

**Die Duale Aktivität des Insulinrezeptors:  
Mechanistische Untersuchungen an der rekombinanten  
Insulinrezeptorkinase**

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

vorgelegt von

**Norbert Tennagels**

aus Ratingen

1998

Berichterstatter: Prof. Dr. H.W. Klein  
Priv.-Doz. Dr. O. Martini

Tag der mündlichen Prüfung: 05.11.1998

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 1995 bis April 1998 am Institut für Biochemie an der Universität zu Köln unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H.W. Klein angefertigt.

## **Sonja und meinen Eltern**

**Verzeichnis der Abkürzungen**

µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
AcNPV	<i>Autographa californica</i> nuclear polyhedrosis virus
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
AMP	Ampicillin
AMP-PNP	Adenylyl-imidodiphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
Ci	Curie
cpm	counts per minute (Zählimpulse pro Minute)
d. h.	das heißt
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EC <sub>50</sub>	Konzentration mit halbmaximalem Effekt
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii
Faktor Xa	Restriktionsprotease Faktor Xa
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
g	Erdbeschleunigung (9.81 m x s <sup>-2</sup> )
Gab-1	Grb2-associated binder-1
GAB-CT	C-Terminus des Gab-1 Proteins (Aminosäure: 542-693) Mittlere Domäne des Gab-1 Proteins (Aminosäure 223-525)
GSH	reduziertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GST-CT	Fusionsprotein mit IR-C-Terminus
GST-CTphe	Fusionprotein mit IR-C-Terminus mit den Aminosäuresubstitutionen: Y1316F, Y1322F
GST-CTthr	Fusionprotein mit IR-C-Terminus mit den Aminosäuresubstitutionen: Y1316T, Y1322T
GST-Ex20	Fusionsprotein mit der vom Exon 20 kodierten Aminosäuresequenz
GST-JM	Fusionsprotein mit IR-Juxtamembrananteil
hIRS-1 p30	rekombinantes Fragment von hIRS-1
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IR	Insulinrezeptor
IRKD	Insulinrezeptorkinase-Domäne
IRKD-D1120A	Insulinrezeptorkinase-Domäne mit Aminosäuresubstitution: D1120A
IRKD-HIS	Insulinrezeptorkinase-Domäne mit N-terminaler Histidin-Affinitätsmarkierung
IRKD-K1018A	Insulinrezeptorkinase-Domäne mit Aminosäuresubstitution: K1018A
IRKD-Y1151F	Insulinrezeptorkinase-Domäne mit Aminosäuresubstitution: Y1151F
IRKD-Y1316/22F	Insulinrezeptorkinase-Domäne mit den Aminosäuresubstitutionen: Y1316F, Y1322F
IRKD-Y1316/22T	Insulinrezeptorkinase-Domäne mit den Aminosäuresubstitutionen: Y1316T, Y1322T
IRKD-Y960/1316/22T	Insulinrezeptorkinase-Domäne mit den Aminosäuresubstitutionen: Y960F, Y1316T, Y1322T
IRS-I bzw. IRS2/IRS 3	Insulinrezeptor-Substrat I bzw. 2/3

---

kBp	Kilobasenpaar
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
M	mol/l, Molar
MAD2	mitotic arrest deficient protein
MapK	map-kinase
MapKK bzw. Mek	map kinase kinase
min	Minute
ml	Milliliter
Mr	relatives Molekulargewicht
n. B.	nicht bestimmt
PCR	Polymerase chain reaction
PH-Domänen	pleckstrin-homologe-Domänen
Pi	anorganisches Phosphat
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylchlorid
pS bzw. Ser-P	Phosphoserin
PTB-Domänen	Phosphotyrosin bindene Domänen
PTPase	Proteintyrosinphosphatase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
pY bzw. Tyr-P	Phosphotyrosin
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Gel	SDS-Polyacrylamidgel
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
sec.	Sekunde
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SH2- bzw. SH3-Domäne	src-homologe Domäne 2 bzw. 3
Shc	src homology 2 (-collagen related)-Protein
SHPTP2 bzw. Syp	Src homology-protein tyrosin phosphatase 2
Sos	Son of sevenless-Protein
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
Tricin	N-Tris[hydroxymethyl]methylglycin
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
Triton <sup>®</sup> X-100	PEG-(9.6)-p-t-octylphenylether
ÜNK	Übernachtkultur
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b><i>Zusammenfassung</i></b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b><i>Einleitung</i></b>	<b>6</b>
2.1	Die Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen	6
2.2	Insulin, Metabolismus und Glukose Homöostase	7
2.3	Biosynthese und Struktur des Insulinrezeptors	8
2.4	Der Mechanismus der Kinaseaktivierung	10
2.5	Die Serin- und Threoninphosphorylierung der Insulinrezeptorkinase	14
2.6	Signalwege des Insulinrezeptors	19
2.7	Die Termination des Insulinrezeptor-Signals	22
2.8	Die lösliche Insulinrezeptorkinase als Modellenzym	24
2.9	Fragestellung der Arbeit	26
<b>3</b>	<b><i>Konstruktion, Expression und Reinigung der Insulinrezeptorkinase-Domäne</i></b>	<b>27</b>
3.1	Das Baculovirus-Expressionssystem	27
3.2	Konstruktion des Transfervektors pVL-IRKD	27
3.3	Herstellung und Isolierung rekombinanter Baculoviren	28
3.4	Zeitverlauf der Proteinexpression der löslichen Insulinrezeptorkinase	28
3.5	Reinigung der löslichen Insulinrezeptorkinase IRKD	29
3.6	Konstruktion, Expression und Reinigung abgewandelter Kinasekonstrukte	31
3.6.1	Konstruktion der Transfervektoren pVL-IRKD-K1018A, pVL-IRKD-Y1316/22F, pVL-IRKD-Y1316/22T	31
3.6.2	Expression und Reinigung der Kinasekonstrukte IRKD-K1018A, IRKD-Y1316/22F und IRKD-Y1316/22T	32
<b>4</b>	<b><i>Charakterisierung der gereinigten IRKD</i></b>	<b>34</b>
4.1	Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes und des Phosphorylierungsstatus des Enzyms	34
4.2	Bedingungen für die Autophosphorylierungsreaktion der IRKD	36
4.2.1	Ionenabhängigkeit der Autophosphorylierungsreaktion	36
4.2.2	ATP-Abhängigkeit der Autophosphorylierungsreaktion	37
4.2.3	Aktivierung der Autophosphorylierung durch Poly(Lysin) und Histon 2b	38
4.2.4	Konzentrationsabhängigkeit der Autophosphorylierung	39
4.2.5	pH- und Temperaturoptimum der Autophosphorylierung	41
<b>5</b>	<b><i>Die Duale Aktivität der Insulinrezeptorkinase</i></b>	<b>42</b>
5.1	Methoden zum Nachweis von Phosphoaminosäuren	42
5.2	Die Duale Aktivität der Insulinrezeptorkinase in der Autophosphorylierung	43
5.2.1	Abhängigkeit der IRKD-Serinphosphorylierung von den Reaktionsbedingungen	45
5.3	Zeitverlauf der Autophosphorylierung	48
5.4	Identifizierung der Autophosphorylierungsstellen der Insulinrezeptorkinase	50
5.4.1	Die Methode der Phosphopeptidkartierung	50
5.4.2	Vergleich der Autophosphorylierungsstellen der IRKD, IRKD-Y1316/22F, IRKD-Y1316/22T und IRKD-Y960/1316/22F	51
5.4.3	Einfluß der Poly(Lysin)-Stimulierung auf die Verteilung der Phosphate in der IRKD	53
5.4.4	Identifizierung der Serinphosphorylierungsstellen des humanen Insulinrezeptors <i>in situ</i>	55
5.4.5	Die Serinphosphorylierung der IRKD-K1018A	59

<b>6</b>	<b><i>Die Duale Kinaseaktivität der IRKD in der Substratphosphorylierung</i></b>	<b>64</b>
6.1	Konstruktion, Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen	64
6.1.1	Das Gluthation-S-Transferase-Expressionssystem in <i>E. coli</i>	64
6.1.2	Konstruktion, Expression und Reinigung der GST-Fusionsproteine GST-JM, GST-Ex20, GST-CT, GST-CTphe und GST-CTthr	64
6.1.3	Expression und Reinigung der Fusionsproteine	65
6.2	Kinetische Konstanten der Substratphosphorylierung	66
6.3	Einfluß von Substraten auf die Autophosphorylierung der IRKD	68
6.4	Die Serinphosphorylierung exogener Substrate	71
6.4.1	Die Serinphosphorylierung des C-terminalen Fusionsproteins GST-CT	71
6.4.2	Die Serinphosphorylierung des C-terminalen Fusionsproteins GST-CTphe	75
6.4.3	Die Serinphosphorylierung des hIRS-1 p30	79
6.4.4	Die Serinphosphorylierung von Gab-1.	81
6.4.5	Die Substratphosphorylierung synthetischer Peptide	84
<b>7</b>	<b><i>Die Transiente Phosphorylierung der IRKD</i></b>	<b>86</b>
7.1	Untersuchungen zum ATP-Umsatz der Phosphotransferasereaktion	86
7.2	Die transiente Phosphorylierung der IRKD	87
7.2.1	Die Chase-Reaktion mit der IRKD	87
7.2.2	Zeitverlauf der transienten Phosphorylierung der IRKD	91
7.2.2.1	Identifizierung der transienten Phosphorylierungsstellen in der IRKD	94
7.2.3	Die transiente Phosphorylierung der IRKD-Y1316/22F und IRKD-Y1316/22T	96
7.2.4	Die transiente Phosphorylierung der IRKD-K1018A	98
7.3	Substratphosphorylierungen unter Pulse-Chase-Bedingungen	102
7.3.1	Phosphorylierung der GST-Fusionproteine GST-CT, GST-Ex20 und GST-JM unter Pulse-Chase-Bedingungen	102
7.3.2	Phosphorylierung des hIRS-1 p30 unter Pulse-Chase-Bedingungen	104
7.3.3	Die transiente Phosphorylierung in Gegenwart des vorphosphorylierten hIRS-1 p30	107
<b>8</b>	<b><i>Diskussion</i></b>	<b>113</b>
8.1	Expression und Reinigung der IRKD	113
8.2	Die enzymatischen Eigenschaften der löslichen Insulinrezeptorkinase	114
8.2.1	Allgemeine Charakterisierung der löslichen Insulinrezeptorkinase	114
8.2.2	Die Autophosphorylierungsreaktion	117
8.2.3	Die Substratphosphorylierung	119
8.2.4	Die transiente Phosphorylierung	123
8.3	Die duale Aktivität der löslichen Insulinrezeptorkinase	129
8.3.1	Allgemeine Charakterisierung der Serinphosphorylierung	129
8.3.2	Mechanistische Aspekte zur dualen Aktivität der Insulinrezeptorkinase	132
8.3.3	Mögliche Bedeutung der Serinphosphorylierung	137
<b>9</b>	<b><i>Methoden</i></b>	<b>140</b>
9.1	Molekularbiologische Methoden	140
9.1.1	Konstruktion der Transfervektoren pVL-IRKD-Y1316/22F und pVL-IRKD-Y1316/22T	140
9.1.2	Konstruktion der <i>E. coli</i> -Expressionsvektoren pGST-CTphe und pGST-CTthr	141
9.2	Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen aus <i>E. coli</i>	141
9.2.1	Proteolytische Spaltung der GST-Fusionsproteine und Reinigung der Peptide	142
9.3	Expression und Reinigung der löslichen Insulinrezeptorkinase IRKD und ihrer Varianten	142
9.3.1	Expression im Baculovirus-Expressionssystem	142

