die Aufenthaltsdauer des „Docking“-Proteins im Komplex mit der Kinase, sowie die Flexibilität der zu phosphorylierenden Aminosäurereste entscheidend. Weiterhin hat aber auch die räumliche Positionierung der Phosphorylakzeptoren auf die Spezifität der Phosphorylierung großen Einfluss. Letztendlich entscheidet bei Tyrosinkinase nicht die optimale Positionierung des Phosphorylakzeptors durch den P+1-Loop der Kinase über die Spezifität. Vielmehr ist die lokale Konzentrationserhöhung der Aminosäure in der Nähe des aktiven Zentrums entscheidend. Dies wird durch Bindung von Docking-Proteinen an eine strukturell getrennte Region der Kinase erreicht. Für Signalkomplexe erklärt sich aus dem Modell über die Steigerung der Kinaseaktivität hinaus die Möglichkeit der Erweiterung der Kinasespezifität auf andere Phosphorylakzeptoren als Tyrosin. Dies konnte modellhaft für das Substrat der Phosphotyrosin-bindenden Domäne (PTB) des humanen Insulinrezeptorsubstrat (IRS-1) und der löslichen IGF-1-Kinasedomäne gezeigt werden. Die IGF-Kinase phosphoryliert das gebundene Substrat, je nach angebotenen Phosphorylakzeptoren, an Tyrosin-, Threonin-, und Serinresten. „Freie“ Substrate werden durch die IGF-Kinase nicht oder wesentlich schlechter phosphoryliert.

Das Modell bietet darüber hinaus einen eleganten Ansatz zur Aufklärung des dualen Kinasemechanismus der MEK-Kinase, da auch die Aufklärung der Röntgenstruktur keine neuen Erkenntnisse brachte.

In dieser Arbeit wurden zudem die Auswirkungen von Signalosomen auf nachgeschaltete Effektorkinasen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Protein-Komplexe in sich geschlossene Systeme darstellen, und Effektoren außerhalb dieses Komplexes eine schwächere Aktivität aufweisen. Dies ist mit den Aussagen von Locasale *et al.* vereinbar^[197]: geschlossene Systeme müssen für Aktivitäts- und Spezifitäts-Charakterisierungen getrennt untersucht werden. Nur so können weitverzweigte Signalwege eindeutig bestimmt, und Fragen des Signaloutputs in molekularen Systemen beantwortet werden.

7 Material

7.1 Bakterienstämme, Viren, Kulturmedien und –Zusätze

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

7.2 Chemikalien

A

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

B

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

C

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

Material

(Coomassie Brilliant) Blue G-250	Serva, Heidelberg
(Coomassie Brilliant) Blue R-250	Serva, Heidelberg
<u>D</u>	
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Taufkirchen
<u>E</u>	
Essigsäure, >97%, p.a.	Roth, Karlsruhe
Ethanol, absolut, p.a.	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethylen Glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-	
Tetraessigsäure (EGTA)	AppliChem, Darmstadt
<u>G</u>	
Gel Red	Biotium Inc., Köln
Glutathion-L, reduziert	Boehringer, Mannheim
Glycerin	Serva, Heidelberg
Glycin, <i>electrophoresis grade</i>	ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA
<u>I</u>	
Imidazol	Merck, Darmstadt
Isopropanol, p.a.	Merck, Darmstadt
Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG)	Biomol, Hamburg
<u>K</u>	
Kaliumchlorid-hexahydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat, p.a.	Merck, Darmstadt
di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
<u>L</u>	
Leupeptin	Sigma, Taufkirchen
<u>M</u>	
Magnesiumchlorid-Hexahydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
Mangan(II)chlorid-Tetrahydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
Methanol, p.a.	Roth, Karlsruhe
<u>N</u>	
Natriumacetat, wasserfrei,	p.a. Merck, Darmstadt
Natriumazid, reinst	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid p.a.	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Sigma, Taufkirchen

Ninhydrin	Merck, Darmstadt
<u>P</u>	
Perchlorsäure, 70%	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Taufkirchen
Phosphorsäure	Fluka, Buchs, CH
Ponceau S	Merck, Darmstadt
i-Propanol, p.a	.Merck, Darmstadt
<u>S</u>	
D(+)-Saccharose, p.a.	Roth, Karlsruhe
Salzsäure, 37 %	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure, 98 %	Merck, Darmstadt
Sucrose Ultra Pure	MP Biomedicals LLC, Illkirch, F
Serva Blue G	Serva, Heidelberg
Serva Blue R	Serva, Heidelberg
<u>T</u>	
2,4,6-Trichloranisol (TCA)	AppliChem, Darmstadt
TCEP	Fluka, Taufkirchen
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Triton-X-100®, p.a.	Boehringer, Mannheim
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Sigma, Taufkirchen
Trypsin	Aldrich, Taufkirchen
Tween-20 (Polyoxyethylensorbitmonolaureat)	BioRad, München
<u>X</u>	
Xylencyanol FF (XC)	Sigma, Taufkirchen

7.3 Chromatographiematerial

Matrixmaterial:

Glutathion-Sepharose-4B

Pharmacia, Freiburg

Nickel-NTA Agarose

Qiagen, Hilden

Fertigsäule:

Nucleogel SAX1000-8/46 (50 x 4,6 mm)

Machery & Nagel, Düren

7.4 Kit-Systeme

BaculoGold™-Transfection Kit

PharminGen, San Diego, CA, USA

GenElute™ Plasmid Miniprep Kit

Sigma, Steinheim

Nucleobond® AX 100 Plasmid Kit

Machery & Nagel, Düren

my-Budget Double Pure Kit
Krefeld

Bio-Budget Technologies GmbH,

QIAquick™ PCR Purification Kit

Qiagen, Hilden

7.5 Laborgeräte

A

Autoklaven:

Tischautoklav Tuttbauer 2540 EL

Tuttbauer, Jerusalem, Israel

Varioklav Dampfsterilisator

H+P Labortechnik, München

B

BioLogic Workstation

BioRad, München

(inkl. Molecular Analyst Software)

E

Elektrophorese-Apparaturen:

Mighty Small SE245 „Dual Gel Caster“

Hofer, San Francisco, CA, USA

Novex EI 9001-XCELL 2 Mini-Cell

Novex, San Diego, CA, USA

Electroporator 2510

Eppendorf, Hamburg

G

Geltrockner:

Model 543

BioRad, München

Phero-Temp

Biotec Fischer, Reiskirchen

Gelgießsystem

BioRad, München

H

Heizblock HB-130

Unitek

HetoVac VR1 + HetoTrap CT110

Heto, Birkerød, Dänemark

Homogenisator

Braun, Melsungen

I

VP-ITC MicroCalorimeter

MicroCal, LLC, Northampton USA

Inkubatoren:

EB 28

WTB Binder, Tuttlingen

FD 53

WTB Binder, Tuttlingen

Inkubator Shaker innova 4000
USA

New Brunswick Sci., Edison, NJ,

L

Leuchttisch

Nonius, Delft, NL

M

Microplate Reader Model 550

BioRad, München

Mikroskop Wilovert S

Hund, Wetzlar

Molecular Imager System GS 363

Molecular Imaging Screen-C

Molecular Imaging Screen-BI

Eraser GS 505

Sample Exposure Platform GS 505

BioRad, München

P**PCR-Gerät:**

Mastercycler 5330

Eppendorf, Hamburg

Pipetten:

Pipetman (P20, P100, P200)

Gilson, Bad Camberg

Eppendorf Research (0,5-10 µl; 10-100µl, 100-1000 µl)

Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

Hamilton Microliter™ Spritze

Hamilton, Bonaduz, Schweiz

Peristaltikpumpe Minipuls 2

Gilson, Arnouville Les Gonesse, F

Photometer DU 7400

Beckman, München

R**Rühr- Schüttel- und Mischgeräte:**

Ikamag Magnetrührer mit Heizplatte

Janke&Kunkel, Staufen

Ikamag Magnetrührer Reverstir Model RS 8

Toyo Kagaku Sangyo Co., Japan

IKA-Vibrax-VXR

Janke&Kunkel, Staufen

Rollschüttler RM-5

Braun, Melsungen

Rotoren:

HFA 12.500, HFA 22.50

Heraeus, Düsseldorf

70Ti, 45Ti

Beckmann, München

S**Spannungsgeber:**

EPS 3.500

Pharmacia, Feiburg

3000 Xi

BioRad, München

PowerPac 3000

BioRad, München

SpeedVac SC110 + Refrigerated Vapor Trap RVT4104

Savant, Farmingdale, NY, USA

Sterilbank LB-48-C Lamin Air®

Heraeus, Düsseldorf

T

Thermomixer 5436

Eppendorf, Hamburg

U

Ultraschallprozessor UP 200H

Dr. Hielscher GmbH, Teltow

UV-Leuchttisch N90 MW 312nm

Konrad Bend, Wiesloch

V

Vakuumpumpe

Vakuubrand, Wertheim

W**Waagen:**

Analysewaage

Sartorius, Göttingen

Feinwaage

Sartorius, Göttingen

Wasserbäder:

Julabo 13A

Julabo, Seelbach

Julabo F10

Julabo, Seelbach

Material

Julabo UC

Julabo, Seelbach

Western Blot-Apparatur:

Novablot Electrophoretic Transfer Kit

LKB/Pharmacia, Freiburg

BioRad Mini 2-D-Cell ("Tank-Blot")

BioRad, München

Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q Plus

Millipore, Bedford, PA, USA

Z

Zentrifugen:

Centrifuge 5415 C (Tischzentrifuge)

Eppendorf, Hamburg

EBA 12 R

Hettich, Tuttingen

Mikrozentrifuge Hf-120 Capsule

Qualitron, Korea

Variofuge 20 RS, 3.0 RS

Heraeus, Düsseldorf

XL-70 Ultrazentrifuge

Beckmann, München

Zählkammer nach Neubauer, improved

Brand GmbH, Wertheim

7.6 Molekulargewichte und Massenstandards

GeneRuler™ DNA Ladder Mix

MBI Fermentas, Wilna, Litauen

MassRuler™ DNA Ladder Mix

MBI Fermentas, Wilna, Litauen

Prestained SDS-PAGE Molecular WeightMarker (Broad Range)

MBI Fermentas, Wilna, Litauen

SDS Molecular Weight Marker (Broad Range)

MBI Fermentas, Wilna, Litauen

7.7 Nucleinsäuren

7.7.1 Plasmidvektoren

pAcG2T-IRKD His

D. Keßler

pAcG2T-TEV-His

Pharmingen, San Diego, USA

pGex-3X

GE Healthcare, USA

pet21a(+)-Nt-His-TS-Ct-Cys

Wirtz, AG Klein 2007

pCis2-IRS-1

Quon et al. 1994

7.7.2 Primer

Alle Primer wurden von Sigma-Genosys (Steinheim) bereits entsalzt bezogen.

7.7.2.1 Primer für die PTB-Domäne des humanen IRS-1

PTB P158 5'

5'-CGT GGG ATC CCC GCA TTC AAA GAG GTC TGG CAA G-3'

PTB N275 3'

5'-CGA TGA ATT CTA GTT GGA CGA GGA CTG GCT CTT GCT G-3'

PTB Kurz bis E263 3'

5'-CGA TGA GAA TTC CTA CTC ATC ACT CAT GGC CCG CAT GGC CTC-3'

7.7.2.2 Primer für den ersten Ala-Scan

Es wurde durch Variation des 3' Primers immer ein Serin des Serinclusters durch Alanin substituiert. Das Konstrukt GST-PTB_{S270A} lag in unserer Arbeitsgruppe vor. Das Konstrukt GST-PTB_{S272A} wurde durch *site-directed mutagenesis* mit zwei Primern, welche die Mutation tagen erzeugt.

3'-S68A

5'-CGA TGA ATT CTA GTT GGA CGA GGA CTG GGC CTT GGC GCG AG-3'

5'-S72A

5'-AAG AGC CAG GCC TCG AGC AAC TAG AAT TC-3'

3'-S72A

5'-AAT TCT AGT TGC TGC AGG CCT GGC TCT TGC-3'

3'-S73A

5'-CGA TGA ATT CTA GTT GGA CGC GGA CTG GCT CTT GCT G-3'

3'-S74A

5'-CGA TGA ATT CTA GTT GGC CGA GGA CTG GCT CTT GCT G-3'

3'-S270Y

5'-CGA TGA ATT CTA GTT GGA CGA GGA CTG GTA CTT GCT G-3'

3'-S270T

5'-CGA TGA ATT CTA GTT GGA CGA GGA CTG GGT CTT GCT G-3'

7.7.2.3 Primer für den zweiten Ala-Scan

Durch Variation des 3' Primers wurden alle Serine des Serinclusters durch Alanin substituiert. Immer ein Serin blieb von der Substitution unberührt.

3'-68S

5'-CGA TGA ATT CTA GTT GGC CGC GGC CTG GGC CTT GCT GCG AG-3'

3'-70S

5'-CGA TGA ATT CTA GTT GGC CGC GGC CTG GCT CTT GGC GCG AG-3'

3'-72S

5'-CGA TGA ATT CTA GTT GGC CGC GGA CTG GGC CTT GGC GCG AG-3'

3'-73S

5'-CGA TGA ATT CTA GTT GGC CGA GGC CTG GGC CTT GGC GCG AG-3'

3'-74S

5'-CGA TGA ATT CTA GTT GGA CGC GGC CTG GGC CTT GGC GCG AG-3'

7.7.2.4 Klonierung des Serinclusters der PTB

Das Cluster wurde durch Hybridisierung von zwei Linker-Primern erzeugt, phosphoryliert und in den Vektor His-Tyrtide-SPeptid-rCys kloniert.

Linker 3'

5'-AAT TGT TGC TGC TGC TCT GGC TTT TGC TGC GCG GGC GG-3'

Linker 5'

5'-GAT CCC GCC CGC GCA GCA AAA GCC AGA GCA GCA GCA AC-3'

7.7.2.5 Klonierung der PTB Domäne für den Vektor His-Tyrtide-S₂Peptid-rCys

PTB rCYS 5'

5'-TGG ATC CAT CCC CGC ATT CAA AGA GGT CTG GAA G-3'

PTB rCYS 3'

5'-CGA TGA ATT CCA GTT GGA CGA GGA CTG GCT CTT GCT G-3'

7.8 Proteine

7.8.1 DNA-modifizierende Enzyme und zugehörige Puffer

Antarctic Phosphatase	NEB, Beverly, MA, USA
Antarctic Phosphatase Puffer	NEB, Beverly, MA, USA
Alkaline Phosphatase	NEB, Beverly, MA, USA
Alkaline Phosphatase Puffer	NEB, Beverly, MA, USA
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, Wilna, Litauen
T4-DNA-Ligase-Puffer	MBI Fermentas, Wilna, Litauen
Pfu-DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
Cloned Pfu Buffer	Promega, Mannheim
dNTP-Mix	Roche, Basel, CH
BamHI	Roche, Basel, CH
EcoRI	Roche, Basel, CH
Puffer B	Roche, Basel, CH

7.8.2 Proteasen

Trypsin	Boehringer, Mannheim
---------	----------------------

7.9 Puffer und Lösungen

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

Ampicillin (1000x)

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

ATP-Stocklösung

100 mM ATP in 50 mM Tris-HCl

Blockierungspuffer für Western Blots

1% (w/v) BSA in PBS, 0,02% NaN₃

alternativ: 5% (w/v) Milchpulver in TBS

Bradford-Färbereagenz

a) für 1-10 µg Protein:

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

b) für 0,1-2 µg Protein:

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

Destain

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

DNA-Probenpuffer (10x)

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

Der Puffer kann mit Wasser (Manniatis *et al.* 1975) oder mit TE-Puffer angesetzt werden.

EDTA-Lösung

0,5 M EDTA-NaOH

Elutionspuffer für Glutathion-Sepharose Affinitätsreinigung

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

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

Kolloidale Peptid-Färbelösung (1 l)

0,8 g Coomassie Brilliant Blue G250 in 400 ml MQ unter Rühren lösen, 400 ml 1 M H₂SO₄ zugeben, 3 h rühren, über Faltenfilter filtrieren, 88 ml 10 M KOH zugeben, 124 ml 100% (w/v) TCA hinzufügen

Kulturmedium

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

Fungizone (Endkonzentration: 2,5 µg/ml)

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

Grace's Insektenmedium phosphatfrei

Leupeptin-Stammlösung (1000x)

10 mg/ml Leupeptin

Lysispuffer mit Protease-Inhibitoren

250 mM Saccharose, 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 Complete Tablette auf 50 ml Lysispuffer

Nativer Laufpuffer

384 mM Glycin, 50 mM Tris-HCl

Nativer Probenpuffer (4x)

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

Natriumacetat-Lösung

3 M NaOAc-HAc, pH 5,2

Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie-Puffer

His-Lysispuffer

Material

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

His-Waschpuffer

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

His-Elutionspuffer

50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 45 mM Imidazol, pH 8,0

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

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

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

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

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

Ponceau-Rot Peptidfärbelösung

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

PBS-Puffer

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

Phosphorylierungs-Puffer (10x), Standardbedingungen

300 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM DTT, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5)

PMSF-Stammlösung (100x)

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

Puffer für DNA-Midipräparation

Puffer S1

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

Puffer S2

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

Puffer S3

2,8 M KAc pH 5,1

Puffer N2

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

Puffer N3

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

Puffer N5

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

Regenerationspuffer 1 für Glutathion-Sepharose Affinitätsreinigung

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

Regenerationspuffer 2 für Glutathion-Sepharose Affinitätsreinigung

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

SDS-Laufpuffer (1x)

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

SDS-Probenpuffer (10x)

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

Spot-Test-Färbelösung

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

Spot-Test-Entfärbelösung

Siehe Destain

TBE-Puffer (10x)

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

TBS-Puffer

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

TBS/Tween

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

TE-Puffer

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

TNES-Puffer

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

TE-RNase-Puffer

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

TEV-Spaltungspuffer (10x)

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

Tris-Puffer (1)

50 mM Tris-HCl, pH 7,5

Tris-Puffer (2, Sammelgel)

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

Tris-Puffer (3, Trenngel)

3 M Tris-HCl, pH 8,8

Tris-Glycin

240 mM Tris, 240 mM Glycin

Western Blot Entwicklungspuffer

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

Material

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

Wet Blot Puffer

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

7.10 Verbrauchsmaterial

A

Amicon® Ultra 15 Mikrokonzentrator (30 kDa)

Millipore, Bedford, PA, USA

F

Filtermaterial

0,2 µm Dyngard ME Sterilfilter

Microgon, CA, USA

0,22 µm Type GS (Ø 4,9 cm)

Millipore, Bedford, PA, USA

0,45 µm Type GS (Ø 4,9 cm)

Millipore, Bedford, PA, USA

Membranfilter ME 24 (0,2 µm , Ø 47 mm)

Schleicher und Schuell GmbH, Dassel

Filterpapier

Faltenfilter (Ø 125 und 270 mm)

Schleicger und Schuell GmbH, Dassel

Munktell Grade 1F

LKB, Pharmacia, Freiburg

Whatman 3T

Whatman, Maidstone, GB

Filme

Kodak Scientific Imaging Film

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

K

Quarzküvetten

Hellma, Mannheim

Typ 105.200-QS

Schichtdicke 10 mm

Zentrum 8,5 mm

P

Sarstedt Serological Pipette (1-25 ml, steril)

Sarstedt, Nümbrecht

PVDF-Membran Immobilon P

Millipore, Bedford, PA, USA

R

Reaktionsgefäße

Falcon BLUE MAX™ (aus Polypropylen, 15 und 50 ml)
USA

Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ,

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

Sarstadt, Nümbrecht

PCR-Tubes (0,5 ml)

Sarstedt,Nümbrecht

7.11 EDV und genutzte Programme

7.11.1 Datenerfassung

Agarosegele, Polyacralamidgele und ³²P-Autoradiogramme nach Phosphoimagery wurden mit einem Bio-Rad Imaging System erfasst. Zur Bilderfassung und wurde die im Lieferumfang

enthaltene Software „Molecular Analyst“ verwendet. Zur Densitometrie und Auswertung von ³²P-Autoradiogrammen wurde die Funktion „Analyse Volume Object List“ eingesetzt.

Western Blots, gefärbte Dünnschichtchromatogramme und gefärbte Kieselgelplatten wurden gescannt. Die digitale Bildbearbeitung erfolgte mit der Software Adobe Photoshop CS2. Insbesondere wurden Bilder beschnitten oder in Kontrast oder Helligkeit angepasst.

7.11.2 Densitometrie

Zur densitometrischen Auswertung der Färbungsintensität einzelner Gelbanden wurden die gefärbten Gele zunächst fotografiert (s. Datenerfassung). Anschließend wurden Bereiche gleicher Fläche definiert, deren Schwärzung über das Modul „Analyse Volumes Object List“ des Programms „Molecular Analyst“ gemessen wurde. Stattdessen wurde auch das open source Programm Image J verwendet. Die besten Ergebnisse ergaben sich bei der Definition elliptischer Messbereiche, die die gefärbten Banden eng umschlossen.

7.11.3 Molekularbiologische Standardanwendungen

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

7.11.4 Programme zur Bilderfassung und -bearbeitung

Eingescannte Bilder von Gelen oder Autoradiographien wurden mit Adobe Photoshop CS2 und Adobe Illustator nach bearbeitet.

8 Methoden

8.1 Molekularbiologische Methoden

Folgende molekularbiologischen Methoden wurden gemäß Standardprotokollen nach Sambrook et al.(1989)^[198] durchgeführt:

- Agarose-Gelelektrophorese, Ethanol-fällung von DNA, Restriktionsendonukleolytische Spaltung, Ligation, Konzentrationsbestimmung von DNA.
- Plasmid-"Mini"-Präparationen für Restriktionsanalysen erfolgten nach Zhou et al. (1990)^[199] bzw. mit
- dem Sigma-Kitsystem nach Herstellerangaben.
- Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem Qiaex-Kitsystem (Quiagen.)
- Die Sequenzierung von DNA wurde von der Firma GENterprise durchgeführt. Dazu wurden 500 µg Plasmid mit 1 µM Primer in einem Gesamtansatz von 6 µl analysiert.
- Zellen des *E.coli* Stammes DH5a bzw. BI21 wurden bei 37 °C in Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) und auf LB-Agarplatten kultiviert.
- Kompetente Bakterien wurden nach Chung et al. (1989) mit TSS Puffer (85 % LB-Medium, 10 % (w/v) Polyethylenglycol, 5 % (v/v) DMSO, 50 mM MgCl₂, pH 6,5) hergestellt und bei -80 °C gelagert. Die Transformation von Bakterienzellen erfolgte durch Hitzeschock (1,5 min, 42 °C)^[200].

8.1.1 Klonierung von GST-PTB₂₆₃

Die DNA der C-terminal verkürzten PTB-Domäne des humanen IRS-1 wurde mittels PCR generiert. Mittels der unter 7.7.2.1 beschriebenen Oligonucleotidprimer wurde das verkürzte Stück amplifiziert. Als Template wurde der Vektor pCis2-IRS-1 verwendet, der die kodierende Sequenz für das gesamte humane IRS-1 trägt. Die Primer flankierten das 5'-Ende der resultierenden DNA mit der Restriktionsschnittstelle BamHI und das 3'-Ende mit der Restriktionsschnittstelle EcoRI. Die resultierende DNA wurde zuerst mit DpnI behandelt und anschließend mit den Restriktionsendonucleasen BamHI und EcoRI geschnitten und den mit BamHI/EcoRI linearisierten Vektor pGex-3x ligiert. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde mittels Sequenzierung überprüft.

Der Expressionsvektor pGex-3x-PTB₂₆₃ führt zur Expression der durch GST dimeren verkürzten PTB-Domäne von Aminosäure Prolin¹⁵⁸ bis Glutamat²⁶³.

8.1.2 Klonierung der Single-Ala-PTB-Mutanten des ersten Alanin-Scans

Der Austausch der Serine 268, 270, 272, 273 und 274 durch Alanin erfolgte jeweils durch PCR. Als Template wurde der Vektor pCis2-IRS-1 verwendet, der die kodierende Sequenz für das gesamte humane IRS-1 trägt. Die Primer (siehe 7.7.2.2) flankierten das 5'-Ende der resultierenden

DNA mit der Restriktionsschnittstelle BamHI und das 3'-Ende mit der Restriktionsschnittstelle EcoRI. Der jeweilige 3'-Primer trägt jeweils eine Punktmutation um die einzelnen Substitution zu ermöglichen. Die resultierende DNA wurde zuerst mit DpnI behandelt und anschließend mit den Restriktionseendonucleasen BamHI und EcoRI geschnitten und in die BamHI/EcoRI linearisierten Vektoren pGex-3x ligiert. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde mittels Sequenzierung überprüft.

Die Expressionsvektoren pGex-3x-PTB_{S68A}, pGex-3x-PTB_{S70A}, pGex-3x-PTB_{S72A}, pGex-3x-PTB_{S73A} und pGex-3x-PTB_{S74A} führt zur Expression der durch GST dimeren PTB-Varianten in denen jeweils ein Serin des Serinclusters durch Alanin substituiert ist.

8.1.3 Klonierung von Single-S-PTB-Mutanten für den zweiten Alanin-Scan

Der Austausch aller Serine des C-terminalen Clusters der PTB-Domäne durch Alanin mit Ausnahme jeweils nur eines einzelnen Serins erfolgte jeweils durch PCR. Als Template wurde der Vektor pCis2-IRS-1 verwendet, der die kodierende Sequenz für das gesamte humane IRS-1 trägt. Die Primer flankierten das 5'-Ende der resultierenden DNA mit der Restriktionsschnittstelle BamHI und das 3'-Ende mit der Restriktionsschnittstelle EcoRI. Der jeweilige 3'-Primer (siehe 7.7.2.3) trägt jeweils mehrere Punktmutationen um die einzelnen Substitution zu ermöglichen. Die resultierende DNA wurde zuerst mit DpnI behandelt und anschließend mit den Restriktionseendonucleasen BamHI und EcoRI geschnitten und in den mit BamHI/EcoRI linearisierten Vektor pGex-3x ligiert. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde mittels Sequenzierung überprüft.

Die Expressionsvektoren pGex-3x-PTB_{S68}, pGex-3x-PTB_{S70}, pGex-3x-PTB_{S72}, pGex-3x-PTB_{S73} und pGex-3x-PTB_{S74} führt zur Expression der durch GST dimeren PTB-Varianten in denen jeweils alle Serin des Serinclusters durch Alanin substituiert ist. Das Serinsubstrat welches noch in der Mutante zur phosphorylierung zur Verfügung steht ist jeweils angeben.

8.1.4 Klonierung von His-Tyrtide-SPeptid-rCys

Das Peptid des Serinclusters wurde mit den Linkern, welche unter 7.7.2.4 zwischen die Tev-Site und die Sequenz des reaktiven Cysteins in den *E.Coli*-Expressionsvektor pet21a(+)-Nt-His-Y612-TS-Ct-Cys kloniert. Dazu wurden die Oligonucleotide (7.7.2.4) nach Standardmethode hybridisiert, mit der Polynucleotidkinase phosphoryliert und anschließend in den BamHI/EcoRI linearisierten pet-21a(+)-Nt-His-TS-CtCys-Vektor ligiert Die Linker sind so konzipiert, dass durch die Ligation die BamHI-Schnittstelle wegfällt, so dass die Klone durch Restriktionsanalyse mit den

Endonucleasen BamHI und NdeI auf die Erfolgreiche Ligation hin untersucht werden konnten. Die erhaltenen Plasmide wurden mittels DNA-Sequenzierung analysiert.

Die Expression des Vektors pet21a(+)-Nt-His-Y612-TS-SPEptid-Ct-Cys führt zur Expression des Proteins Tyrtide mit anschließender TEV-Proteaseschnittstelle und dem C-terminalen Serincluster.

8.1.5 Klonierung von His-PTB263-SPEptid-rCys.

Die PTB-Domäne des IRS-1 von Aminosäure Prolin¹⁵⁸ bis Glutamat²⁶³ wurde mit den Primern mittels PCR generiert. Mittels der unter 7.7.2.5 beschriebenen Oligonucleotidprimer wurde das verkürzte Stück amplifiziert. Als Template wurde der Vektor pCis2-IRS-1 verwendet, der die kodierende Sequenz für das gesamte humane IRS-1 trägt. Die Primer flankierten das 5'-Ende der resultierenden DNA mit der Restriktionsschnittstelle BamHI und das 3'-Ende mit der Restriktionsschnittstelle EcoRI. Die resultierende DNA wurde zuerst mit DpnI behandelt und anschließend mit den Restriktionsendonucleasen NdeI und XhoI geschnitten. Aus dem Vektor pet21a(+)-Nt-His-Y612-TS-SPEptid-Ct-Cys wurde durch Restriktion mit den Restriktionsendonucleasen NdeI und XhoI die Sequenz des Tyrtide-Proteins entfernt, der Vektor durch Gelextraktion gereinigt und durch alkalische Phosphatase dephosphoryliert. In den linearisierten Vektor wurde die Sequenz der PTB ligiert. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde mittels Sequenzierung überprüft.

Der Expressionsvektor pet21a(+)-Nt-His-PTB₂₆₃-TS-SPEptid-Ct-Cys führt zur Expression der verkürzten PTB-Domäne von Aminosäure Prolin¹⁵⁸ bis Glutamat²⁶³ mit anschließender TEV-Proteaseschnittstelle und dem C-terminalen Serincluster.

8.2 Biochemische Methoden

8.2.1 Baculovirus-Expressionssystem

8.2.1.1 Allgemeines

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

Die 130 kbp große DNA ist in einer stabförmigen Proteinhülle verpackt, die zusätzlich mit einer Lipidmembran umgeben ist; bis zu 100 solcher Partikel bilden, in einer aus Polyhedrin bestehenden Proteinhülle das Dauerstadium des Virus (Einschlusskörper; inclusion body). Die Einschlusskörper werden vom Wirt oral aufgenommen und gelangen so in den Verdauungstrakt des Insektes. Dort

wird die Polyhedrinhülle abgebaut und die infektiösen Viruspartikel verschmelzen, nach der Passage der peritrophischen Membran, mit der Zellmembran ihre Wirtszellen. Die hier freigesetzte DNA wandert in den Zellkern und wird nach etwa sechs Stunden (post infection; p.I) repliziert und transkribiert. In der frühen Phase (10h p.I.) verlassen vornehmlich die stäbchenförmigen Partikel durch Knospung die Zelle und infizieren Zellen in ihrer Umgebung; die ersten Einschlusskörper sind nach 48 h p.I. detektierbar. Die Lyse der Zellen setzt nach 72 h ein.

Das Polyhedrin ist im Lebenszyklus für das Virus ein sehr wichtiges Protein, unter Zellkulturbedingungen ist es aber nicht notwendig. Ein unter Kontrolle des Polyhedrinpromotors in das virale Genom eingeschleuste Gen kann in hohen Konzentrationen in den Insektenzellen exprimiert und gereinigt werden. ($1\text{g}/10^9$ Zellen). Ein weiterer Vorteil dieses Expressionssystems ist sein eukaryotischer Ursprung. Viele posttranslationalen Modifikationen wie Faltung, Disulfidbrücken und Glykolysierungen werden von den Insektenzellen korrekt ausgeführt, so dass die gereinigten Proteine auch ihre volle biologische Funktion erhalten.

Das einbringen von Fremd-DNA in die Virus-DNA gelingt durch die homologe Rekombination eines die DNA enthaltenen speziellen Transfervektors mit linearisierter AcNPV-DNA. Isolierte Viren werden dann sukzessive vermehrt und für die Infektion großer Insektenkulturen verwendet. Die Reinigung des exprimierten Proteins erfolgt nach der Lyse der Zellen mit chromatographischen Verfahren (8.2.3).

8.2.1.2 Sf9-Zellkultur

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

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

Plaque Assays mit angesetzt.

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

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

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

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

8.2.1.4 Infektion, Proteinexpression Ernte und Lyse von Sf9-Zellen

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

(*plaque forming units, pfu*) pro Zelle.

- Sf9-Zellen (1×10^6 Zellen/ml) aus Suspensionskultur abzentrifugieren (1000 g, 27 °C)
- Zellsediment in virushaltigem Medium resuspendieren (1×10^7 Zellen/ml, *MOI* 5-10)
- Inkubation bei 27 °C für 1h
- Zugabe von neuem Medium (1×10^6 Zellen/ml) und für 72 h inkubieren
- Zellen abzentrifugieren (10000 g, 4 °C, 10 min)
- Zellpellet in 1 x PBS Lösung resuspendieren und erneut abzentrifugieren (10000 g, 10 min, 4 °C)

Die Zellen wurden bei -80 °C eingefroren oder direkt weiterverwendet. Der Aufschluss der Zellen und alle weiteren Reinigungsschritte erfolgten bei 4 °C. Die angegebenen pH-Werte der Puffer beziehen sich auf Raumtemperatur (22 °C).

Zellyse:

- Zellen in Aufschlusspuffer resuspendieren (10^7 Zellen/ml).
 - ◆ Aufschlusspuffer: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 0,25 M Saccharose, 1 x Complete
- 3 x 5 sec. Sonifizieren (100 Watt, auf Eis)
- Im Elvehjem-Potter-Homogenisator bei 700 Umdrehungen homogenisieren
- Unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation entfernen (10 min, 10000 g)
- Überstand abnehmen in Ultrazentrifugenröhrchen überführen.
- In der Ultrazentrifuge bei 40000 rpm und 4 °C für 45 min zentrifugieren.
- Den Überstand nach Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff bei -80 °C lagern oder direkt weiterverwenden.

8.2.2 Proteinexpression in *E.coli*

Zur Expression der GST-Fusionsproteine wurde der Expressionsvektor pGex-3x verwendet. Die Expression erfolgte in *E. Coli* BL21. Zur Expression der His-getaggen Proteinewurde der Expressionsvektor pet-21a(+) verwendet. Die Expression erfolgte in BL21-DE3 Zellen. Die Anzucht der Bakterien, die Induktion der Proteinexpression erfolgte nach Smith und Johnson (1988)²⁰¹.

Expression der Fusionsproteine in *E. Coli*:

- Transformierte *E. coli* BL12 in LB-Amp-Medium animpfen, über Nacht inkubieren (37 °C, 220 rpm).
- Übernachtskultur 1:10 mit LB-Medium (37 °C) verdünnen.
- Inkubation für 1h, bei 37 °C und 18 rpm.
- Induktion mit IPTG (Endkonzentration 0,1 mM).

- Inkubation bei 37 °C und 180 rpm für 4 h.
- Bakterien abzentrifugieren (10 min, 3500 rpm, 4 °C).
- Aufschluss der Bakterien:
- Zellen mit 1/50 Kulturvolumen eiskaltem 1 x PBS waschen.
- Bakterien erneut abzentrifugieren (10 min bei 5. g, 4 °C).
- Zellen in 1/100 Kulturvolumen eiskaltem 1 x PBS (1 X Complete Proteaseinhibitor) resuspendieren.
- Aufschluss durch Ultraschall (5 x 5 sec, 100 Watt, auf Eis).
- Zugabe von Triton X-100 auf 1 % (v/v).
- Unlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugation entfernen (15 min, 10.000 g, 4 °C).
- Lysat über Glutathion-Sepharose-Affinitätschromatographie bzw. Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie reinigen.

8.2.3 Chromatographische Methoden

8.2.3.1 Glutathion-Sepharose Affinitätschromatographie

GST ist ein 26 kDa großes Protein aus dem *Helminthen Schistosoma japonicum*. Das Glutathion S-Transferase-Expressionsystem ist eine Methode, die es ermöglicht, auf DNA-Ebene das gewünschte Peptid an ein sehr gut charakterisiertes Protein, die Glutathion S-Transferase (GST) zu koppeln. Die Fusionsproteine werden über Affinitätschromatographie gereinigt, wobei an Sepharose immobilisiertes Glutathion (γ -Glu-Cys-Gly) als Affinitätsmatrix verwendet, der Ligand der GST. Über Glutathion-Sepharose wurden alle GST-Kinasen sowie die in *E.coli* exprimierten GST-Fusionsproteine gereinigt.

Herstellung der Affinitätssäule

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

Proteinreinigung

- Säule mit 3× Säulenvolumen an 1 x PBS äquilibrieren.
- Proteinlösung (z.B. Überstand einer Zentrifugation) auf die Säule geben, je 50 μ l von Überstand und Durchlauf in Eppis auffangen.
- Säule mit 5-10 × Säulenvolumen an 1 x PBS waschen, 50 μ l Durchlauf in Eppi auffangen.
- Im Falle der Proteine aus *E.Coli* Säule mit 5-10 x Säulenvolumen ATPase Entfernungspuffer

(2,5 x ATP, 10 mM MgCl₂ in 50 mM Tris/HCl) waschen.