---

9.3.1.1	Zellkultur	142
9.3.1.2	Infektion, Proteinexpression und Ernte von Sf9-Zellen	143
9.3.2	Reinigung der löslichen Insulinrezeptorkinase	143
9.3.2.1	FPLC-Anionenaustauschchromatographie	143
9.3.2.2	FPLC-Hydrophobe Interaktionschromatographie mit Phenylsepharose	144
9.3.2.3	Reinigung durch FPLC-Gelfiltration mit Superose 12	144
9.4	Protein-Biochemische Methoden	145
9.4.1	Transfer und immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membran	145
9.4.2	Proteinbestimmung	146
9.4.3	Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes durch Gelfiltration	146
9.5	Phosphorylierungsreaktionen	146
9.6	Bestimmung des Phosphateinbaus	147
9.7	Phosphoaminosäure- und Nukleotidanalyse	147
9.7.1	Tryptische Spaltung von Proteinen im SDS-Gel	147
9.7.2	Phosphoaminosäureanalysen	147
9.7.3	Nukleotidanalyse	148
9.8	HPLC-Analyse tryptischer Peptide der Insulinrezeptorkinase	148
9.9	Reinigung phosphorylierter Proteine von nicht umgesetzttem radioaktiv markiertem ATP	149
9.10	Reinigung des in-situ radioaktiv markierten humanen Insulinrezeptors	150
9.10.1	Zellkultur	150
9.10.2	„In situ labeling“ und Ernte der Zellen	150
9.10.3	Immunpräzipitation	150
9.11	Computeranalyse	151
<b>10</b>	<b><i>Material</i></b>	<b>152</b>
10.1	Chemikalien	152
10.2	Radiochemikalien	153
10.3	Antikörper und Enzyme	153
10.4	Nukleinsäuren	154
10.4.1	Plasmidvektoren	154
10.4.2	Oligonukleotide	154
10.5	Chromatographie	154
10.6	Bakterien, Zell-Linien, Viren, Kulturmedien und -zusätze	155
10.7	Molekulargewicht-/Längenstandards	155
10.8	Kit-Systeme	155
10.9	Verbrauchsmaterial	155
10.10	Laboraausstattung	156
<b>11</b>	<b><i>Literatur</i></b>	<b>158</b>
<b>12</b>	<b><i>Anhang</i></b>	<b>168</b>
12.1	Experimentelle Daten zu Kapitel 4: Charakterisierung der gereinigten IRKD	168
12.2	Experimentelle Daten zu Kapitel 5: Die Duale Aktivität der Insulinrezeptorkinase in der Autophosphorylierung	170
12.3	Experimentelle Daten zu Kapitel 6: Die duale Aktivität der IRKD in der Substratphosphorylierung	174
12.4	Experimentelle Daten zu Kapitel 7: Die transiente Phosphorylierung der IRKD	180

## 1 Zusammenfassung

- Eine lösliche Insulinrezeptorkinase (IRKD, 45,7 kDa, Arg<sup>941</sup>-Ser<sup>1343</sup>) und verschiedene, durch ortsspezifische Mutagenese veränderte Varianten (IRKD-K1018A, IRKD-Y1316/22F, IRKD-Y1316/22T, IRKD-Y960/1316/22F) wurden kloniert und im Baculovirus-Expressionssystem exprimiert: Die Enzyme können durch sequentielle Anionenaustausch-, hydrophobe Interaktions- und Gelfiltrationschromatographie zur Homogenität gereinigt werden. Die Ausbeuten an gereinigtem Protein aus 100 ml Zellsuspension ( $10^8$  Zellen) sind für alle Konstrukte vergleichbar und betragen 0,25-0,5 mg Protein.
- Der Einfluß der Reaktionsbedingungen auf die enzymatischen Eigenschaften der gereinigten IRKD wurde untersucht: Das Enzym zeigt seine maximale Aktivität bei 5 mM MgCl<sub>2</sub> und 5 mM MnCl<sub>2</sub>, einem pH-Wert von 7,5 und einer Temperatur von 20 °C. Die kinetischen Konstanten  $K_m$  und  $V_{max}$  für ATP werden mit 135  $\mu$ M und 230 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> bestimmt. Der Phosphateinbau ist unabhängig von der Enzymkonzentration, kann aber durch die Anwesenheit von Polykationen um den Faktor zwei gesteigert werden.
- Die Substratphosphorylierungsreaktion wurde charakterisiert: Die höchsten katalytischen Effizienzen zeigen die aus dem Insulinrezeptor und seinen Signalproteinen (IRS-1, Gab-1) abgeleiteten rekombinanten Fragmente. Der Austausch der beiden C-terminalen Tyrosinphosphorylierungsstellen gegen Phenylalanin bewirkt eine Erhöhung der  $V_{max}$ -Werte in der Substratphosphorylierungsreaktion. Die Anwesenheit exogener Substrate führt zu einer Inhibition der IRKD-Autophosphorylierung. Die halbmaximale Hemmung tritt bei Substratkonzentrationen um die jeweiligen  $K_m$ -Werte ein.
- Die duale Aktivität der Autophosphorylierung der löslichen Insulinrezeptorkinasen wurde untersucht: Die Autophosphorylierung führt zur Phosphatinkorporation in Tyrosin- und Serinreste. Die beobachtete Serinphosphorylierung ist abhängig von der Kinaseaktivität und der Tyrosinphosphorylierung zeitlich nachgeschaltet. Sie besitzt die gleiche Stöchiometrie wie die Serinphosphorylierung des aus Humanplazenta gereinigten Insulinrezeptors. Weder der Austausch der Tyrosinreste in der Juxtamembran- noch in der C-terminalen Domäne bewirkt eine Änderung in der Kinetik der Reaktion. Die beobachtete Serinphosphorylierung ist auf die Phosphorylierung der beiden im C-Terminus lokalisierten Serinreste Ser<sup>1275</sup> und Ser<sup>1309</sup> zurückzuführen. Ihre Besetzung ist in dem aus Humanplazenta gereinigten Insulinrezeptor nach Autophosphorylierung *in vitro* nachweisbar. In Zusammenarbeit mit Dr. Maassen (Leiden, NL) ergeben „*in situ-labeling*“-Experimente den Hinweis, daß die beobachtete Serinautophosphorylierung auch in intakten Zellen stattfinden kann.
- Die duale Aktivität der Autophosphorylierung wurde auf die Substratphosphorylierungsreaktion übertragen: Die IRKD katalysiert die Tyrosin- und Serinphosphorylierung in der kinaseinaktiven IRKD-K1018A, in einem aus dem C-Terminus des Insulinrezeptors abgeleiteten GST-Fusionsprotein und in rekombinanten Fragmenten aus IRS-1 und Gab-1. Dabei ist die Effizienz der Serinphosphorylierung abhängig von der Substratkonzentration. Die Substitution der Tyrosinphosphorylierungsstellen des C-terminalen Fusionproteins gegen Phenylalanin führt noch zur Phosphorylierung der in diesem Substrat enthaltenen Serinphosphorylierungsstellen und zeigt in Bezug auf die Serinphosphorylierung dieselben kinetischen Konstanten wie das unveränderte GST-Fusionsprotein.

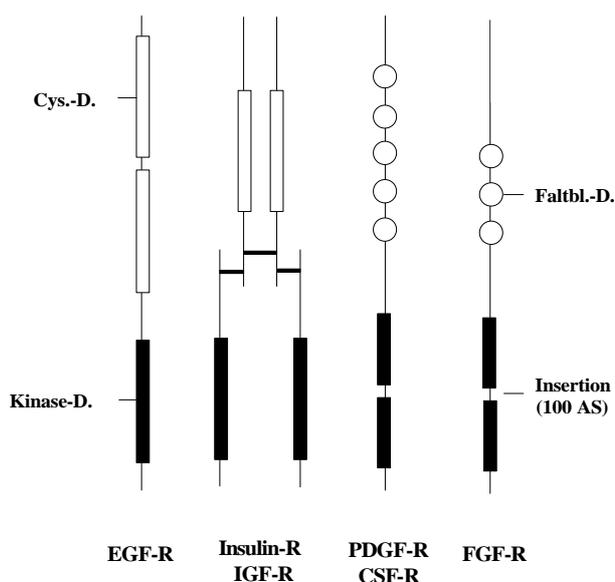
- Die Kinetik der Autophosphorylierung der IRKD wurde charakterisiert: Während der Reaktion ist ein ständiger ATP-Umsatz erkennbar. Dieser ist abhängig von der Kinaseaktivität und besitzt einen biphasischen Verlauf. In der initialen Phase ist der Phosphotransfer auf das Enzym und die gebildete ADP-Menge äquimolar, im weiteren Verlauf der Reaktion zeigt der Phosphateinbau in das Enzym eine Sättigung, die Bildung von ADP hält weiter an.
- Die Autophosphorylierung der löslichen Kinasen wurde unter Pulse-Chase Bedingungen untersucht: Die IRKD unterliegt einer transienten Phosphorylierung an Tyrosinresten der C-terminalen Domäne und der katalytischen Domäne. Dies ist ein Resultat einer intrinsischen Phosphataseaktivität des Enzyms und nicht auf eine Dephosphorylierung durch exogene Phosphatasen zurückzuführen. Die Reaktion wird durch Kinaseinhibitoren oder hohe Substratkonzentrationen gehemmt und ist abhängig von der Anwesenheit von ATP. Pulse-Chase-Experimente in Anwesenheit stöchiometrischer Substratmengen erweitern die Beobachtung transients Tyrosinphosphorylierung auch auf Substrate.

## 2 Einleitung

### 2.1 Die Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen

In allen vielzelligen Organismen wird durch ein kompliziertes Kommunikationssystem gewährleistet, daß Wachstum, Differenzierung und Stoffwechsel einer großen Zahl von Zellen in den verschiedenen Organen und Geweben aufeinander abgestimmt sind. Die Kommunikation tierischer Zellen ist nicht nur auf den direkten Zell-Zell-Kontakt beschränkt (Bennet et al. 1985), sondern erfolgt auch über größere Entfernungen. Bestimmte Zellen bilden und sezernieren Signalmoleküle, die über das Kreislaufsystem zu entfernten Erfolgsorten gelangen (humorale Kontrolle). Dabei werden primär zwei Klassen von Signalmolekülen unterschieden. Die lipidlöslichen Hormone (Steroide und Thyroxine) diffundieren durch die Plasmamembran und werden von bestimmten Proteinen gebunden, die im Cytosol oder im Zellkern als Hormonrezeptoren fungieren. Der gebildete Hormon-Rezeptor-Komplex ist in der Lage, über Wechselwirkungen mit spezifischen Promotorsequenzen die Transkription bestimmter Gene zu induzieren oder zu reprimieren (Gronemeyer 1992). Die zweite Hormongruppe umfaßt Peptidhormone und nicht lipophile Hormone (Katecholamine), die die Plasmamembran nicht durch Diffusion passieren können. Ihre Wirkung wird durch membranintegrale Rezeptoren vermittelt, die eine hochaffine extrazelluläre Hormonbindungsstelle, einen lipophilen Transmembranbereich und eine intrazelluläre "Effektor-Domäne" besitzen (Pawson 1993).

Eine wichtige Gruppe dieser Transmembranrezeptoren sind die sogenannten Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK), die auf der extrazellulären Seite große, glykolysierte Ligandenbindungsdomänen und intrazellulär eine Tyrosinkinasedomäne besitzen. Im allgemeinen kontrollieren sie Wachstums- und Differenzierungsprozesse (Yarden et al. 1988). Die Ligandenbindung bewirkt die Aktivierung der Tyrosinkinase und führt zur Autophosphorylierung des Rezeptors und zur Phosphorylierung exogener Substrate. Infolge dieser Aktivierung kommt es dann zu Interaktionen zwischen dem Rezeptor und einer Vielzahl von Signalproteinen, die in einem komplexen Netzwerk letztendlich Zellwachstum und Zelldifferenzierung regulieren. Durch strukturelle Homologien ihrer extrazellulären Domäne lassen sich die bisher rund 50 bekannten Rezeptor-Tyrosinkinasen in vier Klassen einteilen (Lemmon und Schlessinger 1994, Abb. 2.1); werden strukturelle Motive der intrazellulären katalytischen Domäne berücksichtigt, können acht Subfamilien unterschieden werden (Hanks und Quinn 1991).



**Abb 2.1: Schematische Übersicht über die Tyrosinkinaserezeptor-Familie.** Cys.-D.: Cysteinereiche Domäne; Faltbl.-D.: β-Faltblattreiche Domäne; Kinase-D.: Kinase-Domäne (nach Ullrich und Schlessinger 1990)

Rezeptoren der Klasse I (*Epidermal Growth Factor*-Rezeptor, EGF-R) und II (Insulin-Rezeptor, IR, *Insulin Like Growth Factor*-Rezeptor, IGF-R, *Insulin Related Receptor*, IRR) enthalten extrazellulär zwei homologe cysteinreiche Domänen, Rezeptoren der Klasse III (*Platelet Derived Growth Factor*-Rezeptor, PDGF-R, *Colony Stimulating Factor*-Rezeptor, CSF-R) und IV (*Fibroblast Growth Factor*-Rezeptor, FGF-R) enthalten fünf bzw. drei  $\beta$ -faltblattreiche, immunglobulinähnliche Domänen (Ullrich und Schlessinger 1990). Die extrazellulären Domänen sind für die Bindung des Wachstumsfaktors verantwortlich, scheinen aber auch einen Anteil an der für die Rezeptoraktivierung wichtigen Dimerisierung zu haben. Mit Ausnahme der Rezeptoren der Klasse II, die durch den Insulinrezeptor oder den Insulin-Like-Growth-Faktor Rezeptor repräsentiert werden, sind alle RTKs monomere Polypeptidketten, die die Plasmamembran mit einer hydrophoben  $\alpha$ -Helix durchspannen. Der intrazelluläre Bereich kann in einen Juxtamembran-Bereich, eine katalytischen Domäne und einen C-terminalen Bereich eingeteilt werden. Bei Vergleich der Aminosäuresequenzen ergibt sich in der 200-300 Aminosäuren umfassenden Kinasedomäne die größte Homologie der RTK, die in 11 Subdomänen eingeteilt werden kann. Dabei finden sich 14 Aminosäurereste, die in allen bisher untersuchten RTKs konserviert zu sein scheinen (Hanks et al. 1991). Subdomäne I und II beinhalten die ATP-Bindungsstelle, die durch die Konsensus-Sequenz Gly-x-Gly-xx-Gly-x<sub>(15-20)</sub>-Lys repräsentiert wird. Der Austausch der Aminosäure Lysin gegen eine andere Aminosäure verhindert beispielsweise beim Insulinrezeptor die ATP-Bindung und führt zur Inaktivierung der Kinase und zu einem Verlust der biologischen Aktivität (Chou et al. 1987; Ebina et al. 1987; McClain et al. 1987, Tennagels 1995, Al-Hasani et al. 1997). Eine weitere invariante Aminosäure stellt eine Glutaminsäure in Subdomäne III dar, die wahrscheinlich an der Koordination der  $\gamma$ -Phosphorylgruppe des ATP beteiligt ist. Der nächste hochkonservierter Bereich findet sich in Subdomäne VIb und stellt den sogenannten katalytischen Loop der Kinase dar (Aminosäureabfolge: HRDLAARN). Dabei wird dem Aspartat-Rest die Funktion der katalytischen Base zugesprochen, die Sequenz LAARN dient der Substraterkennung und Bindung. Der Aspartatrest im DFG-Motiv in der Subdomäne VII ist, wie die Glutaminsäure (Subdomäne III), an der Chelation der zweiwertigen Metallkationen beteiligt. Die gesamte Subdomäne wird auch als Aktivierungs-“Loop“ bezeichnet. Sowohl bei Serin/Threoninkinasen als auch Tyrosinkinasen finden sich hier Phosphorylierungsstellen, die nach einer Besetzung zu einer Erhöhung der katalytischen Aktivität der Enzyme führen. Dem Aktivierungs-“Loop“ folgt der sogenannte P+1-“Loop“, der an der Substratbindung und -erkennung beteiligt ist. Daneben wird in dieser auch als Subdomäne VIII bezeichneten Region ein Glutaminsäurerest gefunden, der zusammen mit den hochkonservierten Aminosäuren Asparaginsäure in Subdomäne IX und Arginin in Subdomäne XI durch elektrostatische Wechselwirkungen den katalytischen Loop stabilisiert. Interessanterweise sind, mit Ausnahme der Sequenz des katalytischen Loops, alle beschriebenen Aminosäurereste auch in der Familie der Protein-Serin/Threonin-Kinasen vorhanden und hochkonserviert. In einem späteren Kapitel wird basierend auf den bisher vorliegenden Röntgenstruktur-Analysen noch einmal genauer auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen Tyrosin- und Serin-/Threoninkinasen eingegangen (Kap. 2.6). Dem Juxtamembranbereich und der C-terminalen Domäne kommen regulatorische Funktionen zu. So können sie Tyrosinphosphorylierungsstellen beinhalten, die SH2-Domänen enthaltenden Proteinen als Bindungsstelle dienen, oder Motive vorhanden sein, die an der Kinaseaktivierung beteiligt sind. Allen Rezeptorklassen ist gemeinsam, daß die Bindung des Liganden zur Autophosphorylierung der verschiedenen Tyrosinreste führt. Infolge kommt es zur Aktivierung der Kinase und zur Phosphorylierung von zellulären Substraten oder zur Ausbildung von Signalkomplexen mit anderen Molekülen, die letztendlich zu mitogenen oder metabolischen Effekten in den Zielzellen führen.