- Säule mit 5-10 x Säulenvolumen 1 M NaCl in 50 mM Tris waschen, 50 µl Durchlauf in Eppi auffangen.
- Säule 10 x mit 2 x Säulenvolumen Elutionspuffer eluieren.
- Säule 3 x abwechselnd mit je 15 ml Regenerationspuffer 1 und Regenerationspuffer 2 regenerieren Säule in 20 % Ethanol lagern.
- Eluate durch Spotttest auf Proteingehalt testen (8.2.9.1).
- Eluate einzeln in 10.000 MWCO Centrikon mit 50 mM Tris pH 7,5 von Glutathion frei waschen und auf gewünschte Konzentration einstellen (8.2.8.1)

8.2.3.2 Nickel-Chelat Affinitätschromatographie

Fusionsproteine mit poly-Histidin-Resten lassen sich leicht und schnell mit Hilfe der Ni- NTA-Affinitätschromatographie reinigen. Die Histidinreste können zweiwertige Kationen wie Ni²⁺, Fe²⁺ und Cu²⁺ komplexieren. In der Ni-NTA-Chromatographie sind zweiwertige Ni- Ionen über vier ihrer sechs Bindungsstellen an NTA (Nitrilotriessigsäureacid), einem vierzähligen Liganden, der an der Agarose-Matrix gekoppelt ist, gebunden. Histidinreste der rekombinanten Proteine können an die beiden verbleibenden Bindungsstellen des Ni-Ions über ihre Imidazolringe binden, wodurch die Proteine an der Ni-NTA immobilisiert werden. Imidazol allein, eine Teilstruktur von Histidin, bindet ebenfalls an Ni-Ionen und kann zur Elution gebundener Proteine verwendet werden.

Bei einer Imidazolkonzentration von 100-250 mM dissoziieren 6xHis-Proteine, da sie nicht länger mit Imidazol kompetieren können. Auch eine Reduktion des pH-Wertes lässt gebundene His-Tag-Proteine eluieren. Der Stickstoff des Imidazolringes von Histidin wird bei pH 4,5-5,3 protoniert, so dass ein positives Ammoniumion entsteht, das vom positiv geladenen Ni-Ion abgestoßen wird. Zur Verminderung der Bindung nicht getagter, Histidin-haltiger Backgroundproteine im Zelllysate sind geringe Imidazolkonzentrationen (10-50 mM) bereits für die Kopplung und Waschprozeduren empfehlenswert. Ebenso kann bei den Waschrufen der pH-Wert bis auf pH 6,0 reduziert werden.

Herstellung der Affinitätssäule

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

Proteinreinigung

- Zellen in 1/50 Kulturvolumen Ni-NTA-Lysispuffer nach Standardprotokoll lysieren.
- Zugabe von Complete (EK 1 x), DTT (EK: 1 mM) und Triton-X-100 (EK: 1 % (V/V)).
- Zentrifugation für 15 min, bei 10000 g, 4 °C.
- Lysat auf Eis stellen und Pellets in 1/25 Kulturvolumen Ni-NTA-Lysispuffer resuspendieren.
- Zugabe von Complete (EK 1 x), DTT (EK: 1 mM) und Triton-X-100 (EK: 1 % (V/V)).
- Zentrifugation für 10 min, bei 15000 g, 4 °C.
- Lysat auf Eis stellen und Pellets in 1/25 Kulturvolumen Ni-NTA-Lysispuffer resuspendieren.
- Zugabe von Complete (EK 1 x), DTT (EK: 1 mM) und Triton-X-100 (EK: 1 % (V/V)).
- Zentrifugation für 10 min, bei 15000 g, 4 °C.
- Lysate vereinigen und mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min über die Säulenmatrix geben
- Matrix mit 20 x Säulenvolumen Waschpuffer (50 mM Tris/150 mM NaCl/40 mM Imidazol pH 8,0) bei einer Geschwindigkeit von 1 ml/min waschen
- Elution mit 15x 2ml Elutionspuffer (50mM Tris/250 mM Imidazol pH 8,0).
- Eluate durch Spotttest auf Proteingehalt testen (8.2.9.1).
- Eluate über Nacht gegen 10 mM Tris/2 mM MgCl₂, pH 7,5 dialysieren.
- Proben der Lysate, dem Durchfluss, der Waschlösung und der Eluate werden auf einer SDS-PAGE (8.2.9.3) überprüft.

8.2.3.3 Nickel-Chelat Affinitätschromatographie zur Reinigung von Spaltungsansätzen

Die Nickel-Chelat Affinitätschromatographie eignet sich sehr gut zur Reinigung von Spaltungsansätzen, bei denen mittels TEV-Protease der His-Tag abgespalten wird. Sowohl das ungespaltene Protein, der abgespaltene His-Tag, als auch die TEV-Protease selbst binden an die Nickel-NTA-Matrix und bleiben auf der Säule hängen, während sich das abgespaltene Protein im Durchlauf befindet. In der Arbeit wurden so die Kinasen IGF_{ΔC} und IGF_{ΔC Phe} Tev-His befreit. Zusätzlich wurde auch das Substrat GST-TS-IRS-1₇₃₈ durch diese Methode von der TEV-Protease befreit.

- Zugabe von 15 mM Imidazol zum Spaltungsansatz.
- Zugabe von 1 ml Nickel-NTA-Matrix (mit 10 mM Tris pH 7,5 äquilibriert).
- Inkubation für 20 min auf dem Rollschüttler bei 4 °C
- Gesamten Ansatz über Säule geben. Im Falle der Peptide befindet sich das Peptid im Durchlauf.
- Säule mit 15 mM Imidazol in 10 mM Tris pH 8 waschen.
- Die Proteinenthaltenden Lösungen mittels Spot-Test auf Proteingehalt (8.2.9.1) und mittels

SDS-PAGE auf Reinheit überprüfen.

- Die Peptide IGF-NTK1-Cys, IGF-NTK3-Cys, IGF-KP-Cys, aDPeptid-Cys können in der Speed-Vac um das 5 fache eingeeengt werden (8.2.8.1).

8.2.3.4 Ionen-Austausch-Chromatographie

Zur Aufreinigung der Lysate der LIRK und LIRKY_{960F} und der Eluate der GSH-Reinigung der GST-TS-IGF_{ΔC} und GST-TS-IGF_{ΔC Phe} wurde eine *Resource Q* 1 ml Anionenaustauschersäule in einem FPLC (*Fast Performance Liquid Chromatography*) - System eingesetzt. Bei der Anionenaustauschchromatographie (IEX) besteht die Matrix der Säule aus substituierten quarternären Aminogruppen, an welche Proteine mit einem Überschuss an negativen Ladungen binden. Durch Anlegen eines Salzgradienten werden die gebundenen Proteine entsprechend der Stärke ihrer Interaktion mit dem Säulenmaterial sukzessiv eluiert. Das Eluat wird über einen Fraktionssammler aufgefangen, die Identität der Proteine in den jeweiligen Fraktionen wird mittels SDS-PAGE und *Western Blot* bestimmt. Die Reinigung erfolgt bei 14 °C, weil bei dieser Temperatur die maximale Trennschärfe der *Resource Q*-Säule erreicht wird.

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

8.2.3.5 ResourceQ 1 ml

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

Nach vollständiger Beladung der Säule wird mit 8 ml des Gemisches aus der jeweiligen Konzentration an Puffer B (isokratischer Fluss, Flussrate 2 ml/min) gewaschen, um nicht gebundene Proteine mit dem Durchfluss zu entfernen. Durch kontinuierliche Erhöhung des Anteils an Puffer B in der mobilen Phase (Flussrate 2 ml/min), wird ein linearer Salzgradient angelegt.

Dies führt zur Elution der Proteine von der Säule; das Elutionsprofil der an die Säule gebundenen Proteine wird durch photometrische Messung der Absorption A_{280} nm erstellt. Sind die Fraktionen (0,5 ml), die das gewünschte Protein enthalten, identifiziert worden, so können diese vereinigt werden. Zur vollständigen Freisetzung auf der Säule verbliebener Proteine wird der Anteil an Puffer B innerhalb von 3 min (Flussrate 2 ml/min) nach der Elution auf 100 % (v/v) gebracht; diese Pufferkonzentration wird bei einer Flussrate von 2 ml/min für mindestens 5 min beibehalten. Zur Aufbewahrung der Säule nach erfolgter Chromatographie wird diese mit MQ entsalzt (Flussrate 2 ml/min, für mindestens 5 min) und in 20 % Ethanol gelagert.

8.2.3.6 Gelfiltrationschromatographie Superdex 75 (prep. Grade)

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

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

Reinigung:

- Auftauen der Eluate in Eiswasser.
- Eluate mit 1 mM DTT versetzen.
- Unlösliche Bestandteile werden durch Zentrifugation für 10 min bei 5000 rpm 4°C sedimentiert.
- Eluate in 1 ml – 8 ml Schleife füllen
- Beladen der Säule mit dem Eluat; $F = 0,5$ ml/min
- Starten des isokratischen Flusses, $F = 0,5$ ml/min
- Sammeln der Fraktionen (je 0,5 ml) mit Hilfe des Fraktionssammlers (nach ca. 2 ½ h)
- Die Eluate mittels Spot-Test auf Proteingehalt (8.2.9.1) und mittels SDS-PAGE auf Reinheit überprüfen
- Fraktionen mit reiner Kinase vereinigen und bei Bedarf über ein Centricon (8.2.8.1) einengen und bis zum weiteren Gebrauch bei 4°C lagern.

8.2.3.7 Reversed-phase-HPLC

Die chemisch synthetisierten Peptide wurden über die Reversed-phase- High Performance Liquid Chromatography (HPLC) gereinigt. Bei diesem chromatographischen Trennverfahren wird die zu untersuchende Substanz zusammen mit einem flüssigen Laufmittel, der "mobilen Phase" (auch "Eluent" genannt) auf eine sog. Trennsäule, die die "stationäre Phase" darstellt, gegeben. Wechselwirkt ein Bestandteil der zu untersuchenden Substanz stark mit der stationären Phase, verbleibt er relativ lange auf der Säule. Wechselwirkt er hingegen schwach mit der stationären Phase, verlässt er die Säule früher. Je nach Stärke dieser Wechselwirkungen erscheinen die Bestandteile der Substanz zu verschiedenen Zeiten (den "Retentionszeiten") am Ende der Trennsäule, wo sie dann mit einem geeigneten Detektor nachgewiesen werden können. Es werden zwei Methoden unterschieden: Normal Phase (NP) und Reversed Phase (RP). Bei der NP-HPLC wird eine polare stationäre Phase (z.B. Silikagele/Kieselgel) und eine unpolare mobile Phase (z.B. Hexan) genutzt. Polare Moleküle werden auf der Säule länger retardiert als unpolare Moleküle und verlassen deshalb später die Säule. Die RP-HPLC ist in der Praxis die gängigste Methode. 70% aller analytischen HPLC-Trennungen sind RP-Trennungen. Hier wird eine unpolare stationäre Phase verwendet und eine polare mobile Phase. Die stationäre Phase wird hergestellt indem man Silane welche mit langkettigen Kohlenwasserstoffen substituiert wurden, mit Silicagel reagieren lässt. Dabei wird die polare Oberfläche der Silicagel-Partikel mit einer apolaren Schicht aus Alkanen überzogen, also die Polarität umgekehrt (engl.: "Reversed"). Als mobile Phase werden meist Mischungen aus Wasser oder Puffer und Acetonitril, Tetrahydrofuran oder Methanol eingesetzt. Bei isokratischen Trennungen bleibt die Zusammensetzung der Mobilphase während der gesamten Zeit gleich. Bei Gradiententrennungen wird der unpolare Anteil während der Analyse erhöht. Besondere Anwendung findet die RP-HPLC bei der Auftrennung von polaren Analyten die auf Normalphasen zu hohe Retentionszeiten aufweisen würden. Die Detektion erfolgt mittels UV-Detektor bei 206 nm.

Durchführung:

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

Bedingungen:

- Trennsäule: ET 250/8/4 Nucleosil 300-7 C₈ (250 x 4 mm)
- Flussrate: 0,5 ml/min
- Puffer A: 0,1 % TFA

- Puffer B: 0,1 % TFA, 80 % CH₃CN

Gradient:

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

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

Aufarbeitung:

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

8.2.4 Proteolytische Spaltungen

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

TEV-Protease ist die 27 kDa große katalytische Domäne des Nuclear Inclusion a (Nia) Protein, das vom Tobacco Etch Virus kodiert wird. Die Struktur der TEV-Protease entspricht zwar der Struktur gewöhnlicher Serinproteasen wie Chymotrypsin, die Spaltung wird hier allerdings durch ein reaktives Cystein in der „katalytischen Triade“ durchgeführt. Die TEV-Protease besitzt eine sehr viel strengere Sequenz-Spezifität als Faktor Xa oder Thrombin. Sie erkennt ein lineares Epitop der Form E-X-X-Y-X-Q-(G/S), wobei X einer beliebigen Aminosäure entspricht, und spaltet zwischen Q und S bzw. Q und G. In unserer Arbeitsgruppe wird die Sequenz ENLYFQG verwendet. Da die TEV-Protease keine post-translationale Modifikation zur vollständigen Aktivität benötigt, kann sie in großen Mengen in E.Coli exprimiert und über Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt werden. Die TEV-Protease hat N-terminal einen His-Tag, so dass sie aus einem Spaltungsansatz über Nickel-Chelat-Matrix entfernt werden kann. Der Spaltungsansatz enthielt 10 mM Tris/HCl pH 8, 2 mM DTT. Gespalten wurde bei 4 °C über Nacht auf dem Rollschüttler. Die TEV-Protease wurde in einem Verhältnis von Protease zu Substrat von 1:20 (w/w) eingesetzt.

Bei den Kinasen GST-TS-IGF_{ΔC} und GST-TS-IGF_{ΔC Phe} wurde der GST-Tag durch einen TEV-Protease-Verdau abgetrennt. Anschließend wurde der Ansatz über eine Nickel-Chelat-Säule gegeben, um die TEV-Protease rauszuwaschen.. Der Durchlauf wurde dann über eine Glutathion-Sepharose-Matrix gegeben, um die gespaltenen Kinase von ungespaltener Kinase und freiem GST abzutrennen.

8.2.5 Analytische Modifikation von reaktiven Cysteinen

Die Proteine, die im Vektor Pet-mod-NTHis-Tyrtide-CT-Cys exprimiert wurden besitzen C-terminal die Sequenz HCQRE. Der P_K -Wert der Thiolgruppe des Cysteins dieser Sequenz wird durch die Sequenzumgebung ins saure verschoben, so dass der Schwefel nucleophil an den Maleimidring des Tetramethylrhodamine-5-maleimid via Michael Addition angelagert werden kann. Markierungen im kleineren Maßstab wurden durchgeführt, um die Reaktion der Farbstoffe auf variierte Markierungsbedingungen (wie z.B. Puffer, Reaktionszeit, Temperatur, pH-Wert usw.) bezüglich Markierungsausbeute zu testen. Sie waren so konzipiert, dass sie für eine anschließende Auswertung über eine SDS-PAGE direkt geeignet waren. Dies betrifft insbesondere das Markierungsvolumen von i.d.R. 10-15 μ l und den Proteingehalt von 10-15 μ g. Um sicher zu stellen, dass nur das eine Cystein markiert wurde, wurde der Farbstoff im molaren Unterschuss zum Protein eingesetzt. Ein Standardansatz enthielt 10 μ g Protein und 1 μ g Farbstoff. Markiert wurde in 10 mM Tris pH 7 für 30 min bei 4 °C. Abgestoppt wurde die reaktion mit einem 10-fachen molaren Überschuss DTT zum Farbstoff. Sämtliche Schritte mit Farbstoff fanden unter gedämpftem Licht bzw. Lichtabschluss statt. Zur Auswertung wurden die Ansätze auf einem SDS-Gel untersucht. Der Farbstoff wird bei 543 nm angeregt und emittiert bei 575 nm, so dass markierte Proteine im SDS-Gel unter der UV-Lampe betrachtet und ausgewertet werden können. Eine Einfärbung der Proteinbanden in peptidfärbelösung ist ebenfalls möglich.

8.2.6 Präparative Modifikation von reaktiven Cysteinen

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

Die Matrix mit dem immobilisierten Protein aus 1 Liter Expression wurde mit 10 μ l (100 nmol) Farbstoff versetzt und für 30 min bei 4 °C auf dem Rollschüttler unter Lichtabschluss inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 μ M DTT gestoppt. Anschließend wurde das Protein wie unter Fehler: Referenz nicht gefunden beschrieben gereinigt und anschließend dialysiert (8.2.7). Der Erfolg der Markierung wird über SDS-PAGE mit anschließender Analyse unter UV-Lampe überprüft.

8.2.7 Dialyse von Proteinen

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

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

8.2.8 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen

8.2.8.1 Konzentrierung der gereinigten Proteine mittels Ultrafiltration

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

8.2.9 Charakterisierung von Proteinkonzentration und -Identität

8.2.9.1 Konzentrationsbestimmung nach MINAMIDE und BAMBURG (1990) – „Spot-Test“

1 µl der Proteinlösung, deren Konzentration zu bestimmen ist, sowie jeweils 1 µl der einzelnen Konzentration einer BSA-Eichreihe (0,1-10 µg/µl) wird auf Munktell Grade 1F Filterpapier aufgetragen. Nachdem die Probe eingetrocknet ist, wird das Filterpapier für 30 s in *Spot-Test-*

Färbelösung gelegt, anschließend in Entfärbelösung entfärbt bis keine unspezifische Hintergrundfärbung sichtbar bleibt. Höhere Konzentration der zu untersuchenden Proteinlösung resultiert in einer intensiveren Blaufärbung an dem entsprechenden Auftragsort. Die Konzentration wird durch Vergleich mit den Farbintensitäten der Eichreihe abgeschätzt.

8.2.9.2 Konzentrationsbestimmung nach BRADFORD (1976) ^[202]

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

8.2.9.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Lösungen von Proteinen können mittels SDS-PAGE aufgetrennt werden. Dazu werden die Proteine zunächst nach Zugabe des anionischen, amphiphilen Detergenz SDS, und DTT zur Reduktion intra- oder intermolekularer Disulfidbrücken, bei 95°C für 5 min denaturiert. Anschließend werden die entfaltenen Proteine durch Anlegen einer Spannung in einem Gel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt; aufgrund des basischen pH-Wertes, der zur Elektrophorese eingestellt wird, und der Wechselwirkung mit SDS bewegen sich die Proteine in Richtung der Anode. SDS lagert sich stöchiometrisch an Proteine an (1,4 g SDS/1 g Protein, d.h. 1 Molekül SDS/2-3 Aminosäuren). Somit sind Nettoladung und native Struktur eines Proteins während der SDS-PAGE vernachlässigbar, und die elektrophoretische Mobilität eines Proteins ist proportional zum Logarithmus seines Molekulargewichts. Allerdings werden die elektrophoretischen Eigenschaften eines Proteins durch kovalente Modifikationen (z.B. Phosphorylierung, Glykosylierung) beeinflusst, da diese die Bindung von SDS an Proteine beeinflussen, wodurch mittels SDS-PAGE nur ein apparentes Molekulargewicht bestimmt werden kann. Die Zusammensetzung der im Rahmen dieser Arbeit benutzten Gele für SDS-PAGE ist der Fehler: Referenz nicht gefunden zu entnehmen. Der Trennbereich eines 12 %-igen Trenngels erstreckt sich von 14-200 kDa. Die Polymerisation der Gellösungen erfolgt durch Zugabe von 12,5 μ l 40 % (w/v) APS und 10 μ l TEMED im Fall für 10 ml Sammelgels, bzw. 10,4 μ l 40 % (w/v) APS und 4,4 μ l TEMED im Fall für 10 ml Trenngels.