## 2.2 *Insulin, Metabolismus und Glukose Homöostase*

Das Peptidhormon Insulin ist ein wichtiger Regulator einer Vielzahl von Stoffwechselprozessen im Organismus von Vertebraten und Invertebraten (LeRoith et al. 1981). Im Menschen wird das Hormon ausschließlich von den B-Zellen der Langerhans'schen Inseln im Pankreas hergestellt (Zawalich und Rasmussen 1990, Froesch und Schoenle 1994) und bei steigenden Blutglukose-Konzentrationen in den Blutstrom des Organismus freigesetzt. Beim Menschen führen Blut-Glukosekonzentrationen

> 7,5 mM zur Sekretion von Insulin. Dabei wird die initiale Aufnahme von Glukose in die B-Zellen und ihre Umwandlung in Glukose-6-Phosphat als sensorisches Signal für die Hormonfreisetzung verstanden (Matschinsky 1990). Über den Blutstrom gelangt es zu seinen primären Wirkorten, dem Fett-, Muskel- und Lebergewebe, entfaltet seine physiologischen Wirkungen aber auch in anderen Geweben. So stimuliert es die Aufnahme von Hexosen, Ionen und Aminosäuren (Myers und White 1996), reguliert viele Schlüsselenzyme des Glukose-Stoffwechsels (Hubbard und Cohen 1993), kontrolliert die Proteinexpression auf der Ebene der Translation und Transkription (O'Brien und Granner 1991) und führt zur Induktion von Zellwachstum (Straus et al. 1984). Durch Stimulierung der Glukose-Aufnahme in die Skelettmuskulatur, dem Leber- und Fettgewebe und verstärkter Glykolyse und Glykogensynthese sowie Suppression von Glykoneogenese und Glykogenabbau sorgt es dafür, daß die Blut-Glukose-Konzentration im Menschen auf 4,4 - 6,6 mM konstant gehalten wird. Die physiologischen Effekte von Insulin werden auf zellulärer Ebene durch die Bindung des Hormons an seinen Rezeptor eingeleitet. Der Insulinrezeptor ist ein komplexes integrales Membranglykoprotein mit unterschiedlichen funktionellen Domänen und auf Zellen nahezu aller Gewebetypen vorhanden (Ginsberg 1977). Störungen in der Insulin-Signalkette manifestieren sich in der Stoffwechselkrankheit Diabetes mellitus. Grundlage ist hier entweder die Störung der Insulinsynthese (Insulin dependent diabetes melitus, IDDM) oder ein Fehler in der Rezeptor vermittelten Signalweiterleitung (non-Insulin dependent diabetes mellitus, NIDDM). Beide Formen sind durch stark erhöhte Blutglukosespiegel charakterisiert und führen bei Nichtbehandlung langfristig zu Retinopathie, Nephropathie, Neuropathie und Gefäßerkrankungen. Speziell die Mechanismen, die pathogenetisch zur NIDDM führen, sind außerordentlich vielseitig und bis auf wenige Ausnahmen noch nicht definiert. Die Ursache liegt in dem noch immer nicht vollständig aufgeklärtem Signalnetzwerk, welches für die spezifische Weiterleitung des Insulinsignal in der Zelle verantwortlich ist. Ein Verständnis der Krankheit ist daher unbedingt abhängig von den molekularen und biochemischen Mechanismen, die dieser durch den Insulinrezeptor vermittelten Signaltransduktion zu Grunde liegen.

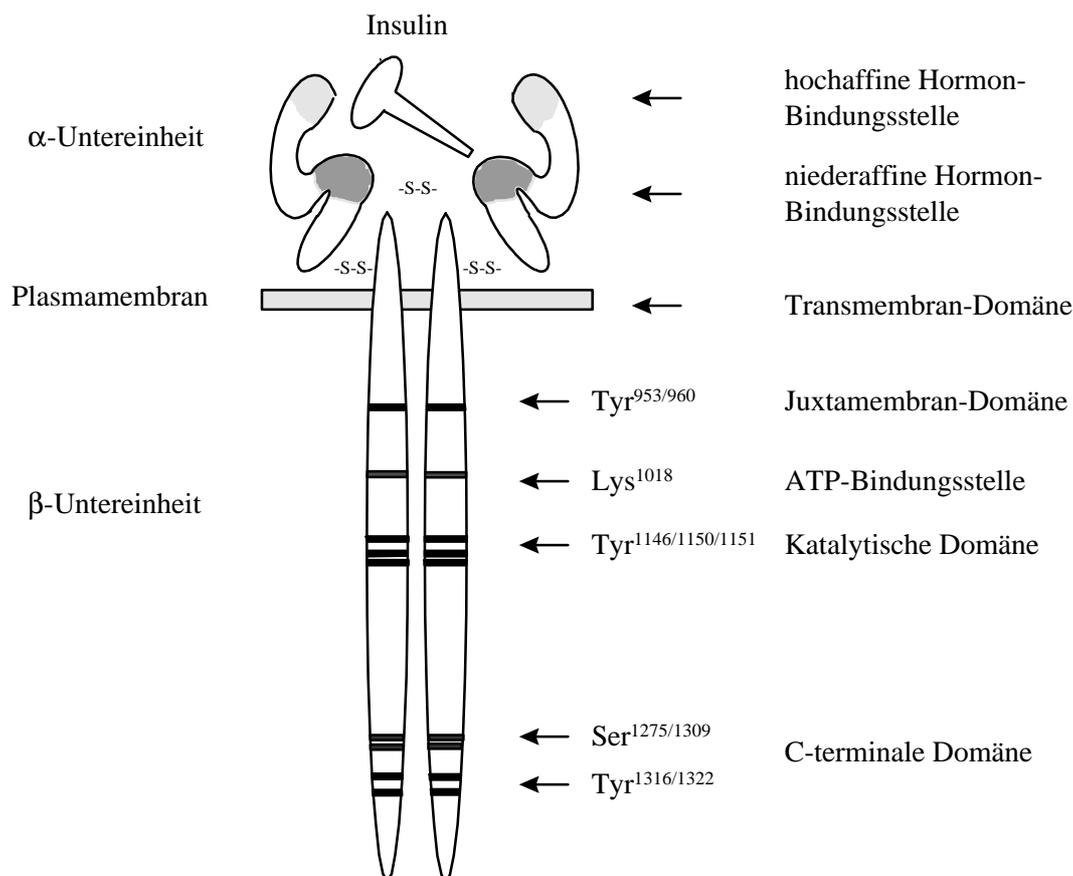
### 2.3 *Biosynthese und Struktur des Insulinrezeptors*

Der humanen Insulinrezeptors wurde erstmals von Cuatrecasas (1972) durch Insulin-Affinitätschromatographie aus Plazentagewebe gereinigt. Die Sequenzierung tryptischer Peptide des gereinigten Moleküls und daraus abgeleitete Nukleotidsonden ermöglichte 13 Jahre später zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander die Klonierung der korrespondierenden cDNA (Ullrich et al. 1985, Ebina et al. 1985).

Der Insulinrezeptor ist das Produkt eines Gens, das auf dem kurzen Arm des Chromosoms 19 (19p7) lokalisiert ist (Yang-Feng et al. 1985). Es umfaßt etwa 150 kBp und enthält 22 Exons und 21 Introns (Seino et al. 1989, Seino et al. 1990). Nach der Transkription können durch alternatives Spleißen des Exons 11 zwei mRNA-Formen entstehen. Sie kodieren für zwei einzelsträngige Präprorezeptormoleküle (hIR-A und hIR-B), die sich in ihrer Länge um 12 Aminosäuren in der Nähe des C-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheit unterscheiden (Seino und Bell 1989). Die physiologische Bedeutung der beiden Isoformen für den Organismus ist nicht vollständig geklärt. Allerdings scheinen Unterschiede in der Insulinaffinität und der Endocytose zu bestehen (Mosthaf et al. 1990, 1991; Vogt et al. 1991; Bennecke et al. 1992, Yamaguchi et al. 1992). Die Isoform hIR-A wird hauptsächlich in der Leber gefunden, während im Muskel und in Leukozyten die Isoform hIR-B überwiegt (Bennecke et al. 1992). Nach der Translation im rauhen endoplasmatischen Reticulum und umfangreichen posttranslationalen Prozessierungen im Golgi-Apparat entsteht aus zwei Vorläufermolekülen der glykosylierte, in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit gespaltene und durch Disulfidbrücken verbundene funktionelle Insulinrezeptor, der die Plasmamembran durchspannt (Olefsky 1990).

Der native Insulinrezeptor ist ein Homodimer, dessen Monomere sich ihrerseits aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit zusammensetzen. Das apparente Molekulargewicht des Holorezeptors in der SDS-PAGE wird mit 350-400 kDa angegeben, das Molekulargewicht der  $\alpha$ -Untereinheit beträgt ca. 130 kDa, die der  $\beta$ -Untereinheit ca. 90 kDa (Ullrich et al. 1985). Der Komplex wird durch zwei Klassen von Disulfidbrücken stabilisiert. Disulfidbrücken der Klasse I sind Reduktionsmitteln gut zugänglich und verbinden die beiden  $\alpha$ -Untereinheiten; Cystinbrücken der Klasse II können nur unter denaturie-