Tabelle 8.1.: Zusammensetzung der verwendeten Trenn- und Sammelgele

Trenngel (10 ml)	12 %	15 %	18 %	Sammelgel (10 ml)	6 %
40 % Acrylamid (100:2,7) [ml]	3,00	3,75	4,50	40 % Acrylamid (100:2,7) [ml]	1,50
3 M Tris pH8,8 [ml]	1,85	1,85	1,85	0,5 M Tris pH 6,8 [ml]	2,50
20 % SDS [ml]	0,05	0,05	0,05	20 % SDS [ml]	0,05
60 % Saccharose [ml]	1,15	1,15	1,15	MQ [ml]	5,95
MQ [ml]	3,95	3,20	2,45		

8.2.9.4 *Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophorese (Schägger-Gel; Schägger, Jagow, 1987)*

Das Schägger-Gel ist eine diskontinuierliche SDS-PAGE zur Auftrennung von Proteinen im Bereich von 1-100 kDa. Die SDS-PAGE nach Laemmli hat den großen Nachteil, dass kleine Peptide unter 10 kDa nicht aufgetrennt werden können. Bei der Verwendung von höheren Acrylamidkonzentrationen zur Auftrennung kleiner Peptide kann man diese nicht mehr von der großen Menge an SDS trennen. Das liegt hauptsächlich daran, dass kleine Peptide Komplexe aus Protein und Detergenz bilden, die alle die „gleiche“ Größe und Ladung wie die SDS-Micelle selbst aufweisen. Eine große Verbesserung liefert die Verwendung von Tricin an Stelle von Glycin im Laufpuffer. Glycin, wie es bei Laemmli im Laufpuffer verwendet wird, hat einen pK von 9,6. Die Anwesenheit von Glycin im Laufpuffer führt Sammlung von sehr großen Proteinen, weil es sehr langsam im sauren Sammelgel wandert; Allerdings führt eben das dazu, dass kleine Peptide nur gering, oder gar nicht vom SDS aufgetrennt werden können. Bei der Verwendung von Tricin im Laufpuffer kann das Sammeln und Trennen der kleinen Peptide im Sammelgel unter einfacheren Bedingungen, gleicher pH wie das Trenngel und geringe Acrylamidkonzentration, gewährleistet werden. DA bei normalen pH -Werten zwischen 6,8 und 8,8 mehr Tricin in anionischer Form vorliegt, wandert es sehr viel schneller als Glycin im Sammelgel trotz der größeren Molekularmasse. Zusätzlich wird beim Schägger-Gel eine weitere Lage, das Spacer-Gel, eingeführt. Das Spacer-Gel, das zwischen Sammel- und Trenngel liegt, ermöglicht die Auftrennung von kleinen und großen Proteinen. Ohne das Spacer-Gel müsste zur Auftrennung der kleinen Peptide ein 8-10 % Sammelgel genutzt werden, wodurch Proteine oberhalb 20 kDa nicht mehr ordentlich aufgetrennt werden können. Durch die Einführung des 10 % Spacer-Gel reichen im Sammelgel Acrylamidkonzentrationen von 4-6 % aus, so dass auch große Proteine aufgetrennt werden können. Die kleinen Peptide trennen sich dann bei Eintritt ins Spacer-Gel vom SDS. Die Zusammensetzung der im Rahmen dieser Arbeit benutzten Gele für das Schägger-Gel ist der Tabellen Fehler: Referenz nicht gefunden dargestellt. Die Polymerisation der Gellösungen erfolgt

durch Zugabe von 40 µl 40 % (w/v) APS und 8 µl TEMED im Fall für 10 ml Sammelgels, bzw. 16µl 40 % (w/v) APS und 3,4 µl TEMED im Fall für 10 ml Trenngels bzw Spacer-Gels.

Tabelle 8.2.: Zusammensetzung der verwendeten Trenn-, Spacer und Sammelgele

Trenngel (60 ml)	16,5 %	Spacer-Gel (60 ml)	10 %	Sammelgel (60 ml)
40 % Acrylamid (100:2,7) [ml]	25	40 % Acrylamid (100:2,7) [ml]	15	40 % Acrylamid (100:2,7) [ml]
3 M Tris/0,3% SDS pH 8,45 [ml]	20	3 M Tris/0,3% SDS pH 8,45 [ml]	20	3 M Tris/0,3% SDS pH 8,45 [ml]
Glycerin [ml]	8	MQ [ml]	25	MQ [ml]
MQ [ml]	7			

8.2.9.5 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE)

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

Tabelle 8.3.: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die native PAGE

Trenngel (10 ml)	8,5 %	Sammelgel (10 ml)	5 %
40 % Acrylamid (100:2,7) [ml]	2,10	40 % Acrylamid (100:2,7) [ml]	1,20
3 M Tris pH8,8 [ml]	1,85	0,5 M Tris pH 6,8 [ml]	2,50
60 % Saccharose [ml]	1,15	MQ [ml]	6,30
MQ [ml]	4,90		

8.2.9.6 Proteinextraktion aus Gelen für die 2D-Gel Elektrophorese

Nach färben und entfärben (siehe 8.2.9.7) von nativen oder IEF-Gelen (siehe 8.2.9.5) ist es möglich die einzelnen Proteinbanden aus zuschneiden und die Proteine auf eine SDS-PAGE (siehe 8.2.9.3) zu übertragen um diese weiter zu untersuchen.

- Inkubation der Gelbanden in 20% EtOH für 10min
- Inkubation der Gelbande in 100µl 2xSDS Probenpuffer mit 25µl EtOH für 5min
- Waschen der Gelbande mit 1xSDS Probenpuffer
- Die gewaschenen Gelstücke in die Taschen der SDS-PAGE überführen und das Gel wie unter 8.2.9.3 beschrieben durchführen und färben

8.2.9.7 Färbung von Proteinen in SDS-, Schägger und Nativen-Gelen

8.2.9.8 Färbung mit Comassie (Kolloidale Peptidfärbelösung)

SDS-PAGE-Gele (8.2.9.3) und native PAGE-Gele (8.2.9.5) werden über Nacht in kolloidale Peptid-Färbelösung eingelegt, wobei die aufgetragenen Proteine durch Coomassie-Blue G250 angefärbt werden. Durch Waschen des gefärbten Gels in Wasser wird unspezifisch in das Gel eingelagerter Farbstoff entfernt, so dass die Proteinbanden sich deutlich vom Hintergrund abheben. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 0,1 µg Protein pro Bande.

8.2.9.9 Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Blot

Der Western Blot ist eine Methode zum Nachweis von Proteinen mit spezifischen Antikörpern. Die Proteine werden zunächst mit SDS-PAGE aufgetrennt, dann auf eine Membran transferiert, die schließlich mit einem Antikörper, der spezifisch an das gesuchte Protein bindet, inkubiert. Die Proteinbande wird sichtbar gemacht, indem die Membran mit einem sekundären Antikörper inkubiert wird, dessen Epitop im primären Antikörper liegt. Der sekundäre Antikörper ist kovalent mit einem Enzym (alkalische Phosphatase) konjugiert, das ein geeignetes Substrat (BCIP, NBT) so umsetzt, dass durch eine Farbreaktion die Proteinbande, an die der primäre Antikörper bindet, sichtbar wird.

8.2.9.10 Semi-dry Blot

- Die PVDF-Membran wird auf die Größe des Gels zugeschnitten und für 30 s in Methanol aktiviert. Anschließend wird sie kurz gewässert und in Blotpuffer (s. unten) getränkt.
- Auf die Anodenplatte des Blotapparates werden 12 in Blotpuffer getränkte Munktell-Filterpapiere als Pufferreservoir gelegt. Als nächstes wird die Membran und das Gel aufgelegt, und auf die Kathodenseite des Gels wird ein aus 12 in Blotpuffer getränkten Munktell-Filterpapieren bestehendes Pufferreservoir platziert.
- Blot mit 2 mA/ cm² für 15 min blotten (für ein Gel ~90mA.)
- Nach dem Blot wird das Gel in kolloidale Peptidfärbelösung eingelegt, um die Vollständigkeit des Blots abschätzen zu können. Die Membran wird anschließend für mindestens 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in 1% BSA/TBS inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen für den primären Antikörper abzublocken.
- Kurzes Waschen der Membran mit 1x TBS.

- Inkubation mit dem primären Antikörper in einer 1:1000 Verdünnung in 1% BSA/TBS für 1 h bei RT.
- Waschen der Membran mit 0,1% Tween-20/TBS für 5 X 5 min.
- Inkubation mit sekundärem Antikörper/Alkalische Phosphatase in einer 1:3000 Verdünnung in 1% BSA/ TBS für 1 h bei RT.
- Waschen der Membran mit 0,1% Tween-20/TBS für 5X 5 min.
- Für die Entwicklung in ein Schale 10 ml des Entwicklungspuffer mit 66 µl NBT und 33 µl BCIP geben und den Blot hineinlegen, bis Banden sichtbar werden.
- Die Färbereaktion wird unter fließendem Wasser abgestoppt.
- Der Blot ist lichtempfindlich, und wird daher in Alufolie aufbewahrt.

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

8.2.9.11 Wet-Blot

- Die PVDF-Membran wird auf die Größe des Gels zugeschnitten und für 30 s in Methanol aktiviert. Anschließend wird sie kurz gewässert.
- In die Blot-Kassette wird in Wet-Blotpuffer gelegt und von der Kathode zugewandten Seite aus folgendermaßen beladen: Schwämmchen, 2 Lagen Gel-Blotting Papier, Gel, PVDF-Membran, 2 Lagen Gel-Blotting Papier, Schwämmchen.
- Einspannen der Blot-Kassette in die mit Wet-Blotpuffer gefüllte Blotkammer („Tank-Blot“)
- Blot mit 30mA über Nacht im Kühlraum; alternativ bei 200mA für eine Stunde

Die Behandlung der Membran im Anschluss an das Blotten entspricht der des Semi-dry Blot.

8.2.10 Phosphorylierungsreaktionen

Die Aktivität einer Kinase kann in Phosphorylierungsreaktionen untersucht werden. Hierzu eignet sich sowohl die Autophosphorylierung der Kinase selbst, als auch die Substratphosphorylierung. Als Substrate wurden in dieser Arbeit zum einen die inaktiven Mutante der IGF-1RKD und IRKD verwendet, welche durch einen Austausch des katalytischen Aspartats zu Alanin (D1104A) keine katalytische Aktivität mehr besitzen. Inaktive Kinasen werden durch aktive Kinasen spontan phosphoryliert. Zum anderen wird ein Stück aus dem Insulinrezeptorsubstrat-1 (IRS-1) verwendet. Dieses Substrat besitzt nur eine Tyrosinphosphorylierungsstelle (Y⁶¹²), so dass die Phosphorylierung dieses Restes sehr gut auf der nativen PAGE beobachtet werden kann. Als ein natürliche Substrate wurden außerdem verschiedene Varianten der Phosphotyrosin-bindenden Domäne (PTB) des IRS-1 verwendet.

Die in dieser Arbeit genutzten Methoden zum Nachweis und zur Analyse der Phosphatinkorporation in die Kinase selbst bzw. in das Substrat umfassen die Bestimmung des Einbaus des radioaktiven Isotops ³²P und einen beobachteten Mobilitätsshift im elektrischen Feld durch Phosphorylinkorporation (Native PAGE). Die offizielle SI-Einheit für die radioaktive

Zerfallsrate ist das Becquerel (Bq [s⁻¹]). In der Literatur ist jedoch das Curie (Ci [s⁻¹]) die gebräuchliche Einheit (es gilt: 1 Ci = 3,7x10¹⁰ Bq).

8.2.10.1 Phosphorylierung mit anschließender nativer PAGE

Die Autophosphorylierung erfolgte standardmäßig durch 1-10 µM monomerer Kinase mit 1-10 mM ATP, 5 mM DTT, 30 mM Mg²⁺ in TRIS/ HCl, pH 7.5 für die angegebenen Zeiten bei Raumtemperatur. Die Substratphosphorylierung erfolgte durch 1-5 µM monomerer bzw. 0,5-2 µM dimerer Kinase und 50-200 µM Tyrtide mit 1-10 mM ATP, 5 mM DTT, 30 mM Mg²⁺ in TRIS/HCl, pH 7.5 für die angegebenen Zeiten bei Raumtemperatur. Zu den entsprechenden Zeitpunkten werden 20-30 µl des Reaktionsansatzes entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 4x Probenpuffer mit EDTA gestoppt. Nach dem Abstoppen der Reaktion werden die Proben auf Eis gelagert. Die Proben werden mittels nativer PAGE (8.2.9.5) aufgetrennt. Anschließend wird das Gel in Proteinfärbelösung angefärbt.

8.2.10.2 Radioaktive Auto- und Substratphosphorylierungen

Bei der Auto- und Substratphosphorylierung der in dieser Arbeit beschriebenen Kinasen wurde [³²P]-ATP mit einer spezifischen Aktivität von 150-300 cpm/pmol als Kosubstrat der Reaktion eingesetzt, so dass sich in einem Zeitwert 1-2 µCi Radioaktivität befinden. Autophosphorylierungen erfolgten standardmäßig durch 1-5 µM monomerer Kinase bzw. 0,5-1 µM dimerer Kinase mit 1 mM ATP, 5 mM DTT, 30 mM Mg²⁺ in TRIS/ HCl, pH 7.5 für die angegebenen Zeiten bei Raumtemperatur. Die Substratphosphorylierung erfolgte durch 1-5 µM monomerer bzw. 0,5-2 µM dimerer Kinase und 50-200 µM Tyrtide mit 0,5 mM ATP, 5 mM DTT, 30 mM Mg²⁺ in TRIS/HCl, pH 7.5 für die angegebenen Zeiten bei Raumtemperatur. Der Start der Reaktion wird entweder durch Zugabe von Kinase oder ATP eingeleitet. Zu den gewählten Zeitpunkten werden dem Reaktionsansatz Aliquots entnommen und durch Zugabe von EDTA oder 10X SDS-Probenpuffer abgestoppt. Zur Bestimmung der inkorporierten Radioaktivität nach Auto- oder Substratphosphorylierungsreaktionen wurden zwei Methoden angewendet. Zur Bestimmung der inkorporierten Radioaktivität nach Substratphosphorylierung wurde die Radioaktivität des inkorporierten radioaktiven Phosphats durch Messung der Cerenkov-Strahlung im Tritium-(3H) Fenster des -Szintillationszählers ermittelt und ins Verhältnis zur eingesetzten Stoffmenge an Protein gesetzt.

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

Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration 150 mM) beendet und 6 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-Strahlung bestimmt.

SDS-PAGE

Die Reaktion wurde durch Zugabe von SDS-Probenpuffer (100 mM DTT) beendet. Die Proben wurden 5 min bei 95 °C denaturiert und danach durch SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde 20 min fixiert (50 % Methanol, 7 % Essigsäure) und auf einem Geltrockner zwischen einer Zellulosefolie unter Vakuum getrocknet. Durch Autoradiographie des getrockneten Gels wurden die radioaktiven Proteinbanden lokalisiert und die Banden ausgeschnitten. Die Radioaktivität der Gelstücke wurde durch Messung der Cerenkov-Strahlung bestimmt. Die Methode der Autoradiographie beruht auf durch β -Strahlung hervorgerufene Bildung von Silberkeimen in einer fotografischen Emulsion. Durch Entwicklungsprozesse werden die Silberkeime in schwarze Silberkörner umgewandelt, die sich als Schwärzung auf einem entwickelten Fotofilm äußert. Radioaktiv-markierte Proteine, z.B. in einem SDS-Gel können so auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden. Dies erfolgt durch Exposition auf Kodak BIOMAXTM MS-Filmen in einer Röntgenkassette mit Verstärkerfolie. In Abhängigkeit der Strahlungsintensität der Proben und dem Empfindlichkeitsgrad des Filmes, werden die Proben für 20 min bis zu 24 h bei -80 °C exponiert. Die bestrahlten Filme werden in GBX-Developer bis zu 5 min entwickelt, kurz gewässert und für 1 min in GBX-Fixer fixiert (bis Filmfolie klar wird). Nach kurzer Wässerung kann die Autoradiographie bei Raumtemperatur getrocknet werden.

8.2.10.3 Bestimmung des Korrekturfaktor für den Phosphateinbau

Bei der Verwendung des radioaktiv markierten $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP der Firma Hartmann konnte wurde ein hoher Unterschied beim Phosphateinbau im Vergleich zur nativen Page festgestellt. In der nativen PAGE wurde ein deutlich höherer Phosphateinbau beobachtet als bei radioaktiven Versuchen, was damit zu erklären sein könnte, dass ein Großteil des $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP hydrolysiert wurde, und daher ein Großteil der Strahlung vom radioaktiv markiertem, anorganischem Phosphat stammt. Aus diesem Grund wurde ein Verfahren entwickelt, mit dessen Hilfe es möglich ist den tatsächlichen Einbau von $\gamma^{32}\text{P}$ zu ermitteln. Dazu wird die Differenz des Einbaus mittels radioaktiver Phosphorylierung und des Einbaus ermittelt über die native PAGE bestimmt. Unter gleichen Bedingungen (5 μM Kinase, 1 mM ATP, 30 mM MgCl_2) wurde dazu die monomere IGF ΔC zeitabhängig phosphoryliert, einmal über nativer PAGE ausgewertet und einmal mittels $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP

über SDS-PAGE und Autoradiographie. Der Vergleich lieferte einen dreifach höheren Phosphateinbau mittels nativer PAGE. Dieser Faktor drei stimmt mit alten Versuchen, die noch mit ATP der Firma Perkin Elmer durchgeführt wurden, überein. Daher der Einbau aller Versuche, die mit dem ATP von Hartmann durchgeführt wurden mit dem Faktor drei korrigiert. Neuere Versuche, die wieder mit Perkin Elmer durchgeführt wurden bestätigen ebenfalls den Faktor 3.

8.2.10.4 Phosphoaminosäure- und Nucleotidanalyse

8.2.10.5 Tryptische Spaltung von Proteinen im SDS-Gel

Mit Hilfe dieser Methode werden Proteine im SDS-Gel tryptisch verdaut und aus dem Gelstück eluiert²⁰³. Die so eluierten Peptide können anschließend einer Phosphoaminosäureanalyse (PASA) unterzogen werden.