renden Reaktionsbedingungen getrennt werden und verbinden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit eines Monomers miteinander (Massague et al. 1982, Böni-Schnetzler et al. 1986, Sweet et al. 1987). Durch Markierung mit N-Ethylmaleinimid und ortsspezifische Mutagenese konnten die beiden Cysteinreste Cys<sup>524</sup> und Cys<sup>682</sup> als die verantwortlichen Klasse I Cysteine identifiziert werden (Lu und Guidotti 1996). Die Anzahl und die Position der Cysteine, die für die Klasse II Bindung verantwortlich sind, sind noch unbekannt, allerdings deuten Untersuchungen von Cheatham und Kahn (1992) auf eine Beteiligung des Cys<sup>647</sup> an der  $\alpha$ - $\beta$  Verbindung hin. Der Rezeptor läßt sich funktionell und morphologisch in drei Bereiche untergliedern. Der extrazelluläre Bereich übernimmt die Funktion der Insulinbindung und enthält die 723 Aminosäuren lange  $\alpha$ -Untereinheit und etwa ein Drittel der 620 Aminosäuren langen  $\beta$ -Untereinheit. Beide Domänen sind N- und O-glykosyliert. Diese Oligosaccharidstrukturen spielen wahrscheinlich eine Rolle für die korrekte Zielsteuerung, Prozessierung und Internalisierung des Rezeptors. Bei Mutanten mit fehlender N-Glykosylierung werden Störungen in der Signaltransduktion beobachtet (Collier et al. 1993; Leconte et al. 1994). Den Transmembrananteil bilden 23 Aminosäuren in Form einer  $\alpha$ -Helix, die den extrazellulären und den intrazellulären Anteil der  $\beta$ -Untereinheit miteinander verbindet. Der Austausch dieser Domäne gegen homologe Bereiche anderer Rezeptoren führt zu keinem Funktionsverlust. Die Untersuchung der Kinaseaktivität in rekonstituierten Membranvesikeln unterschiedlicher Lipidzusammensetzung und Mutageneseexperimente belegen dennoch die entscheidende Rolle dieses Bereiches für die Signalweiterleitung durch die Membran (Kahn 1993). Der cytoplasmatische Bereich der  $\beta$ -Untereinheit besteht aus 403 Aminosäuren und kann in die Juxtamembran-, die Tyrosinkinase- (katalytische) und die C-terminale Domäne unterteilt werden.



**Abb. 2.2: Schematische Organisation des humanen Insulinrezeptors** (verändert nach Kayatz 1993)

Dieselben strukturellen Eigenschaften finden sich auch bei anderen Rezeptoren. Wie der Insulinrezeptor stellen der Insulin-Like-Growth-Faktor Rezeptor I (IGF-1-R), der Insulin-related-Rezeptor (IRR), der Rous-sarcoma-related-Rezeptor (ROS-R) und der Leukozyten-Tyrosinkinase-Rezeptor (LTK-R) über Cystinbrücken verbundene homodimere Rezeptoren dar. Die einzelnen Moleküle zeigen in ihrer katalytischen Domäne weitestgehende Übereinstimmung, unterscheiden sich aber durch ihre jeweiligen extrazellulären Domänen und die C- bzw. N-terminalen Strukturen in der cytoplasmatischen Untereinheit. Diese Verschiedenartigkeit führt zum einen zu der Fähigkeit, andere Hormone zu binden, zum anderen zu Unterschieden in der Signalweiterleitung dieser Rezeptoren (Hunter und Lindberg 1994). Einen ähnlichen Aufbau weisen auch die IR-homologen Rezeptoren der Maus (Flores-Riveros et al. 1989) und der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (DosIR; Fernandez-Almonacid et al. 1987) auf. Allerdings zeigte erst kürzlich die Aufklärung der Genstruktur des DosIR, daß der native Rezeptor zusätzlich zu den zum humanen Insulinrezeptor vergleichbaren Bereichen eine 368 Aminosäure lange C-terminale Extension enthält, die hohe Homologien zum humanen Insulinrezeptorsubstrat I aufweist (Ruan et al. 1995, Fernandez et al. 1995). Müller et al. (1998) berichten von der Klonierung eines Insulin-bindenden Proteins aus *Saccharomyces cerevisiae*. Zusammen mit einem 70 kDa Protein formt dieses 53 kDa Protein große, 300 kDa umfassende Signalkomplexe. Insulinstimulierung bewirkt dabei die Phosphorylierung der kleinen Untereinheit an Serinresten, wohingegen die große Untereinheit ausschließlich Tyrosinphosphorylierung aufzuweisen scheint.

## 2.4 *Der Mechanismus der Kinaseaktivierung*

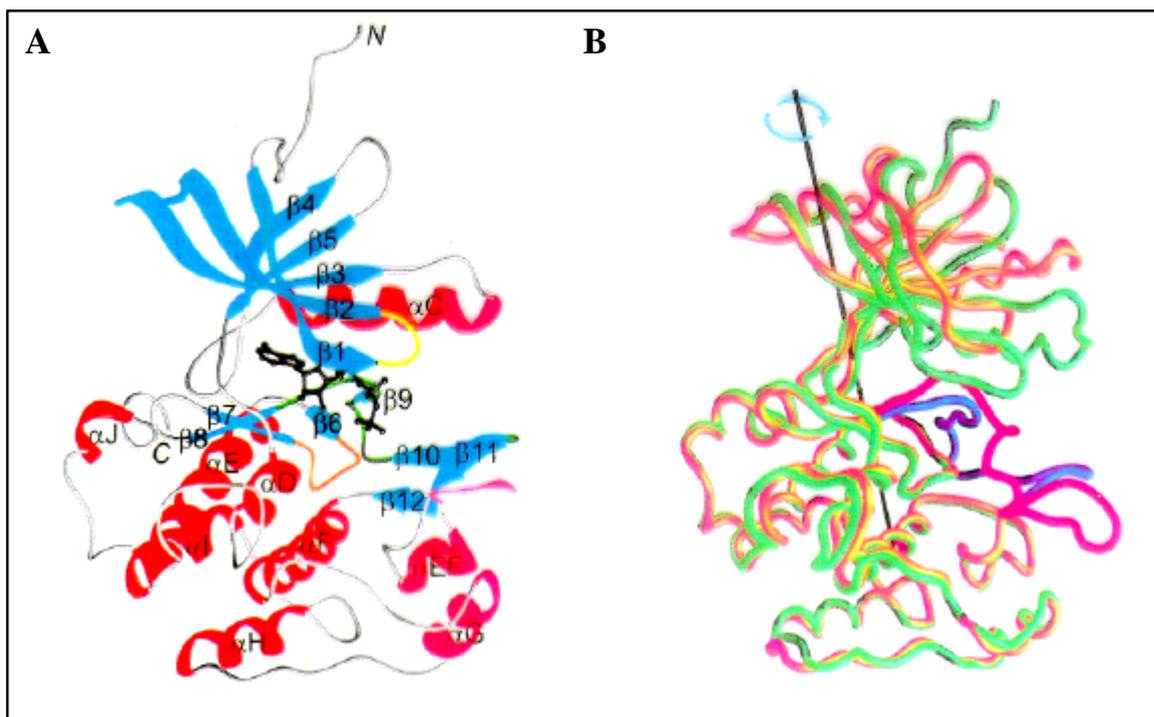
Der molekulare Mechanismus der Kinaseaktivierung ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, daß die Bindung des Hormons Insulin an die  $\alpha$ -Untereinheiten des Rezeptors eine Konformationsänderung bewirkt, die, über den Transmembrananteil vermittelt, zu der Aktivierung der Rezeptorkinase führt. In Abwesenheit von Insulin scheint der extrazelluläre Anteil einen inhibitorischen Effekt auf die Kinase auszuüben, da die Entfernung der Ligandenbindungsdomäne durch proteolytischen Verdau die Kinase aktiviert (Shoelson et al. 1988). Die lösliche Form der Insulinrezeptorkinase, die nur den cytoplasmatischen Teil der  $\beta$ -Untereinheit umfaßt, ist konstitutiv aktiv (Ellis et al. 1987, Herrera et al. 1988, Villalba et al. 1989). Ein generelles Prinzip für die Aktivierung monomerer Rezeptor-Tyrosinkinasen ist die durch Ligandenbindung induzierte Dimerisierung (Lemmon und Schlessinger 1994). Dimere Liganden, wie PDGF oder CSF-1, binden gleichzeitig an zwei Rezeptormonomere und induzieren dadurch die Vernetzung und Kinaseaktivierung. Der Mechanismus der Dimerisierung von monomeren Liganden, wie EGF oder FGF, ist noch nicht vollständig geklärt, es wird aber angenommen, daß die Bindung des Liganden zu einer Konformationsänderung führt, die dann in der Dimerisierung resultiert (Lemmon et al. 1997). Obwohl der Insulinrezeptor bereits als funktionelles Dimer vorliegt, scheint das Prinzip der Kreuzvernetzung übertragen werden zu können. Jede  $\alpha$ -Untereinheit besitzt zwei verschiedene Insulinbindungsdomänen,  $1\alpha$  und  $2\alpha$ , die durch eine cysteinreiche Domäne voneinander getrennt werden. Das asymmetrische Insulinmolekül besitzt ebenfalls zwei Domänen, die eine unterschiedliche Affinität zu der  $1\alpha$ - oder  $2\alpha$ -Domäne des Rezeptors aufweisen. Demzufolge bindet eine Domäne des Liganden an die eine  $1\alpha$ -Domäne, während die zweite Domäne mit der  $2\alpha$ -Domäne der anderen  $\alpha$ -Untereinheit interagiert (De Meyths et al. 1993, De Meyths 1995). Die extrazelluläre Hormonbindung bewirkt vermutlich eine Veränderung der relativen Anordnung der  $\alpha$ -Untereinheiten und der intrazellulären Bereiche zueinander (Petruzelli et al. 1984, Herrera und Rosen 1986, Perlman et al. 1989, Flörke et al. 1990, O'Hare et al. 1990, Maddux und Goldfine 1991, Waugh und Pilch 1989). Diese Konformationsänderungen führen zur Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinaseaktivität und zur Autophosphorylierung von mindestens 6 der 13 cytoplasmatischen Tyrosinreste der  $\beta$ -Untereinheit, die in verschiedenen Domänen lokalisiert sind. Die Phosphorylierung umfaßt Tyr<sup>953</sup> und Tyr<sup>960</sup> (möglicherweise auch Tyr<sup>972</sup>) im Juxtamembranbereich, Tyr<sup>1146</sup>, Tyr<sup>1150</sup> und Tyr<sup>1151</sup> in der katalytischen Domäne und zwei Tyrosinreste in der C-terminalen Domäne, Tyr<sup>1316</sup> und Tyr<sup>1322</sup> (Tornqvist et al. 1987, Tavare und Denton 1988, White et al. 1988, Feener et al. 1993, Kohanski et al. 1993, Cann et al. 1997).