- Phosphorylierungsansatz elektrophoretisch auftrennen, Gel trocknen und Autoradiographie durchführen
- Banden aus dem Gel ausschneiden, wobei der Autoradiographiefilm als Vorlage dient
- Messung der Cherenkov-Strahlung
- Gelstücke in 500 µl MQ wässern, Folie entfernen
- MQ durch 500 µl Acetonitril ersetzen, 15 min einwirken lassen bis die Gelstücke eine milchig-trübe Färbung erlangen
- Acetonitril abnehmen, Gelstücke an der Luft trocknen lassen
- Zugabe von 10 µl Trypsin-Lösung (1 mg Trypsin in 1 ml Ammoniumcarbonat-Lösung) und 50 µl 50 mM Ammoniumcarbonat-Lösung, 30 min bei 35°C schütteln
- Zugabe von 5 µl Trypsin-Lösung und 300 µl Ammoniumcarbonat-Lösung,
- Bei 35°C schütteln über Nacht
- Zentrifugation in Tischzentrifuge, Überstand abnehmen und über Speed-Vac lyophilisieren
- Messung der Cherenkov-Strahlung
- 300 µl MQ auf das Gelstück geben, 1h bei 42°C schütteln
- Abzentrifugieren, Überstand wieder abnehmen, zum ersteren dazugeben und lyophilisieren
- Messung der Cherenkov-Strahlung des Lyophilisats (mindestens 85 % der 1. Messung des Gelstücks); Lagerung jetzt bei -20°C möglich
- Saure Hydrolyse mit Lyophilisat durchführen: Inkubation mit 200 µl (je nach Größe des Rückstandes) 6 N HCl bei 110°C für 2 h
- Proben zügig auf Eis abkühlen und über Speed-Vac trocknen
- 2x mit 30 µl MQ waschen und ebenfalls trocknen

- Messung der Cherenkov-Strahlung und Lagerung bei -20°C

8.2.10.6 HPLC-Analyse tryptischer Peptide (Phosphopeptidkartierung)

Durch tryptische Proteolyse lassen sich aus der Zytoplasmatischen phosphorylierten Domäne der löslichen Insulinrezeptorkinase IRKD-HIS Phosphopeptide generieren, die sich durch HPLC-Anionenaustausch-Chromatographie voneinander trennen lassen¹⁷⁴. Die Auftrennung des Phosphopeptid-Gemisches durch HPLC-Anionenaustausch-Chromatographie (Trennsäule: Nucleogel SAX1000-8/46, 50 x 4,6 mm) mit einem zweistufigen Salzgradient führt zur Separation von 29 Radioaktivität enthaltenden Fraktionen. Die Sequenz der darin enthaltenen Phosphopeptide konnte Al-Hasani durch direkte Edman-Sequenzierung ermitteln. Somit ist es möglich, jedem einzelnen Elutionspeak im Chromatogramm die entsprechende Aminosäuresequenz und Phosphorylierungsstelle der IRKD-HIS zuzuordnen. Der Vergleich dieses Elutionsprofils mit den korrespondierenden Profilen der IRKD und des aus Humanplazenta gereinigten Insulinrezeptors zeigte, dass die Autophosphorylierungsreaktionen dieser Enzyme in der identischen Besetzung der Autophosphorylierungsstellen resultiert⁴¹. Das von Al-Hasani standardisierte Protokoll erlaubt demnach die Analyse des Phosphorylierungsstatus der einzelnen Phosphorylierungsstellen im Enzym. Für die Phosphopeptid-Kartierung wurden Autophosphorylierungsreaktionen der Hybride und der Referenzkinasen durchgeführt. Nach der Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE wurde das Gel getrocknet, die Proteinbande durch Autoradiographie lokalisiert und ausgeschnitten. Das Gelstück wurde durch tryptische Spaltung eluiert (8.2.10.5) und die HPLC-Analyse durchgeführt. Die Probe sollte wenigstens 10000 cpm enthalten und ein Volumen von 700 μl nicht überschreiten.

Laufpuffer: Puffer A: 20 mM Ammoniumacetat, pH 7,0

Puffer B: 1 M Kaliumphosphat, pH 4,0

- Tryptisches Eluat mit Puffer A auf 1 ml auffüllen und bei 10000 \times g für 5 min zentrifugieren
- Säule mit 10 ml Puffer A äquilibrieren
- Säule mit Probe beladen, Flußrate: 0,5 ml/min
- dreistufigen linearen Gradienten anlegen: 0-50 % B in 120 ml, Flußrate 0,5 ml/min
 - ◆ 0-10 min: 0 % B, 10-50 min: 10 % B, 50-125 min: 50 % B
- Fraktionen von 0,5 ml sammeln, Radioaktivität durch Messung der Cherenkov-Strahlung ermitteln

8.2.10.7 Phosphoaminosäureanalyse über Eindimensionale Elektrophorese auf Zellulose²⁰⁴

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

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

8.2.10.8 Phospho-Imager-Auswertung

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

8.2.11 BrCN Verdau von phosphorylierter GST-PTB₂₇₅

Bromcyan ist ein Blausäure (HCN) Derivat bei dem das Wasserstoffatom durch Brom ersetzt ist. Die giftige Wirkung beruht auf den beiden Komponenten Brom und Cyanid, die sowohl durch enzym-inhibitorische Eigenschaften als Stoffwechselgift, als auch toxisch auf Nervenzellen wirken. In der Biochemie wird es für die Sequenzierung von Proteinen eingesetzt. Bromcyan spaltet selektiv C-terminal nach der Aminosäure Methionin. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 8.1 dargestellt.

Durchführung:

- Proteinbande aus dem Gel ausschneiden, zerkleinern und wässern
- Gelstücke durch Acetonitril entwässern.

- Entwässerte Gelstücke durch 70% Ameisensäure waschen.
 - Proteinextraktion durch Zugabe von 2,5% BrCN in 70% Ameisensäure über Nacht, schüttelt bei RT.
 - Überstand abnehmen und in der Speed-Vac lyophilisieren
 - Gelstücke in 5% Ammoniakwasser waschen
 - 2. Überstand mit Lyophilisat vereinigen und erneut in der Speed-Vac trocknen
- Lyophilisat erneut mit 50 µl 5% Ammoniakwasser waschen und erneut trocknen

BrCN-Spaltung

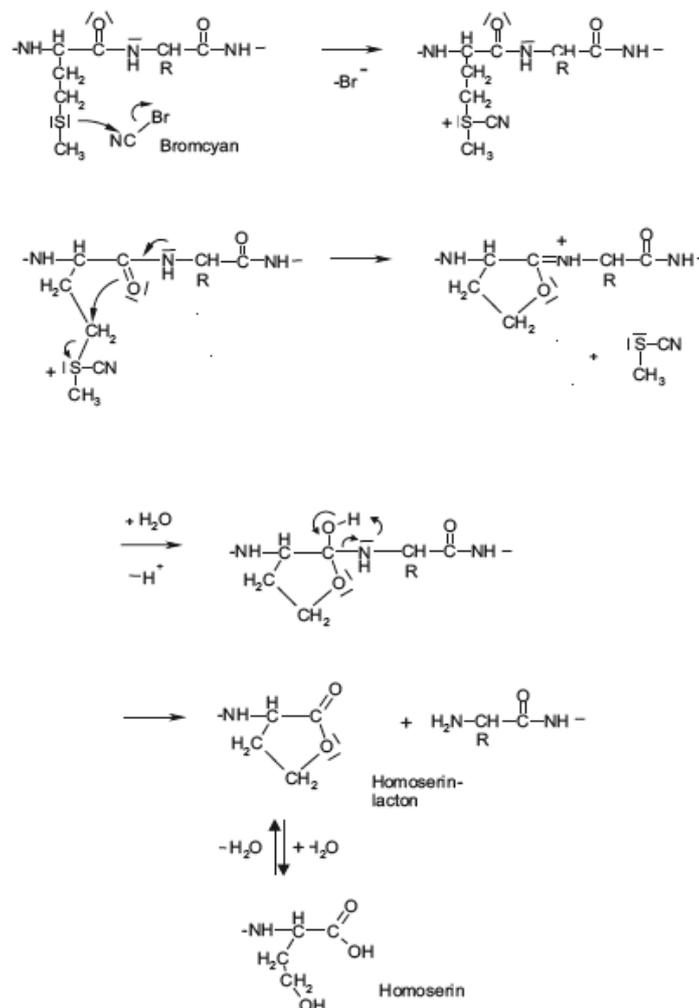


Abbildung 8.1.: Schema der BrCN Spaltung von Peptiden unter sauren Bedingungen an Methionin.

Anschließend kann die Probe in Tris-Puffer gelöst werden und z.B. auf eine Schägger-PAGE (8.2.9.4) oder Reversed Phase HPLC (8.2.3.7) weiter analysiert werden.

9 Literaturverzeichnis

1. Dhayalan, A. u. a. Mapping of Protein–Protein Interaction Sites by the ‘Absence of Interference’ Approach. *Journal of molecular biology* **376**, 1091-1099(2008).
2. Cohen, P. Protein kinases—the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov* **1**, 309-15(2002).
3. Rubin, G.M. u. a. Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* **287**, 2204—2215(2000).
4. Manning, G. u. a. The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**, 1912—1934(2002).
5. Lindberg, R.A., Quinn, A.M. & Hunter, T. Dual-specificity protein kinases: will any hydroxyl do? *Trends Biochem Sci* **17**, 114—119(1992).
6. Hunter, T. Signaling—2000 and beyond. *Cell* **100**, 113-27(2000).
7. Cohen, P. The regulation of protein function by multisite phosphorylation—a 25 year update. *Trends Biochem Sci* **25**, 596—601(2000).
8. Joseph, R.E. u. a. A remote substrate docking mechanism for the tec family tyrosine kinases. *Biochemistry* **46**, 5595-603(2007).
9. Johnson, L.N. & Lewis, R.J. Structural basis for control by phosphorylation. *Chem Rev* **101**, 2209-42(2001).
10. Ohren, J.F. u. a. Structures of human MAP kinase kinase 1 (MEK1) and MEK2 describe novel noncompetitive kinase inhibition. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 1192-7(2004).
11. Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**, 211-25(2000).
12. Wei, L. u. a. Expression, characterization, and crystallization of the catalytic core of the human insulin receptor protein-tyrosine kinase domain. *J Biol Chem* **270**, 8122-30(1995).
13. Zheng, J. u. a. Crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with magnesium-ATP and peptide inhibitor. *Biochemistry* **32**, 2154-2161(1993).
14. Knighton, D.R. u. a. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **253**, 407-14(1991).
15. Hubbard, S.R. Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Prog Biophys Mol Biol* **71**, 343-58(1999).
16. Kornev, A.P. u. a. Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17783—17788(2006).
17. Huse, M. & Kuriyan, J. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* **109**, 275—282(2002).
18. Cheng, K. & Koland, J.G. Nucleotide-binding properties of kinase-deficient epidermal-growth-factor-receptor mutants. *Biochem J* **15**, 353-9(1998).
19. Ge, G. u. a. Activation mechanism of solubilized epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **290**, 914-20(2002).
20. Nolen, B., Taylor, S. & Ghosh, G. Regulation of Protein Kinases Controlling Activity through Activation Segment Conformation. *Molecular cell* **15**, 661-675(2004).
21. Favelyukis, S. u. a. Structure and autoregulation of the insulin-like growth factor 1 receptor kinase. *Nat Struct Biol* **8**, 1058-63(2001).
22. Hubbard, S.R. Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. *EMBO J* **16**, 5572-81(1997).
23. Madhusudan u. a. cAMP-dependent protein kinase: crystallographic insights into substrate recognition and phosphotransfer. *Protein Sci* **3**, 176-87(1994).
24. Brown, N.R. u. a. The structural basis for specificity of substrate and recruitment peptides for cyclin-dependent kinases. *Nature Cell Biology* **1**, 438-443(1999).
25. Yuan, C.J., Huang, C.Y. & Graves, D.J. Phosphorylase kinase, a metal ion-dependent dual specificity kinase. *J Biol Chem* **268**, 17683-6(1993).
26. Johnson, L.N. u. a. The Eleventh Datta Lecture. The structural basis for substrate recognition and control by protein kinases. *FEBS Lett* **430**, 1-11(1998).
27. Ullrich, A. u. a. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J* **5**, 2503—2512(1986).
28. Andersen, A.S., Wiberg, F.C. & Kjeldsen, T. Localization of specific amino acids contributing to insulin specificity of the insulin receptor. *Ann N Y Acad Sci* **766**, 466-8(1995).
29. Yip, C.C. u. a. Localization of the insulin-binding site to the cysteine-rich region of the insulin receptor alpha-subunit. *Biochemical and biophysical research communications* **157**, 321(1988).
30. Whittaker, J. u. a. Alanine scanning mutagenesis of a type 1 insulin-like growth factor receptor ligand binding site. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 43980-43986(2001).

31. Jansson, M. u. a. Characterization of Ligand Binding of a Soluble Human Insulin-like Growth Factor I Receptor Variant Suggests a Ligand-induced Conformational Change. *J. Biol. Chem.* **272**, 8189-8197(1997).
32. Carlberg, M. u. a. Mevalonic Acid Is Limiting for N-Linked Glycosylation and Translocation of the Insulin-like Growth Factor-1 Receptor to the Cell Surface. Evidence for a new link between 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase and cell growth. *J. Biol. Chem.* **271**, 17453-17462(1996).
33. Dricu, A. u. a. Mevalonate-regulated mechanisms in cell growth control: role of dolichyl phosphate in expression of the insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) in comparison to Ras prenylation and expression of c-myc. *Glycobiology* **7**, 625-633(1997).
34. Taylor SS, R.E. How do protein kinases discriminate between serine/threonine and tyrosine? Structural insights from the insulin receptor protein-tyrosine kinase. *FASEB J* **9**, 1255-66(1995).
35. Kohanski, R.A. u. a. Partial activation of the insulin receptor kinase domain by juxtamembrane autophosphorylation. *Biochemistry* **37**, 11289-300(1998).
36. Kohanski, R.A. Insulin receptor autophosphorylation. II. Determination of autophosphorylation sites by chemical sequence analysis and identification of the juxtamembrane sites. *Biochemistry* **32**, 5773—5780(1993).
37. Kohanski, R.A. Insulin receptor autophosphorylation. I. Autophosphorylation kinetics of the native receptor and its cytoplasmic kinase domain. *Biochemistry* **32**, 5766—5772(1993).
38. Tavaré, J.M. & Denton, R.M. Studies on the autophosphorylation of the insulin receptor from human placenta. Analysis of the sites phosphorylated by two-dimensional peptide mapping. *Biochem J* **252**, 607—615(1988).
39. White, M.F. & Kahn, C.R. Cascade of autophosphorylation in the beta-subunit of the insulin receptor. *J Cell Biochem* **39**, 429—441(1989).
40. Munshi, S. u. a. Crystal structure of the Apo, unactivated insulin-like growth factor-1 receptor kinase. Implication for inhibitor specificity. *J Biol Chem* **277**, 38797—38802(2002).
41. Tennagels, N. u. a. Identification of Ser(1275) and Ser(1309) as autophosphorylation sites of the human insulin receptor in intact cells. *Biochem Biophys Res Commun* **282**, 387—393(2001).
42. Noelle, V., Tennagels, N. & Klein, H.W. A single substitution of the insulin receptor kinase inhibits serine autophosphorylation in vitro: evidence for an interaction between the C-terminus and the activation loop. *Biochemistry* **39**, 7170-7(2000).
43. Parvaresh, S. Grundlagen zum dualen Mechanismus der Insulinrezeptorkinase. *Dissertation Uni Köln* (2000).
44. Parvaresh, S. u. a. 14-3-3 binding to the IGF-1 receptor is mediated by serine autophosphorylation. *FEBS Lett* **532**, 357-62(2002).
45. Baer, K. u. a. Dimerization-induced activation of soluble insulin/IGF-1 receptor kinases: an alternative mechanism of activation. *Biochemistry* **40**, 14268-78(2001).
46. Siddle, K. The insulin receptor and type I IGF receptor: comparison of structure and function. *Prog Growth Factor Res* **4**, 301—320(1992).
47. Moller, D.E. u. a. Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNAs in man. *Mol Endocrinol* **3**, 1263-9(1989).
48. Soos, M.A. u. a. Receptors for insulin and insulin-like growth factor-I can form hybrid dimers. Characterisation of hybrid receptors in transfected cells. *Biochem J* **270**, 383—390(1990).
49. Whittaker, J. Hybrid insulin receptors. Molecular mechanisms of negative-dominant mutations in receptor-mediated insulin resistance. *Diabetes Care* **13**, 576-581(1990).
50. Pandini, G. u. a. Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor overexpression in breast cancers leads to insulin/IGF-I hybrid receptor overexpression: evidence for a second mechanism of IGF-I signaling. *Clin Cancer Res* **5**, 1935—1944(1999).
51. Soos, M.A., Field, C.E. & Siddle, K. Purified hybrid insulin/insulin-like growth factor-I receptors bind insulin-like growth factor-I, but not insulin, with high affinity. *Biochem J* **290** (Pt 2), 419—426(1993).
52. Kellerer, M., Lammers, R. & Haring, H.U. Insulin signal transduction: possible mechanisms for insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **107**, 97—106(1999).
53. Pitcher, J.A. u. a. Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the beta-adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with G beta gamma subunits and lipid. *J Biol Chem* **270**, 11707-10(1995).
54. Salim, K. u. a. Distinct specificity in the

- recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. *EMBO J* **15**, 6241-50(1996).
55. Eck, M.J. u. a. Structure of the IRS-1 PTB domain bound to the juxtamembrane region of the insulin receptor. *Cell* **85**, 695-705(1996).
56. Vogel, W. & Ullrich, A. Multiple in vivo phosphorylated tyrosine phosphatase SHP-2 engages binding to Grb2 via tyrosine 584. *Cell Growth Differ* **7**, 1589—1597(1996).
57. Winnay, J.N. u. a. Gab-1-mediated IGF-1 signaling in IRS-1-deficient 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* **275**, 10545—10550(2000).
58. Hay, N. & Sonenberg, N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development* **18**, 1926-1945(2004).
59. Franke, T.F. & Cantley, L.C. Apoptosis A Bad kinase makes good. *Nature* **390**, 116-117(1997).
60. Kwiatkowski, D.J. Tuberous sclerosis: from tubers to mTOR. *Annals of Human Genetics* **67**, 87-96(2003).
61. Kwiatkowski, D.J. Rhebbing up mTOR: new insights on TSC1 and TSC2, and the pathogenesis of tuberous sclerosis. *Cancer Biol Ther* **2**, 471-6(2003).
62. Inoki, K. u. a. *Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling*. **17**, 1829-1834(Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2003).
63. Dennis, P.B., Fumagalli, S. & Thomas, G. Target of rapamycin (TOR): balancing the opposing forces of protein synthesis and degradation. *Current opinion in genetics & development* **9**, 49-54(1999).
64. Gingras, A.C., Raught, B. & Sonenberg, N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes & Development* **15**, 807-826(2001).
65. Datta, S.R. u. a. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**, 231-242(1997).
66. Salcini, A.E. u. a. Formation of Shc-Grb2 complexes is necessary to induce neoplastic transformation by overexpression of Shc proteins. *Oncogene* **9**, 2827—2836(1994).
67. Rozakis-Adcock, M. u. a. Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature* **360**, 689-692(1992).
68. Bowtell, D. u. a. Identification of murine homologues of the Drosophila son of sevenless gene: potential activators of ras. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**, 6511-6515(1992).
69. Bonfini, L. u. a. The Son of sevenless gene product: a putative activator of Ras. *Science* **255**, 603-606(1992).
70. Aronheim, A. u. a. Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway. *Cell* **78**, 949-61(1994).
71. Moodie, S.A. & Wolfman, A. The 3Rs of life: Ras, Raf and growth regulation. *Trends Genet* **10**, 44-8(1994).
72. Schaeffer, H.J. & Weber, M.J. *Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers*. **19**, 2435-2444(Am Soc Microbiol: 1999).
73. Ceresa, B.P. & Pessin, J.E. Insulin regulation of the Ras activation/inactivation cycle. *Molecular and cellular biochemistry* **182**, 23-29(1998).
74. Satoh, T., Nakafuku, M. & Kaziro, Y. *Function of Ras as a molecular switch in signal transduction*. **267**, 24149-24152(ASBMB: 1992).
75. Kuhne, M.R. u. a. The insulin receptor substrate 1 associates with the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 11479-11481(1993).
76. QU, C. The SHP-2 tyrosine phosphatase: signaling mechanisms and biological functions. *Cell Research* **10**, 279-288(2000).
77. Tang, T.L. u. a. The SH2-containing protein-tyrosine phosphatase SH-PTP2 is required upstream of MAP kinase for early Xenopus development. *Cell* **80**, 473(1995).
78. Hadari, Y.R. u. a. Binding of Shp2 tyrosine phosphatase to FRS2 is essential for fibroblast growth factor-induced PC12 cell differentiation. *Molecular and Cellular Biology* **18**, 3966-3973(1998).
79. Shi, Z.Q., Lu, W. & Feng, G.S. The Shp-2 tyrosine phosphatase has opposite effects in mediating the activation of extracellular signal-regulated and c-Jun NH2-terminal mitogen-activated protein kinases. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 4904-4908(1998).
80. Milarski, K.L. & Saltiel, A.R. Expression of catalytically inactive Syp phosphatase in 3T3 cells blocks stimulation of mitogen-activated protein kinase by insulin. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 21239-21243(1994).
81. Courtneidge, S.A. u. a. The Src family of protein tyrosine kinases: regulation and functions. *Dev Suppl* 57-64(1993).
82. Tobe, K. u. a. Csk enhances insulin-stimulated dephosphorylation of focal adhesion proteins. *Molecular and Cellular Biology* **16**, 4765-4772(1996).
83. Li, W., Fan, J. & Woodley, D.T. Nck/Dock: an adapter between cell surface receptors and the

- actin cytoskeleton.
84. Dong, L.Q. u. a. Site-directed mutagenesis and yeast two-hybrid studies of the insulin and insulin-like growth factor-1 receptors: the Src homology-2 domain-containing protein hGrb10 binds to the autophosphorylated tyrosine residues in the kinase domain of the insulin receptor. *Mol Endocrinol* **11**, 1757-65(1997).
85. Wang, J. u. a. Grb10, a positive, stimulatory signaling adapter in platelet-derived growth factor BB-, insulin-like growth factor I-, and insulin-mediated mitogenesis. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 6217-6228(1999).
86. Morrione, A. u. a. The role of mGrb10alpha in insulin-like growth factor I-mediated growth. *J Biol Chem* **272**, 26382-7(1997).
87. Stein, E.G., Gustafson, T.A. & Hubbard, S.R. The BPS domain of Grb10 inhibits the catalytic activity of the insulin and IGF1 receptors. *FEBS Lett* **493**, 106-11(2001).
88. Matsuda, M. u. a. CRK protein binds to two guanine nucleotide-releasing proteins for the Ras family and modulates nerve growth factor-induced activation of Ras in PC12 cells. *Molecular and Cellular Biology* **14**, 5495-5500(1994).
89. Rosenfeld, R.G. & Roberts, C.T. *The IGF system: molecular biology, physiology, and clinical applications*. (Humana Press Totowa, NJ: 1999).
90. Chang, C.I. u. a. Crystal structures of MAP kinase p38 complexed to the docking sites on its nuclear substrate MEF2A and activator MKK3b. *Mol Cell* **9**, 1241-9(2002).
91. Adams, P.D. u. a. Identification of a cyclin-cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors. *Mol Cell Biol* **16**, 6623-33(1996).
92. Adams, P.D. u. a. Retinoblastoma protein contains a C-terminal motif that targets it for phosphorylation by cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol* **19**, 1068-80(1999).
93. Jacobs, D. u. a. Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes Dev* **13**, 163—175(1999).
94. Kallunki, T. u. a. c-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions. *Cell* **87**, 929—939(1996).
95. Lee, T. u. a. Docking motif interactions in MAP kinases revealed by hydrogen exchange mass spectrometry. *Mol Cell* **14**, 43—55(2004).
96. Luciani, M.G. u. a. The C-terminal regulatory domain of p53 contains a functional docking site for cyclin A. *J Mol Biol* **300**, 503—518(2000).
97. Schulman, B.A., Lindstrom, D.L. & Harlow, E. Substrate recruitment to cyclin-dependent kinase 2 by a multipurpose docking site on cyclin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10453—10458(1998).
98. Tanoue, T. u. a. Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *EMBO J* **20**, 466—479(2001).
99. Wallace, M. & Ball, K.L. Docking-dependent regulation of the Rb tumor suppressor protein by Cdk4. *Mol Cell Biol* **24**, 5606—5619(2004).
100. Lee, S. u. a. Docking-based substrate recognition by the catalytic domain of a protein tyrosine kinase, C-terminal Src kinase (Csk). *J Biol Chem* **281**, 8183-9(2006).
101. Lee, S. u. a. Determination of the substrate-docking site of protein tyrosine kinase C-terminal Src kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14707—14712(2003).
102. Clackson, T. & Wells, J.A. A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. *Science* **267**, 383-386(1995).
103. Schreiber, G. & Fersht, A.R. Energetics of protein-protein interactions: analysis of the barnase-barstar interface by single mutations and double mutant cycles. *J Mol Biol* **248**, 478-86(1995).
104. Wilcox, H.M. & Berg, L.J. Itk phosphorylation sites are required for functional activity in primary T cells. *J Biol Chem* **278**, 37112-21(2003).
105. Miller, A.T. & Berg, L.J. Defective Fas ligand expression and activation-induced cell death in the absence of IL-2-inducible T cell kinase. *J Immunol* **168**, 2163-72(2002).
106. Perez-Villar, J.J. & Kanner, S.B. Regulated association between the tyrosine kinase Emt/Itk/Tsk and phospholipase-C gamma 1 in human T lymphocytes. *J Immunol* **163**, 6435-41(1999).
107. Schaeffer, E.M. u. a. Requirement for Tec kinases Rlk and Itk in T cell receptor signaling and immunity. *Science* **284**, 638-41(1999).
108. Bonvini, E. u. a. On the mechanism coupling phospholipase Cgamma1 to the B- and T-cell antigen receptors. *Adv Enzyme Regul* **43**, 245-69(2003).
109. Nore, B.F. u. a. Identification of phosphorylation sites within the SH3 domains of Tec family tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta* **1645**, 123-32(2003).
110. Burack, W.R. & Shaw, A.S. Signal transduction: hanging on a scaffold. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 211-6(2000).
111. Gustin, M.C. u. a. MAP kinase pathways in the

- yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 1264-300(1998).
112. Marcus, S. u. a. Complexes between STE5 and components of the pheromone-responsive mitogen-activated protein kinase module. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7762-6(1994).
113. Choi, K.Y. u. a. Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*. *Cell* **78**, 499-512(1994).
114. Printen, J.A. & Sprague, G.F. Protein-protein interactions in the yeast pheromone response pathway: Ste5p interacts with all members of the MAP kinase cascade. *Genetics* **138**, 609-19(1994).
115. Posas, F. & Saito, H. Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* **276**, 1702-5(1997).
116. Whitmarsh, A.J. & Davis, R.J. Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends in Biochemical Sciences* **23**, 481-485(1998).
117. Elion, E.A. SIGNAL TRANSDUCTION: Routing MAP Kinase Cascades. *Science* **281**, 1625-1626(1998).
118. Faux, M.C. & Scott, J.D. Molecular Glue: Kinase Anchoring and Scaffold Proteins. *Cell* **85**, 9-12(1996).
119. Cohen, L., Henzel, W.J. & Baeuerle, P.A. IKAP is a scaffold protein of the I[κ]B kinase complex. *Nature* **395**, 292-296(1998).
120. Rothwarf, D.M. u. a. IKK- γ is an essential regulatory subunit of the I[κ]B kinase complex. *Nature* **395**, 297-300(1998).
121. Kortum, R.L. u. a. The molecular scaffold kinase suppressor of Ras 1 (KSR1) regulates adipogenesis. *Mol Cell Biol* **25**, 7592-604(2005).
122. Kortum, R.L. & Lewis, R.E. The molecular scaffold KSR1 regulates the proliferative and oncogenic potential of cells. *Mol Cell Biol* **24**, 4407-16(2004).
123. Bashor, C.J. u. a. Using engineered scaffold interactions to reshape MAP kinase pathway signaling dynamics. *Science* **319**, 1539-43(2008).
124. Garrington, T.P. & Johnson, G.L. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 211-8(1999).
125. Bardwell, A.J. u. a. A conserved docking site in MEKs mediates high-affinity binding to MAP kinases and cooperates with a scaffold protein to enhance signal transmission. *J Biol Chem* **276**, 10374-86(2001).
126. Levchenko, A., Bruck, J. & Sternberg, P.W. Scaffold proteins may biphasically affect the levels of mitogen-activated protein kinase signaling and reduce its threshold properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**, 5818-5823(2000).
127. Locasale, J.W. Three-state kinetic mechanism for scaffold-mediated signal transduction. *Phys. Rev. E* **78**, 051921-7(2008).
128. Guy, G.R. u. a. Dockers at the crossroads. *Cellular Signalling* **14**, 11-20(2002).
129. Uhlik, M.T. u. a. Structural and evolutionary division of phosphotyrosine binding (PTB) domains. *J Mol Biol* **345**, 1-20(2005).
130. Baroni, M.G. u. a. A common mutation of the insulin receptor substrate-1 gene is a risk factor for coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 2975-80(1999).
131. Su, H.P. u. a. Interaction of CED-6/GULP, an adapter protein involved in engulfment of apoptotic cells with CED-1 and CD91/low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *J Biol Chem* **277**, 11772-9(2002).
132. Hu, Q. u. a. A candidate molecular mechanism for the association of an intronic polymorphism of FE65 with resistance to very late onset dementia of the Alzheimer type. *Hum Mol Genet* **11**, 465-75(2002).
133. Mammarella, S. u. a. Interaction between the G1057D variant of IRS-2 and overweight in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Hum Mol Genet* **9**, 2517-21(2000).
134. Porzio, O. u. a. The Gly972 \rightarrow Arg amino acid polymorphism in IRS-1 impairs insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Clin Invest* **104**, 357-364(1999).
135. Liquori, C.L. u. a. Mutations in a gene encoding a novel protein containing a phosphotyrosine-binding domain cause type 2 cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet* **73**, 1459-64(2003).
136. Margolis, B. u. a. The function of PTB domain proteins. *Kidney Int* **56**, 1230-1237(1999).
137. Blaikie, P. u. a. A region in Shc distinct from the SH2 domain can bind tyrosine-phosphorylated growth factor receptors. *J Biol Chem* **269**, 32031-32034(1994).
138. Zhou, M.M. u. a. Structure and ligand recognition of the phosphotyrosine binding domain of Shc. *Nature* **378**, 584-592(1995).
139. Zhou, M.M. u. a. Structural basis for IL-4 receptor phosphopeptide recognition by the IRS-1 PTB domain. *Nat Struct Biol* **3**, 388-93(1996).
140. Dhe-Paganon, S. u. a. Crystal structure of the pleckstrin homology-phosphotyrosine binding

- (PH-PTB) targeting region of insulin receptor substrate 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8378-83(1999).
141. Zhang, Z. u. a. Sequence-specific recognition of the internalization motif of the Alzheimer's amyloid precursor protein by the X11 PTB domain. *EMBO J* **16**, 6141—6150(1997).
142. Zwahlen, C. u. a. Multiple modes of peptide recognition by the PTB domain of the cell fate determinant Numb. *EMBO J* **19**, 1505-15(2000).
143. Li, S.C. u. a. Structure of a Numb PTB domain-peptide complex suggests a basis for diverse binding specificity. *Nat Struct Biol* **5**, 1075—1083(1998).
144. Dhalluin, C. u. a. Structural basis of SNT PTB domain interactions with distinct neurotrophic receptors. *Mol Cell* **6**, 921-9(2000).
145. Shi, N. u. a. Expression, crystallization and preliminary X-ray studies of the recombinant PTB domain of human dok-5 protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**, 2170-2(2002).
146. Shi, N. u. a. Structural basis for the specific recognition of RET by the Dok1 phosphotyrosine binding domain. *J Biol Chem* **279**, 4962—4969(2004).
147. Stolt, P.C. u. a. Origins of peptide selectivity and phosphoinositide binding revealed by structures of disabled-1 PTB domain complexes. *Structure* **11**, 569—579(2003).
148. Yun, M. u. a. Crystal structures of the Dab homology domains of mouse disabled 1 and 2. *J Biol Chem* **278**, 36572—36581(2003).
149. García-Alvarez, B. u. a. Structural determinants of integrin recognition by talin. *Mol Cell* **11**, 49-58(2003).
150. Hutchinson, E.G. & Thornton, J.M. A revised set of potentials for beta-turn formation in proteins. *Protein Sci* **3**, 2207-16(1994).
151. Farooq, A. u. a. Phosphotyrosine binding domains of Shc and insulin receptor substrate 1 recognize the NPXpY motif in a thermodynamically distinct manner. *J Biol Chem* **274**, 6114—6121(1999).
152. Wolf, G. u. a. PTB domains of IRS-1 and Shc have distinct but overlapping binding specificities. *J Biol Chem* **270**, 27407-10(1995).
153. White, M.F. u. a. A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor. *J Biol Chem* **263**, 2969-80(1988).
154. Johnston, A.M., Pirola, L. & Van Obberghen, E. Molecular mechanisms of insulin receptor substrate protein-mediated modulation of insulin signalling. *FEBS Lett* **546**, 32-6(2003).
155. Paz, K. u. a. A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* **272**, 29911—29918(1997).
156. Hotamisligil, G.S. u. a. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* **271**, 665—668(1996).
157. Ogihara, T. u. a. 14-3-3 protein binds to insulin receptor substrate-1, one of the binding sites of which is in the phosphotyrosine binding domain. *J Biol Chem* **272**, 25267—25274(1997).
158. Heidenreich, K. u. a. The insulin receptor: a protein kinase with dual specificity? *Biol Chem Hoppe Seyler* **375**, 99—104(1994).
159. Moch, M. Generierung und Charakterisierung monomerer und dimerer Insulinrezeptorkinasen. Diplomarbeit Uni Köln,(2008).
160. Sznepka, M. Untersuchungen von Heterodimeren der insulinrezeptorkinase. Diplomarbeit Uni Köln, (2008).
161. Kavounis, C.A. & Rentzperis, P. Structure of 1,6-cyclodecanedione bis[(o-nitrophenyl)hydrazone]. *Crystal Structure Communications* **42**, 3175-3187(1935).
162. Smith, G.G. & Ott, D.G. The Proximity Effect in the Alkaline Rearrangement of 1, 2-Diketones. I. The Migratory Aptitudes in the Rearrangement of o-Chlorobenzil and 1-Chlorophenanthraquinone1, 2. *J. Am. Chem. Soc* **77**, 2342-2343(1955).
163. Lumry, R. In " The Enzymes"(PD Boyer, H. Lardy, and K. Myrback, eds.), Vol. I. *Academic Press, New York* **4**, 157-231(1959).
164. Gelperin, D. u. a. 14-3-3 proteins: potential roles in vesicular transport and Ras signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11539—11543(1995).
165. van Heusden, G.P. u. a. The 14-3-3 proteins encoded by the BMH1 and BMH2 genes are essential in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and can be replaced by a plant homologue. *Eur J Biochem* **229**, 45—53(1995).
166. Yaffe, M.B. u. a. The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell* **91**, 961-71(1997).
167. Margolis, S.S. & Kornbluth, S. When the checkpoints have gone: insights into Cdc25 functional activation. *Cell Cycle* **3**, 425—428(2004).

168. Bender, C. Modifikationen der Interaktionen des IRS-1 mit dem Insulinrezeptor. 112 Diplomarbeit Uni Köln,(2006).
169. Noguchi, T. u. a. Characterization of a 115-kDa protein that binds to SH-PTP2, a protein-tyrosine phosphatase with Src homology 2 domains, in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **271**, 27652—27658(1996).
170. Somwar, R. u. a. Differential Effects of Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibition on Intracellular Signals Regulating GLUT4 Translocation and Glucose Transport. *J. Biol. Chem.* **276**, 46079-46087(2001).
171. Hanks, S.K., Quinn, A.M. & Hunter, T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**, 42—52(1988).
172. Songyang, Z. u. a. Catalytic specificity of protein-tyrosine kinases is critical for selective signalling. *Nature* **373**, 536-9(1995).
173. Cobb, M.H. & Goldsmith, E.J. How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem* **270**, 14843-6(1995).
174. Al-Hasani, H. u. a. Identification of Ser-1275 and Ser-1309 as autophosphorylation sites of the insulin receptor. *FEBS Lett* **400**, 65-70(1997).
175. Ballotti, R. u. a. Intermolecular transphosphorylation between insulin receptors and EGF-insulin receptor chimerae. *EMBO J* **8**, 3303-9(1989).
176. Lewis, R.E. u. a. Insulin-sensitive phosphorylation of serine 1293/1294 on the human insulin receptor by a tightly associated serine kinase. *J Biol Chem* **265**, 947—954(1990).
177. Kessels, H.W.H.G., Ward, A.C. & Schumacher, T.N.M. Specificity and affinity motifs for Grb2 SH2-ligand interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8524-9(2002).
178. Zarrinpar, A., Bhattacharyya, R.P. & Lim, W.A. The structure and function of proline recognition domains. *Sci STKE* **2003**, RE8(2003).
179. Pawson, T. Specificity in Signal Transduction : : From Phosphotyrosine-SH2 Domain Interactions to Complex Cellular Systems. *Cell* **116**, 191-203(2004).
180. Karau, D. Wie Signalkomplexe die Spezifität von Kinasen beeinflussen. 91 Diplomarbeit Uni Köln,(2004).
181. Okada, M. u. a. CSK: a protein-tyrosine kinase involved in regulation of src family kinases. *J. Biol. Chem.* **266**, 24249-24252(1991).
182. Pinna, L.A. & Ruzzene, M. How do protein kinases recognize their substrates? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1314**, 191-225(1996).
183. Cole, P.A. u. a. Protein tyrosine kinases Src and Csk: a tail's tale. *Current Opinion in Chemical Biology* **7**, 580-585(2003).
184. Kyriakis, J. & Avruch, J. pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *J. Biol. Chem.* **265**, 17355-17363(1990).
185. Guerra, B. u. a. The carboxy terminus of p53 mimics the polylysine effect of protein kinase CK2-catalyzed MDM2 phosphorylation. *Oncogene* **14**, 2683-8(1997).
186. Sondhi, D. u. a. Peptide and protein phosphorylation by protein tyrosine kinase Csk: insights into specificity and mechanism. *Biochemistry* **37**, 165—172(1998).
187. Lawlor, M.A. & Alessi, D.R. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci* **114**, 2903-2910(2001).
188. Pellicena, P., Stowell, K.R. & Miller, W.T. Enhanced phosphorylation of Src family kinase substrates containing SH2 domain binding sites. *J Biol Chem* **273**, 15325—15328(1998).
189. Jardetzky, O. & Lefevre, J.F. Protein dynamics. *FEBS Lett* **338**, 246-50(1994).
190. Sohn, J. u. a. Remote hot spots mediate protein substrate recognition for the Cdc25 phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16437—16441(2004).
191. Zick, Y. Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. *Trends Cell Biol* **11**, 437-41(2001).
192. Zick, Y. Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance. *Sci STKE* **2005**, pe4(2005).
193. Mothe, I. & Van Obberghen, E. Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on multiple serine residues, 612, 632, 662, and 731, modulates insulin action. *J Biol Chem* **271**, 11222-7(1996).
194. Paz, K. u. a. Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) by protein kinase B positively regulates IRS-1 function. *J Biol Chem* **274**, 28816-22(1999).
195. Chebotareva, N.A., Kurganov, B.I. & Livanova, N.B. Biochemical effects of molecular crowding. *Biochemistry (Moscow)* **69**, 1239-1251(2004).
196. Turk, B.E. Understanding and exploiting substrate recognition by protein kinases. *Current Opinion in Chemical Biology* **12**, 4-10(2008).
197. Locasale, J.W., Shaw, A.S. & Chakraborty, A.K.

- Scaffold proteins confer diverse regulatory properties to protein kinase cascades. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13307–13312(2007).
198. Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. Molecular cloning : a laboratory manual. *New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1989).
199. Zhou, C., Yang, Y. & Jong, A.Y. Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques* **8**, 172—173(1990).
200. Chung, C.T., Niemela, S.L. & Miller, R.H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2172—2175(1989).
201. Smith, D.B. & Johnson, K.S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31-40(1988).
202. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54(1976).
203. Rosenfeld, J. u. a. In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal Biochem* **203**, 173-9(1992).
204. Boyle, W.J., van der Geer, P. & Hunter, T. Phosphopeptide mapping and phosphoamino acid analysis by two-dimensional separation on thin-layer cellulose plates. *Methods Enzymol* **201**, 110-49(1991).

10 Anhang

10.1 Plasmidkarten

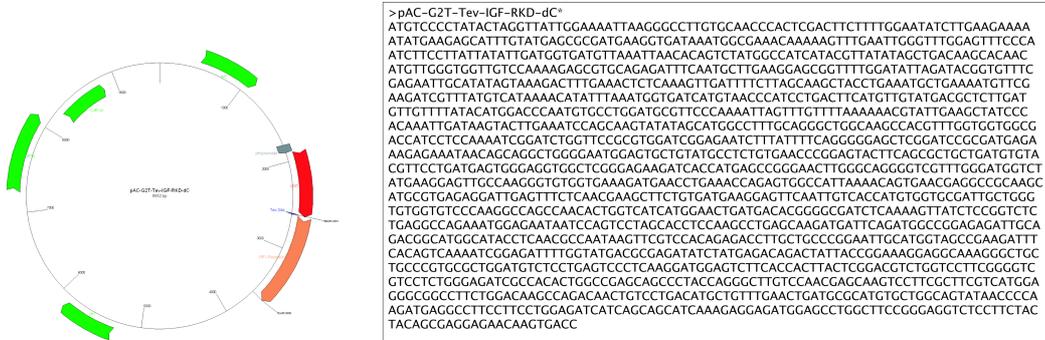


Abbildung 10.1.: Plasmidkarte und Nukleotidsequenz als FASTA-File des kodierenden Bereiches von GST-TS-IGF_{ΔC} aus dem Vektor pAc-G2T-TS-IGF-dC

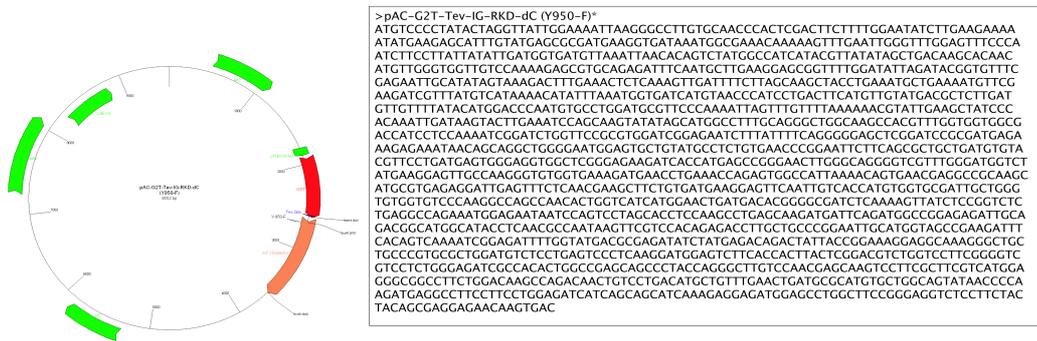


Abbildung 10.2.: Plasmidkarte und Nukleotidsequenz als FASTA-File des kodierenden Bereiches von GST-TS-IGF_{ΔC Phe} aus dem Vektor pAc-G2T-TS-IGF-dC-Y950F

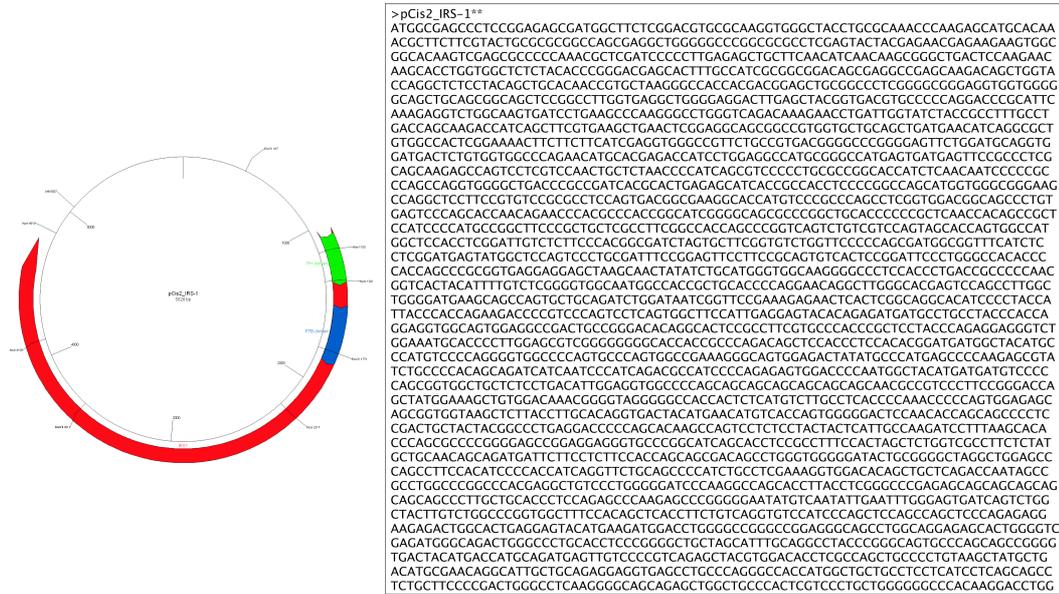


Abbildung 10.3.: Plasmidkarte und Nukleotidsequenz als FASTA-File des kodierenden Bereiches von pCis2-IRS-1



Abbildung 10.4.: Plasmidkarte und Nukleotidsequenz als FASTA-File des kodierenden Bereiches von GST-PTB₂₇₅ aus dem Vektor pGex-3X-IRS-1-PTB275

10.2 Reinigungsdokumentationen

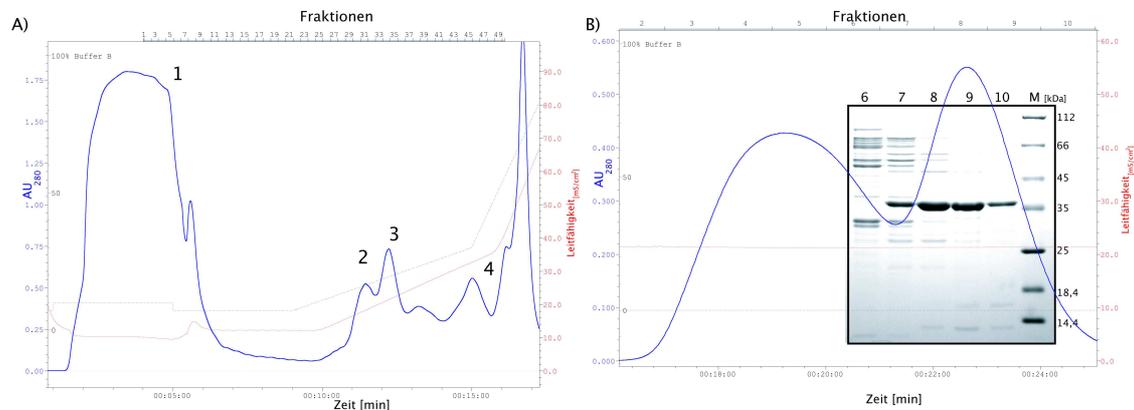


Abbildung 10.7.: Reinigungsdokumentation der IRKD.

Die Kinase durch eine Kombination aus Anionenaustauscherchromatographie (A) und Gelfiltrationschromatographie (B) direkt aus Sf9-Zellen bis zu einem Reinheitsgrad von 90% gereinigt. Peak #3 entspricht der Kinase die weiter aufgereinigt wurde. Als Insert ist die SDS-PAGE der Fraktionen nach Gelchromatographie gezeigt. Die Kinase befindet sich im zweiten Peak der Gelchromatographie (blau= Absorbtion bei 280nm; rot= Leitfähigkeit in [mS/cm²])

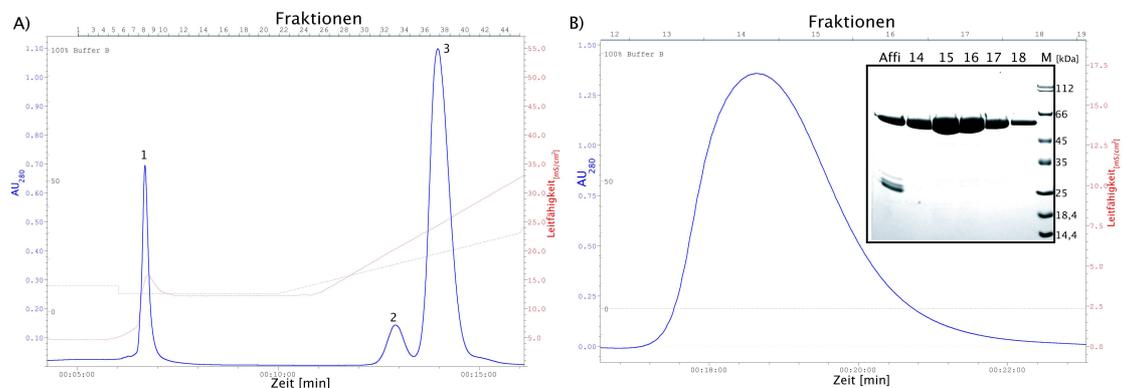


Abbildung 10.8.: Reinigungsdokumentation der GST-TS-IGF Δ C.

Nach GSH-Affinitätschromatographie wurde die Kinase durch eine Kombination aus Anionenaustauscherchromatographie (A) und Gelfiltrationschromatographie (B) bis zu einem Reinheitsgrad von über 99% gereinigt. Peak #3 entspricht der Kinase die weiter aufgereinigt wurde. Als Insert ist die SDS-PAGE der Fraktionen nach Gelchromatographie gezeigt. In der ersten Spur ist zum Vergleich die Kinase nach GSH-Reinigung aufgetragen (blau= Absorbtion bei 280nm; rot= Leitfähigkeit in [mS/cm²])

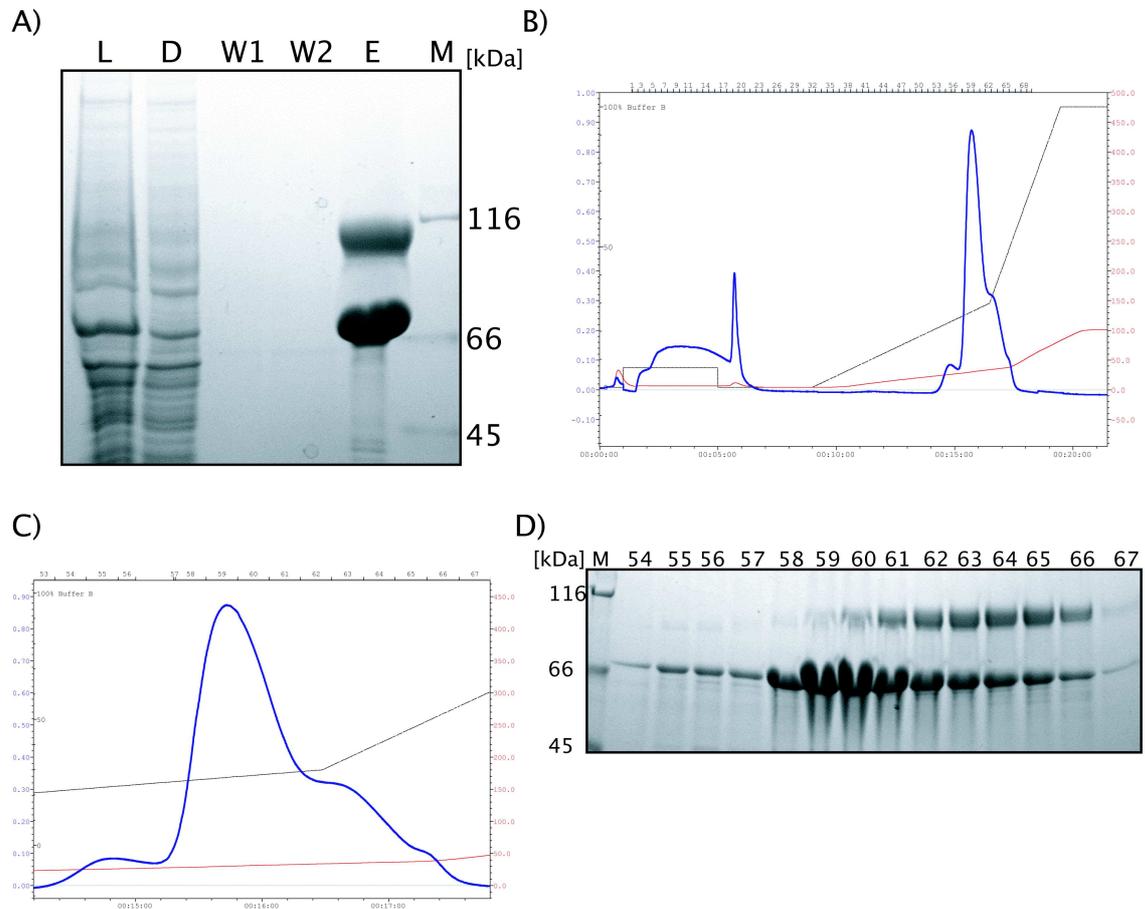


Abbildung 10.9.: Reinigungsdokumentation des Hybrids GST-IRKD-IRS-1₇₃₈.

Das Hybrid besteht aus einer GST-IRKD-Untereinheit (66 kDa) und einer GST-TS-IRS-1₇₃₈-Untereinheit (116kDa). Das Hybrid wurde durch eine Kombination aus GSH-Affinitätschromatographie mit anschließender Ionenaustauscherchromatographie aufgereinigt. A) SDS-Reinigungsdokumentation der GSH-Aufreinigung (L:Lysat; D:Durchfluss, W1:Waschschrift mit 1m NaCl; W2:Waschschrift mit 1xPBS; E: Eluat, M:Marker). B+C) Diagramm der ResusQ-Anionenaustauscher-Chromatographie (C:Detailansicht). D: SDS-PAGE zur Dokumentation der Anionenaustauscherchromatographie (M:Marker;54-67: Fraktionen der FPLC)

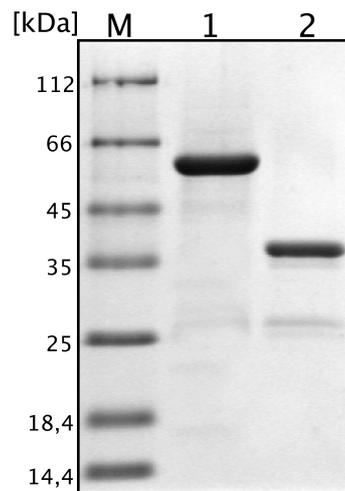


Abbildung 10.10.: Reinigungsdokumentation der TEV-Spaltung von GST-TS-IGF_{ΔC}.

1: Ansatz vor dem Verdau; 2: monomere TS-IGF_{ΔC} nach GSH-Reinigung und Ni-NTA-Reinigung

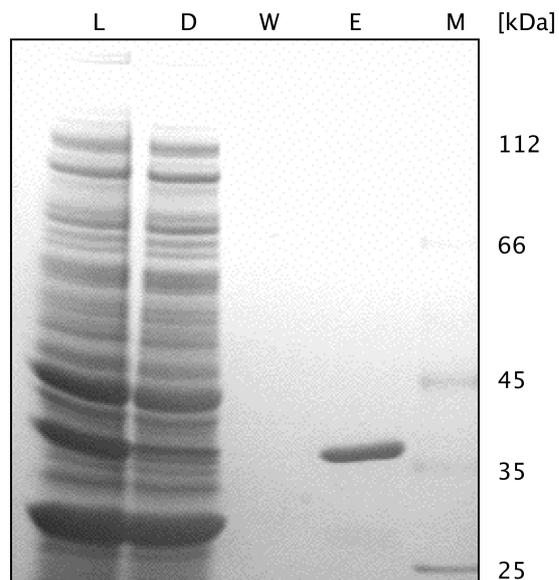


Abbildung 10.11.: Reinigungsdokumentation von GST-PTB₂₇₅.