Aufgrund der dimeren Struktur des Rezeptors stellt sich die Frage nach einer *trans*-Phosphorylierung zwischen den beiden  $\beta$ -Untereinheiten oder einer *cis*-Phosphorylierung innerhalb einer Domäne dieser Phosphorylierungsstellen. Untersuchungen von Herrera et al. (1988) und Villalba et al. (1989) an löslichen Insulinrezeptorkinasen machen einen *cis*-Mechanismus für eine maximale Kinaseaktivität wahrscheinlich. Dafür sprechen auch Ergebnisse von Mortensen et al. (1991) und Lu et al. (1997), die zeigen, daß die Dimerisierung des Rezeptors nicht für die Besetzung der einzelnen Phosphorylierungsstellen entscheidend ist. Untersuchungen an Insulinrezeptorhybriden aus kinaseaktiven und kinaseinaktiven Monomeren geben dagegen Hinweise auf einen *trans*-Phosphorylierungsmechanismus (Treadway et al. 1991; Frattali et al. 1992; Leavy-Toleando 1994). Die Ergebnisse von Cobb et al. (1989), die eine Abhängigkeit der Kinaseaktivität einer löslichen Insulinrezeptorkinase von der Viskosität des Mediums finden, entsprechen diesen Beobachtungen. Laut Kohanski (1993) sind diese Beobachtungen auf die Verwendung von Polykationen zurückzuführen, die eine Aggregation der Kinasemoleküle bewirken und somit dem *trans*-Mechanismus den Vorzug geben. Die Analyse der Autophosphorylierung mit kinaseaktiven und inaktiven Rezeptorchimären deuten auf die Existenz beider Mechanismen für den nativen Insulinrezeptor (Shoelson et al. 1991, Frattali et al. 1992). Die Untersuchungen von Cann und Kohanski (1997) belegen, daß es kinetische Unterschiede in der Besetzung der Phosphorylierungsstellen gibt. Sie demonstrieren, daß die Besetzung der N-terminalen Phosphorylierungsstellen Tyr<sup>960</sup> und Tyr<sup>953</sup> einem *cis*-Phosphorylierungsmechanismus unterliegt, während die Tyrosinphosphorylierungsstellen der katalytischen und der C-terminalen Domänen durch eine *trans*-Phosphorylierung bedingt ist. Die Autophosphorylierung bewirkt eine Steigerung der Kinasetransferaseaktivität um den Faktor 10-20 durch die Erhöhung des  $V_{\max}$ -Wertes der Phosphotransferase-Reaktion (White et al. 1984, Kwok et al. 1986, Lehr 1995, Al-Hasani 1995). Die durch die Autophosphorylierung induzierte Aktivierung bleibt auch nach Entfernung des Hormons erhalten (Rosen et al. 1983). Kinetische Studien *in situ* und *in vitro* belegen, daß den Tyrosinresten in der katalytischen Domäne eine maßgebliche Rolle in der Rezeptorkinaseaktivierung zukommt. Dabei zeigen Untersuchungen von White und Kahn (1989) und Zhang et al. (1991), daß für die biologische Aktivität des Rezeptors die Phosphorylierung zweier Tyrosine ausreichend ist. Der konsequente Austausch der Tyrosinreste gegen Phenylalanin durch ortsspezifische Mutagenese führt, parallel mit der Abnahme der katalytischen Aktivität zu einem Verlust der biologischen Aktivität des Rezeptors (Murakami und Rosen 1991; Vogt et al. 1991; Wilden et al. 1992; Ouwen et al. 1994). Die Reihenfolge der Besetzung der einzelnen Tyrosinphosphorylierungsstellen wird kontrovers diskutiert. <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopische Studien von Levine et al. (1991) an einem Peptid aus der katalytischen Domäne, welches alle drei Phosphorylierungsstellen enthält, belegen die Phosphorylierung des Tyr<sup>1150</sup> in einem *trans*-Phosphorylierungsmechanismus. Infolge findet dann die Besetzung der Tyrosinreste Tyr<sup>1151</sup> und Tyr<sup>1146</sup> statt. *In vitro* und *in situ* Studien anderer Autoren zeigen, daß eine initiale *trans*-Phosphorylierung an dem Tyrosinrest Tyr<sup>1150</sup> erfolgt, im weiteren findet dann die Besetzung des Tyr<sup>1146</sup> und Tyr<sup>1151</sup> statt (Tornqvist et al. 1988, White et al. 1988, Dickens und Tavaré 1992, Tavaré und Dickens 1991, Wei et al. 1995). Nach Phosphorylierung der Tyrosinreste in der katalytischen Domäne kommt es dann zur Besetzung der Phosphorylierungsstellen im Juxtamembranbereich und in der C-terminalen Domäne.

Die Auflösung der Kristallstruktur der nichtphosphorylierten und der phosphorylierten katalytische Domäne der Insulinrezeptorkinase hat einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis der Funktion und dem Katalysemechanismus der Kinasedomäne beigetragen (Hubbard et al. 1994, Hubbard 1997). Die Untersuchungen wurden mit einem Enzym durchgeführt, welches 306 Aminosäuren umfaßt (Val<sup>966</sup> - Lys<sup>1271</sup>) und zwei Substitutionen (Cys<sup>969</sup> → Ser und Tyr<sup>972</sup> → Phe) enthält. Damit fehlen dem Molekül 27 Aminosäuren der Juxtamembran-Domäne und 72 Aminosäuren der C-terminalen Domäne, so daß nur die drei Tyrosinphosphorylierungsstellen der katalytischen Domäne enthalten sind.

Die Gesamtstruktur dieser Domäne ist der von Serin-/Threoninkinasen sehr ähnlich (Taylor et al. 1995, Abb. 2.3). Sie besteht im wesentlichen aus einer kleinen N-terminalen Domäne, die über eine einzige Schleife mit einer großen C-terminalen Domäne verbunden ist. Das aktive Zentrum liegt in einer Spalte zwischen diesen beiden Domänen. Der N-terminale Bereich ist vornehmlich durch  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen ausgezeichnet. Er enthält die ATP-Bindungsstelle mit dem glycinreichen Loop (zwischen Faltblatt  $\beta$ 1 und  $\beta$ 2) und dem invarianten Lysin Lys<sup>1018</sup> (Faltblatt  $\beta$ 3). Die Glycinreste

Gly<sup>991</sup>, Gly<sup>993</sup> und Gly<sup>996</sup> übernehmen die Rolle der Ladungstrennung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phosphatreste des ATP, das invariante Lysin<sup>1018</sup> koordiniert die beiden Phosphorylgruppen. In einem  $\alpha$ -helikalen Abschnitt ( $\alpha$ C) ist der invariante Glutamatrest Glu<sup>1035</sup> enthalten, der für eine zusätzliche Koordination des Mg<sup>2+</sup>-ATP verantwortlich gemacht wird. Der C-terminale Bereich zeichnet sich dagegen eher durch  $\alpha$ -helikale Strukturen aus. Er enthält den katalytischen Loop (HRDLAARN) mit der katalytischen Base Asp<sup>1120</sup>, der Substraterkennungsequenz LAARN und den DFG-“Loop“, dem die Rolle eines Metall-Chelators zugesprochen wird. Beide Motive finden sich in  $\beta$ -Faltblattstrukturen eingebettet und sind der Spalte zwischen N-terminaler und C-terminaler Domäne zugewandt (katalytischer Loop zwischen  $\beta$ 6 und  $\beta$ 7, DFG-Motiv zwischen  $\beta$ 8 und  $\beta$ 9). Die Spalte wird von dem sogenannten Aktivierungs-“Loop“ durchspannt. Er beinhaltet die drei Tyrosinphosphorylierungsstellen der katalytischen Domäne. In der nichtphosphorylierten Kinase blockiert er sowohl die ATP-Bindungstasche der N-terminalen als auch den katalytischen Loop der C-terminalen Domäne. Dabei scheint der Tyrosinphosphorylierungsstelle Tyr<sup>1150</sup> eine Schlüsselrolle zuzukommen. Dieser Rest ist dem aktiven Zentrum zugewandt und durch Wasserstoffbrücken mit der katalytischen Base und der Asparaginsäure Asp<sup>1148</sup> verbunden. Demnach scheint im ersten Schritt der Kinaseaktivierung eine *trans*-Phosphorylierung dieses Restes erfolgen zu müssen, der zur Freigabe des aktiven Zentrums führt und die ATP- und Substratbindung ermöglicht. Diese Hypothese wird durch die Kristallstruktur der phosphorylierten Kinasedomäne unterstützt. Infolge der Autophosphorylierung kommt es zu dramatischen Änderungen in der Konformation der Kinase. Die Phosphorylierung bewirkt eine Rotation der N-terminalen Domäne um 21° parallel zur Molekülachse.



**Abb. 2.3: Gesamtansicht der Kristallstruktur der katalytischen Domäne der Insulinrezeptorkinase. A:** Darstellung der phosphorylierten Domäne als Bändermodell.  $\alpha$ -Helices sind in rot,  $\beta$ -Faltblätter in blau dargestellt. Die ATP-Bindungsdomäne ist gelb, der katalytische Loop grün, das Peptid-Substrat pink und AMP-PNP schwarz hervorgehoben. **B:** Überlagerung der phosphorylierten und nichtphosphorylierten Domäne. Die Struktur der nichtphosphorylierten Domäne und ihr Aktivierungs-“Loop“ sind in orange bzw. rot, die phosphorylierte Form und ihr Aktivierungs-“Loop“ sind in grün bzw. blau dargestellt. Nomenklatur nach Ebina et al. 1985 (aus Hubbard, S.R. (1997) *EMBO J.*, **16**, S. 5574).