Das Protein GST-PTB₂₇₀ wurde über GSH-Affinitätschromatographie aus *E.coli* gereinigt. L:Lysat; D:Durchfluss; W:Waschschritt mit 1M NaCl E:Eluat; M:Marker

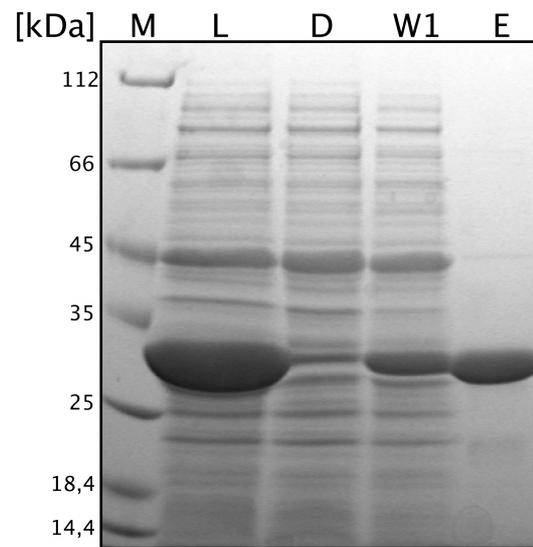


Abbildung 10.12.: Reinigungsdokumentation von GST-PTB₂₆₃.

M:Marker; L:Lysat; D:Durchfluss; W1:Waschschrift 1xPBS; E:Eluat

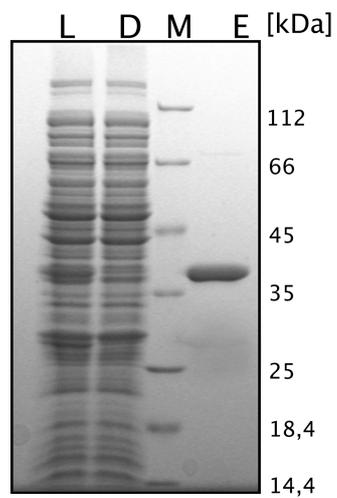


Abbildung 10.13.: Reinigungsdokumentation von GST-PTB_{S74A}.

M:Marker; L:Lysat; D:Durchfluss; E:Eluat

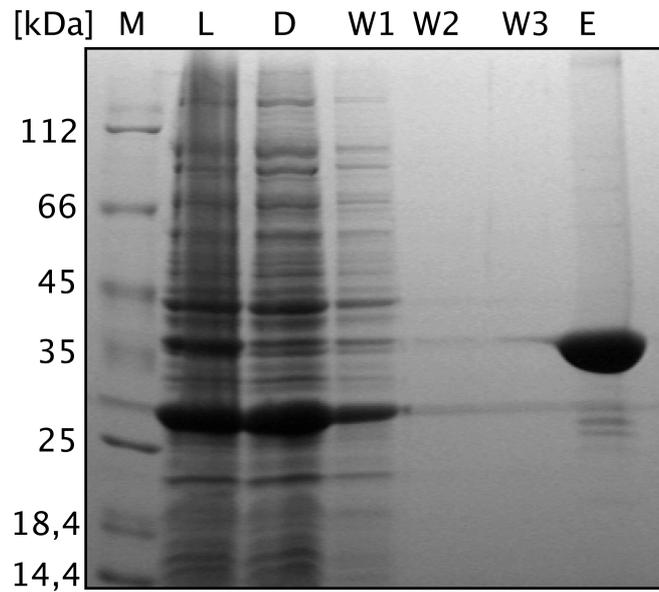


Abbildung 10.14.: Reinigungsdokumentation von *GST-14-3-3 γ* .

M:Marker; *L*:Lysat; *D*:Durchfluss; *W1*:Waschschrift 1xPBS; *W2*:Waschschrift 1M NaCl; *W3*:Waschschrift 1xPBS; *E*:Eluat

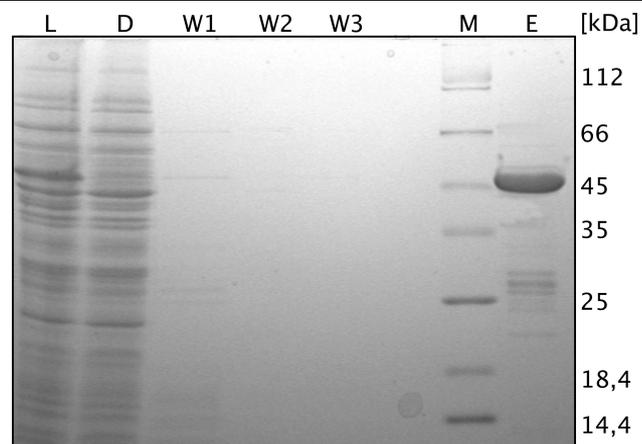


Abbildung 10.15.: Reinigungsdokumentation von *GST-PTB₃₇₀*

L:Lysat; *D*:Durchfluss; *W1*:Waschschrift mit 1xPBS; *W2*: Waschschrift mit 1M NaCl; *W3*: Waschschrift mit 1xPBS; *M*:Marker; *E*:Eluat

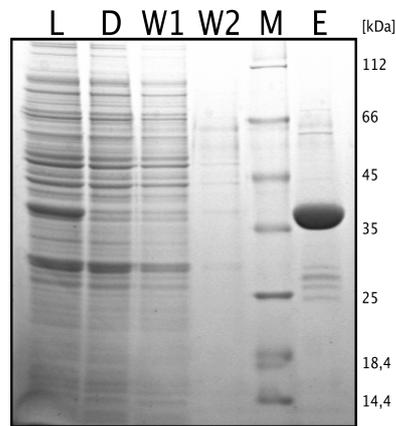


Abbildung 10.16.: Reinigungsdokumentation von GST-IGF_{NT}.

Der in *E.coli* exprimierte GST-IGF_{NT} wurde über GSH-Affinitätschromatographie aufgereinigt. L: Lysat; D: Durchfluss; W1: Waschschrift mit 1xPBS; W2: Waschschrift mit 1m NaCl; M: Marker; E: Eluat

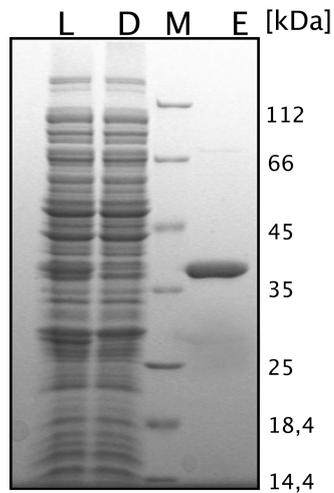


Abbildung 10.17.: Reinigungsdokumentation von GST-PTB_{S74A}.

M: Marker; L: Lysat; D: Durchfluss; E: Eluat

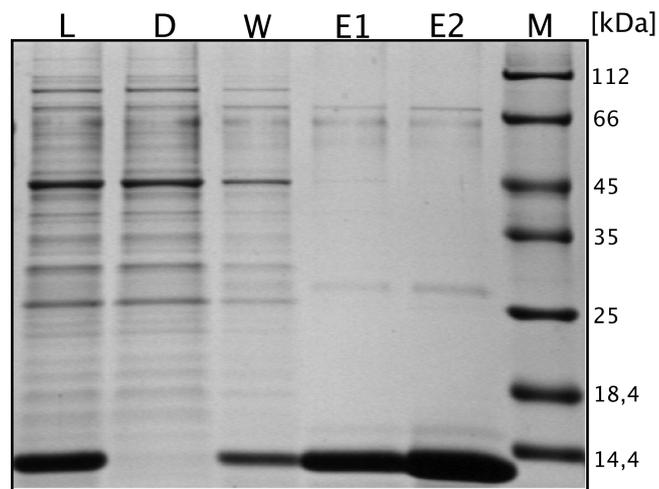


Abbildung 10.18.: Reinigungsdokumentation von His-Tyrtide-SPEptid-rCys

L:Lysat; D:Durchfluss; W:Waschschrift; E1+E2:Eluat; M:Marker

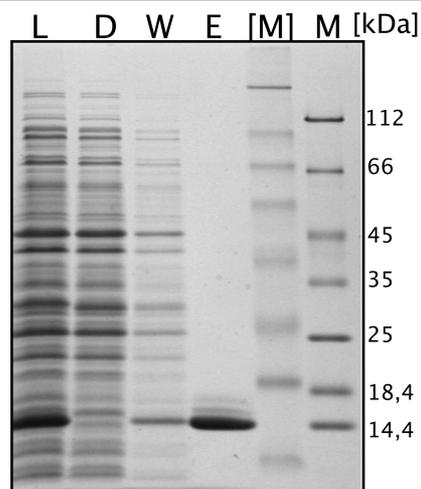


Abbildung 10.19.: Reinigungsdokumentation von His-PTB₂₆₃-SPEptid-rCys.

M:Marker; L:Lysat; D:Durchfluss; W:Waschschrift; E:Eluat

10.3 Phosphorylierungsreaktionen

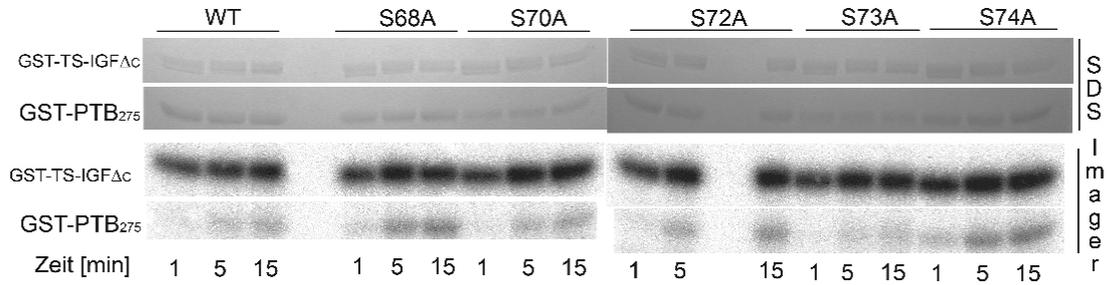


Abbildung 10.20.: Dokumentation des ersten Ala-Scans (siehe Kapitel 5.4.3)

Coomassie gefärbte SDS-PAGE und Phospho-Imager: Gezeigt sind in der Oberen Reihe die SDS-PAGE mit jeweils gleicher Kinasekonzentration und jeweiliger Substrat-Konzentration. In der unteren Reihe ist die Auswertung des Imagers gezeigt.

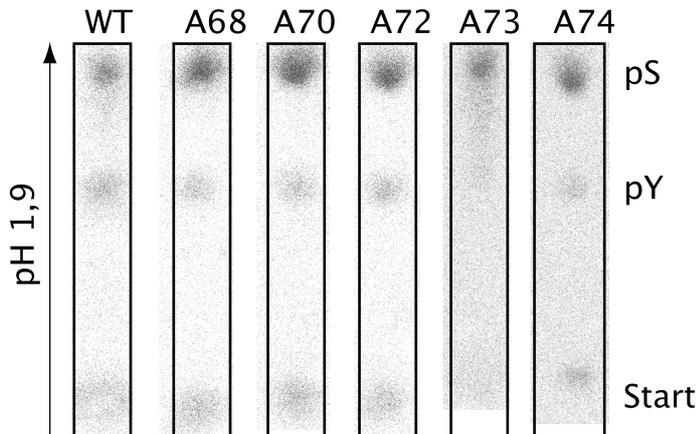


Abbildung 10.21.: 1D PASA des ersten Alanin-Scans (siehe Kapitel 5.4.3) aller PTB-Mutanten nach 30 min.

Es ist zu sehen, dass alle Mutanten durch die GST-TS-IGF Δ C überwiegend an Serin phosphoryliert werden. Die Mutanten GST-PTB_{S73A} und GST-PTB_{S74A} zeigen sogar eine stärkere Serinphosphorylierung als die Wildtyp-PTB

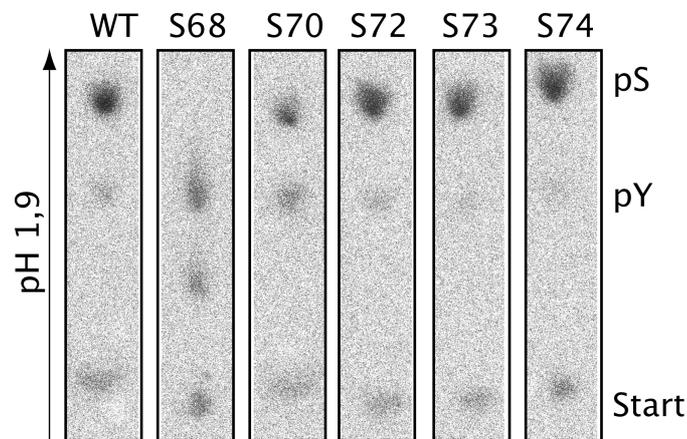


Abbildung 10.22.: ID PASA des zweiten Alanin-Scans.

Es wurden alle Serine des Serinclusters der PTB zu Alanin substituiert. Immer ein Serin blieb von dieser Substitution unbeeinträchtigt. Es ist zu sehen, dass alle PTB-Varianten starke Serinphosphorylierung zeigen. In den Mutanten S73 und S74 konnte keine Tyrosinphosphorylierung mehr nachgewiesen werden.

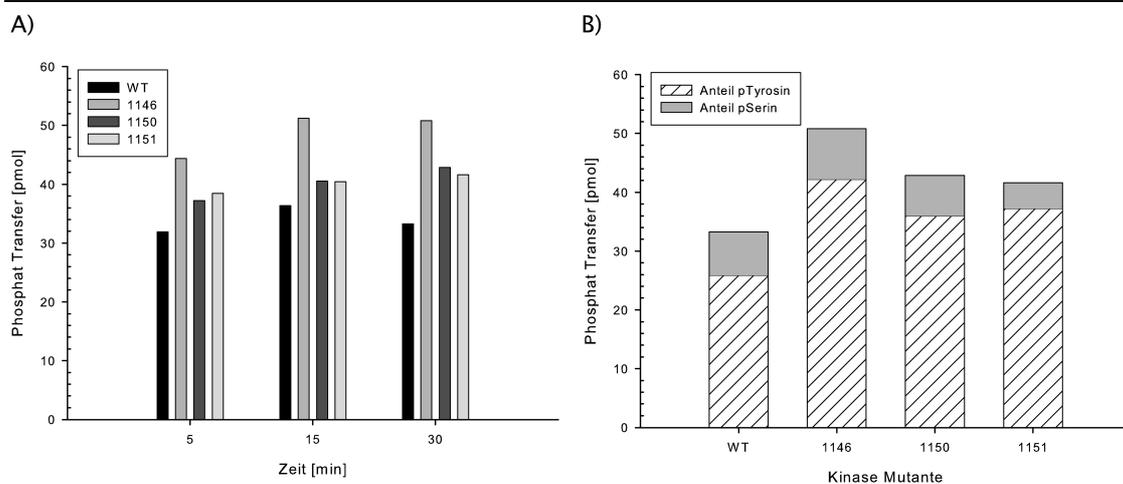


Abbildung 10.23.: A) Zeitabhängige Autophosphorylierung von verschiedenen Activation-Loop-Mutanten.

Die Kinasen unterscheiden sich kaum in ihrem Autophosphorylierungsverhalten. B) Anteil an Phosphotyrosin und Phosphoserin nach 30min in den jeweiligen Kinase Mutanten. Die Kinase Y1151F ist am geringsten an Serinresten phosphoryliert

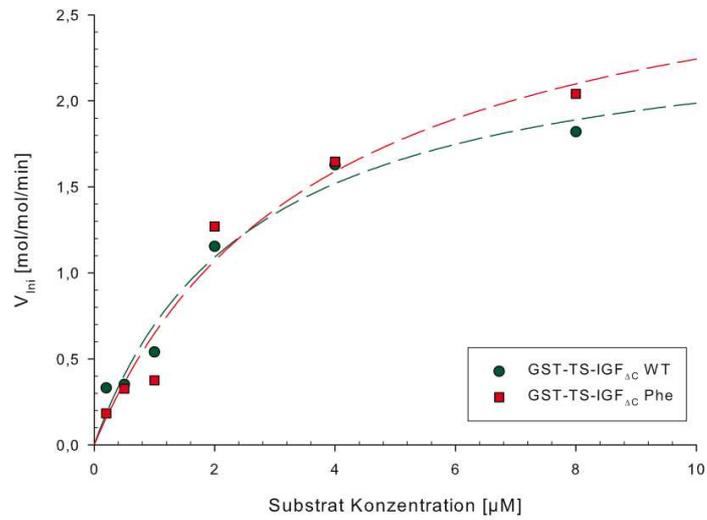


Abbildung 10.24.: Vergleich der Initialgeschwindigkeiten von GST-TS-IGF $_{\Delta C}$ (grün) und GST-TS-IGF $_{\Delta C}$ Phe (rot) für steigende Konzentrationen von GST-IGF $_{D \rightarrow A}$

Beide Kinasen phosphorylieren das Substrat bei allen gemessenen Konzentrationen in vergleichbarer Art und Weise. Maximal können 2 mol/mol/min übertragen werden

Erklärung

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

Köln, den 5. Oktober 2009

Teilpublikationen

Es liegen keine Teilpublikationen der vorliegenden Arbeit vor.

Kongresse und Seminarbeiträge

- **Bioriver Kongress Aachen, März 2005;**
Posterpräsentation: “What’s behind dual kinase activity?”
- **European Bioperspectives Kongress Wiesbaden, Mai 2005;**
Posterpräsentation: “Complexes determine kinase specificity!”
- **GBM-Tagung Berlin, September 2005;**
Posterpräsentation: “Complexes determine kinase specificity“
- **9. Treffen der Signal Transduction Society (STS) Weimar, November 2005;**
Posterpräsentation: “Complexes dermine kinase specificity”
- **European Bioperspectives Kongress Köln, Mai 2007;**
Posterpräsentation: “Insulin receptor - substrate interaction induces dual kinase

specificity”

- **DifE-Symposium *Genetics and Pathophysiology of Type 2 Diabetes*, Februar 2008;**

Posterpräsentation: “Basis of dual kinase activity: the PTB-Domain of IRS1 is highly Serin phosphorylated by the Insulin Receptor Tyrosin kinase”