Der Aktivierungs-„Loop“ reorientiert sich aus dem aktiven Zentrum, wobei die phosphorylierten Tyrosinreste Tyr<sup>1150</sup> und Tyr<sup>1151</sup> durch verschiedene Wasserstoffbrücken und aromatischen Wechselwirkungen mit Resten aus der C-terminalen Domäne diese Position stabilisieren. Alleine der Tyrosinrest Tyr<sup>1146</sup> scheint keine Proteinkontakte zu haben und ist dem Lösungsmittel zugewandt. In der Kokristallisation mit dem ATP-Analogen AMP-PNP, Magnesium und einem 18 Aminosäure langem Peptidsubstrat, welches eine potentielle Tyrosinphosphorylierungsstelle des humanen IRS-1 in einem YMXM-Motiv enthält (Sun et al. 1991, Shoelson et al. 1992), wird die ternäre Struktur des Enzym-Substrat-Komplexes deutlich (Abb. 2.3). Der Nukleotidrest wird über verschiedene Wasserstoffbrücken am N-terminalen Loop gebunden. Zwei Magnesiumionen koordinieren dabei die Sauerstoffgruppen der Phosphatreste des ATP. Das Substrat ist über Wasserstoffbrücken mit dem C-terminalen Ende des Aktivierungs-„Loop“ verbunden. Interessanterweise ergibt die Analyse der Kristallstruktur aber keine Wechselwirkungen mit der Nukleotidbindungsdomäne. Die  $\gamma$ -Phosphorylgruppe des ATP-Analogons ist sehr weit entfernt von der Hydroxylgruppe des Tyrosinrestes im Substrat, wodurch ein direkter „In-line“ Phosphotransfer ausgeschlossen scheint. Dennoch postuliert Hubbard, daß nur Tyrosinreste aufgrund ihrer langen Seitenkette die Möglichkeit besitzen, daß aktive Zentrum des Enzyms zu erreichen (Kap. 2.6).

Die Funktion, die den einzelnen Tyrosinphosphorylierungsstellen im Juxtamembranbereich, katalytischer und C-terminale Domäne zukommt, ist in den letzten Jahren durch vielfältige Untersuchungen demonstriert worden. Dem Juxtamembranbereich kommt eine bedeutende Rolle in der Rezeptor vermittelten Signaltransduktion zu. Das in dieser Domäne enthaltene Tyrosin Tyr<sup>960</sup> ist an der Interaktion des Rezeptors mit den Signalproteinen IRS-1 und Shc beteiligt. Der Austausch dieser Aminosäure gegen Phenylalanin oder die Deletion von 12 Aminosäuren ( $\Delta$ 954-965) führt zu einer reduzierten Signalübertragung *in situ*, hat aber keinen Einfluß auf die katalytische Aktivität der Kinase *in vitro* (White et al. 1988, Backer et al. 1992, Kuburagi et al. 1993, Danielsen und Roth 1996). Die verminderte Insulinwirkung wird auf eine reduzierte Phosphotransferaseaktivität gegenüber diesen Signalproteinen zurückgeführt. Die Überexpression von IRS-1 in CHO-Zellen kann die biologische Aktivität dieser Mutanten wiederherstellen (Chen et al. 1995). Sequenzvergleiche mit anderen Rezeptorkinasen, die ebenfalls in der Lage sind, IRS-1 zu phosphorylieren, zeigen eine Konsensussequenz (NPXY-Motiv), der eine Rolle bei der Interaktion mit der Proteinbindungsdomäne (PTB: *protein tyrosine binding domaine*) des IRS-1 und Shc zugesprochen wird (Keegan et al. 1994, Sun et al. 1995, Wolf et al. 1995). Rezeptoren, denen diese Sequenz fehlt, sind nicht in der Lage, IRS-1 zu phosphorylieren (Myers et al. 1996). Untersuchungen von Rezeptormutanten, denen die Tyrosinreste Tyr<sup>953</sup> und Tyr<sup>960</sup> fehlen, belegen die Beteiligung dieser Aminosäuren an der Rezeptor-endocytose (Backer et al. 1990, Rajagopalan et al. 1991). Die Rolle der Tyrosinreste in der katalytischen Domäne in der Rezeptoraktivierung wurde bereits eingehend erläutert. Daneben gibt es Hinweise, daß diese Phosphorylierungsstellen an Protein-Protein- Interaktionen beteiligt sind. Experimente mit dem „Two Hybrid“-System in Hefe haben ergeben, daß Wechselwirkungen dieser Phosphorylierungsstellen mit einer Region des Signalproteins IRS-2 bestehen (He et al. 1996, Sawka-Verhelle 1996). Weitere Analysen zeigen zudem die Interaktion dieser Domäne mit den SH2-Domänen von GRB10 und SHP-2 (O'Neill et al. 1996, Frantz et al. 1997, Kharitonov et al. 1995). Der C-terminalen Domäne werden regulatorische Funktionen in der Katalyse und Aufgaben in der Signaltransduktion zugesprochen. Die Phosphatinkorporation in die C-terminale Domäne beträgt bis zu 40 % der Gesamtphosphorylierung (Tornqvist et al. 1987; Tavare und Denton 1988; White et al. 1988; Lee et al. 1993, Al-Hasani 1995). Dabei wird dieser Phosphorylierung und einem sehr hydrophilen Bereich (Aminosäure 1267-1286) die Aufgabe einer Feinregulierung in der Autophosphorylierung zugesprochen (Biener und Zick 1990, Yan et al. 1993, Baron et al. 1995). Der Austausch der Tyrosine Tyr<sup>1316</sup> und Tyr<sup>1322</sup> gegen Phenylalanin oder die Deletion der C-terminalen Domäne führt *in vitro* zu einer Änderung der kinetischen Eigenschaften der Kinase. Deletionen bewirken eine Erniedrigung des  $K_m$ -Wertes und eine Erhöhung des  $V_{max}$ -Wertes (Quirk et al. 1995). Wird ein gegen den C-Terminus gerichteter Antikörper in der Substratphosphorylierungsreaktion verwendet, welches zu einer Nichtbesetzung der hier vorhandenen Tyrosinphosphorylierungsstellen führt, wird eine Erhöhung der apparenten  $V_{max}$ -Werte, aber keine Änderung in den  $K_m$ -Werten erhalten. Die Autoren postulieren daher die Möglichkeit einer Konformationsänderung in der C-terminalen Domäne als

Voraussetzung für eine effektive Substratphosphorylierung (Gual et al. 1996). Von Al-Hasani et al. (1994) konnte gezeigt werden, daß die Phosphorylierung der Tyrosine im C-terminalen Bereich einer transienten Phosphorylierung unterliegt, die auf eine intrinsische Phosphataseaktivität des Insulinrezeptors zurückzuführen ist. Diese Daten sind in Einklang mit Beobachtungen von Gruppuso et al. (1992), der diese Dephosphorylierung  $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch verfolgen konnte. Die Funktion dieser transienten Phosphorylierung ist unklar, könnte aber eine regulatorische Funktion in der Signaltransduktion übernehmen.

Die Mutationen im C-terminalen Bereich scheinen *in situ* zu verstärkten mitogenen und reduzierten metabolischen Effekten zu führen (Maegawa et al. 1988; Takata et al. 1992; Ando et al. 1992, Pang et al. 1994). Allerdings konnte Myers et al. (1991), unter der Verwendung anderer Zelllinien, keinen Unterschied in der biologischen Aktivität des verkürzten bzw. mutierten Rezeptors feststellen. Die Ursache für die Änderung der biologischen Aktivität ist sehr wahrscheinlich in den vielfältigen Interaktionen begründet, die die C-terminale Domäne mit Signalproteinen eingehen kann. Untersuchungen von Levy-Toleando et al. (1994) und Van Horn et al. (1994) zeigen, daß die Bindung der SH2-Domäne der p85-Untereinheit der Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI-3-Kinase) an den C-Terminus zu einer Aktivierung ihrer Kinasefunktion führt. Dafür scheint vor allem die Bindung an Tyr<sup>1322</sup> verantwortlich zu sein (Staub et al. 1994). Dieselbe Arbeitsgruppe zeigt auch die Interaktion von SH-PTP2, einer Tyrosinphosphatase, mit diesem phosphorylierten Tyrosinrest. Untersuchungen von Myers et al. (1995) ergeben aber, daß in Zell-Linien ohne IRS-1 nach Insulinstimulierung keine PI-3-Kinase-Aktivität feststellbar ist. Die Autoren folgern daher, daß die Aktivierung dieses Signalweges hauptsächlich über die Bindung der p85-Untereinheit an IRS-1 erfolgt. Eine direkte Interaktion von Tyr<sup>1322</sup> mit dem Adapterprotein Grb10 konnte von Hansen et al. (1996) aufgezeigt werden. Dieses Signalprotein verfügt über eine Pleckstrin homologe (PH) und Prolinreiche Domäne und scheint für die Signalkomplexbildung am Rezeptor verantwortlich zu sein (Laviola et al. 1997, Liu und Roth 1998). Das kürzlich identifizierte hMAD2 bindet ebenfalls an der C-terminalen Region des Rezeptors, allerdings ist eine Phosphorylierung keine Voraussetzung für diese Interaktion (O'Neill et al. 1997). Aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit einem in Hefe identifizierten und in der Regulation des Zellzyklus beteiligten Proteins vermuten die Autoren eine vergleichbare Funktion.

## 2.5 Die Serin- und Threoninphosphorylierung der Insulinrezeptorkinase

Neben der Tyrosinphosphorylierung der cytoplasmatischen Untereinheit des Insulinrezeptors wird in Folge der Rezeptoraktivierung und Autophosphorylierung eine Serin- und Threoninphosphorylierung beschrieben. *In situ* führt die Stimulation mit Insulin oder Phorbolestern zur Serinphosphorylierung der  $\beta$ -Untereinheit des Rezeptors (Kasuga et al. 1982, Häring et al. 1984, Pang et al. 1985, White et al. 1985, Jacobs und Cuatrecasas 1986, Smith et al. 1988, Takayama et al. 1988, Pillay et al. 1991). Kinetische Studien in intakten Zellen zeigen, daß die beobachtete Serinphosphorylierung zeitlich der Tyrosinphosphorylierung nachfolgt (White et al. 1984). Neben der *in situ* Phosphorylierung wurde von vielen Autoren auch eine Serinphosphorylierung *in vitro* beschrieben, die nach Insulinstimulierung des gereinigten Rezeptors auftritt (Zick et al. 1983, Balloti et al. 1986, Smith et al. 1988, Biener und Zick 1990, Lewis et al. 1990a, Tavaré und Dickens 1991, Pillay und Siddle 1991, Heidenreich et al. 1994). Diese Serinphosphorylierung ist durch folgende Eigenschaften charakterisiert: (1) sie ist abhängig von der Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors, d. h. sie ist durch Insulin induzierbar und kann durch Tyrosinkinaseinhibitoren wie die Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors beeinflußt werden, (2) sie ist der Tyrosinphosphorylierung zeitlich nachfolgend und (3) unabhängig vom Reinheitsgrad der Rezeptorpräparation. Diese Ergebnisse sprechen gegen eine dem Insulinrezeptor locker assoziierte Serinproteinkinase sondern vielmehr für eine intrinsische Serinkinaseaktivität des Insulinrezeptors. Eine Kinase, die für diese Phosphorylierungen verantwortlich ist, konnte bislang nicht eindeutig identifiziert werden. Als mögliche Kandidaten werden verschiedene Isoformen der Proteinkinase C (Coghlan und Siddle 1993, Müller et al. 1991), die cAMP abhängige Proteinkinase (Issad et al. 1991), ein Caseinkinase I ähnliches Enzym (Rapuano und Rosen 1991) und die PI-3-Kinase (Tanti et al. 1994, Freund et al. 1995) betrachtet. Darüberhinaus wurde von Lewis et al. (1990), Ahn et al. (1993), Coghlan et al. (1994) und Tavaré et al. (1991) eine durch die Protein-

kinase C vermittelte Threoninphosphorylierung beschrieben. Asamoah et al. (1995) beschrieben die Reinigung einer dem Insulinrezeptor assoziierten Serinkinase aus Humanplazenta. Demnach scheint die Möglichkeit einer exogenen Serin- bzw. Threoninphosphorylierung zwar gegeben, die Hypothese, daß die Insulinrezeptorkinase selber Serinphosphorylierung katalysieren kann, konnte aber in einer Reihe von Untersuchungen zweifelsfrei bestätigt werden. Baltensperger et al. (1994) konnten demonstrieren, daß ein im Baculovirus-Expressionssystem überexprimierter und gereinigter Insulinrezeptor dieselben Charakteristika wie der aus Humanplazenta gereinigte Insulinrezeptor bezüglich der Serinphosphorylierung aufweist. Untersuchungen von Tauer et al. (1996) bestätigten diesen Befund. Die Expression eines Insulinrezeptors mit einem rekombinanten Vacciniavirus belegen eine intrinsische Serinkinaseaktivität des Enzyms. Für den gereinigten Insulinrezeptor aus Humanplazenta konnte gezeigt werden, daß die Serinphosphorylierung unabhängig vom Reinheitsgrad ist (Heidenreich et al. 1994). Auch eine lösliche Insulinrezeptorkinase, welche über das Baculovirus-Expressionssystem hergestellt wurde, zeigte in der Autophosphorylierungsreaktion die Phosphorylierung an Serinresten (Al-Hasani 1995, Tennagels 1995, Al-Hasani et al. 1997). Im Gegensatz dazu belegten die Untersuchungen mit kinaseinaktiven Varianten dieser löslichen Kinase, daß sowohl Tyrosin- als auch Serinphosphorylierung unbedingt abhängig von der Kinaseaktivität sind. Der Austausch der invarianten Aminosäure Lysin<sup>1018</sup> in der ATP-bindenden Domäne oder der katalytischen Base Asp<sup>1120</sup> gegen Alanin führten in der Autophosphorylierungsreaktion weder zur Phosphatinkorporation in Serin- noch in Tyrosinreste und demonstrieren damit die Abwesenheit einer exogenen Serinkinaseaktivität in den gereinigten Enzymfraktionen (Tennagels 1995, Al-Hasani et al. 1997, Kessler 1998). Für andere Mitglieder der Insulinrezeptorfamilie (trk-b Rezeptor, IGF-I Rezeptor), aber auch für den EGF-Rezeptor, konnte ebenfalls eine Serinautophosphorylierung beschrieben werden (Beemelmans 1997, Magg 1997, Affüpper 1998). Die löslichen Kinasen dieser Rezeptoren zeigten die gleichen Charakteristika in der Serinautophosphorylierung wie der Insulinrezeptor oder seine lösliche Kinase. In allen Fällen war die beobachtete Serinphosphorylierung unabhängig von Reinheitsgrad oder der verwendeten Reinigungsmethode, der Tyrosinphosphorylierung zeitlich nachgeschaltet und einzig abhängig von der Kinaseaktivität. Der Einsatz von Tyrosinkinaseinhibitoren oder der Austausch der katalytischen Base oder des invarianten Lysin in der ATP-Bindungsstelle führte in allen Fällen zu einem inaktiven Enzym, welches weder Tyrosin- noch Serinphosphorylierung zeigte (Beemelmans 1997, Magg 1997, Affüpper 1998, Wirth 1998). Bislang wurden zehn verschiedene Serinreste und ein Threoninrest als Phosphorylierungsstellen in der  $\beta$ -Untereinheit des Insulinrezeptors beschrieben (Tab. 2.1). Die Phosphorylierungsstellen finden sich in allen drei Domänen des cytoplasmatischen Anteils des Insulinrezeptors, viele davon im C-terminalen Bereich. Die Positionen der phosphorylierten Serin- und Threoninreste wurden dabei in den meisten Fällen durch den Vergleich der Retentionszeiten von synthetischen Phosphopeptiden mit radioaktiv markierten tryptischen Phosphopeptiden des Insulinrezeptors nach Autophosphorylierung *in situ* oder *in vitro* nach HPLC-Analyse oder zweidimensionaler Elektrophorese erhalten. Autoren, die die beobachtete Serinphosphorylierung einer exogenen Serinkinaseaktivität zuschreiben, analysierten dagegen die Fähigkeit partiell gereinigter Insulinrezeptorfraktionen, synthetische Peptide an Serin- oder Threoninresten zu phosphorylieren. Als Serinautophosphorylierungsstellen werden in der Literatur die C-terminalen Serinreste Ser<sup>1293</sup> und/ oder Ser<sup>1294</sup> (Lewis et al. 1990a, Tavare et al. 1991, Baltensperger et al. 1992) oder Ser<sup>1275</sup> und Ser<sup>1309</sup> diskutiert (Al-Hasani et al. 1997). Letztere konnten durch direkte Sequenzierung tryptischer Phosphopeptide einer autophosphorylierten löslichen Insulinrezeptorkinase identifiziert werden, während erstere durch den Vergleich der Retentionszeiten synthetischer Phosphopeptide mit tryptischen Phosphopeptiden eines autophosphorylierten Rezeptors nach HPLC-Analyse identifiziert wurden. Die von Al-Hasani beschriebenen Serinautophosphorylierungsstellen konnten auch in gereinigtem Insulinrezeptor aus Humanplazenta (Magg 1995) und einer anderen Variante der löslichen Kinase nachgewiesen werden (Tennagels 1995). Daneben wird für den Insulinrezeptor eine weitere Autophosphorylierungsstelle im Juxtamembranbereich postuliert (Heidenreich 1995, Magg 1994, Kayatz 1994), allerdings konnte diese noch nicht näher identifiziert werden. Für eine hier lokalisierte Serinphosphorylierung sprechen auch Ergebnisse von Nölle und Wieber, welche nach Austausch der beiden C-terminalen Serinreste gegen Aspartat oder der Deletion des C-Terminus eine Serinphosphorylierung im Enzym finden (Nölle 1998, Wieber 1998).

Serin-/Threonin-phosphorylierungsstelle	Domäne im hIR	Rezeptor aus	verantwortliche Kinase	Referenz
Ser <sup>955</sup> , Ser <sup>956</sup>	Juxtamembran	CHO	PKC $\alpha$	Feener et al. 1993 Liu und Roth 1994a
Ser <sup>994</sup>	katalytisch	HEK923	?	Strack et al. 1997
Ser <sup>1023</sup> , Ser <sup>1025</sup>	katalytisch	CHO	PKC $\alpha$	Liu und Roth 1994b
Ser <sup>1078</sup>	katalytisch	Humanplazenta	41 kDa Protein	Asamoah et al. 1995
Thr <sup>1148</sup>	katalytisch	Humanplazenta	PK CK2	Marin et al. 1996
Ser <sup>1275</sup> , Ser <sup>1309</sup>	C-Terminus	Rezeptorkinase Baculo-System	intrinsisch	Al-Hasani et al. 1997
Ser <sup>1293</sup> , Ser <sup>1294</sup>	C-Terminus	NIH-3T3 CHO Baculo-System	intrinsisch	Lewis et al. 1990a Tavare et al. 1991 Baltensperger et al. 1992
Ser <sup>1315</sup>	C-Terminus	COS CHO CHO	PKC PKC $\alpha$ -	Lewis et al. 1994 Coghlan et al. 1994 Feener et al. 1994
Thr <sup>1336</sup>	C-Terminus	NIH-3T3 CHO	PKC $\alpha$	Lewis et al. 1990b Ahn et al. 1993 Coghlan et al. 1994 Tavare et al. 1991

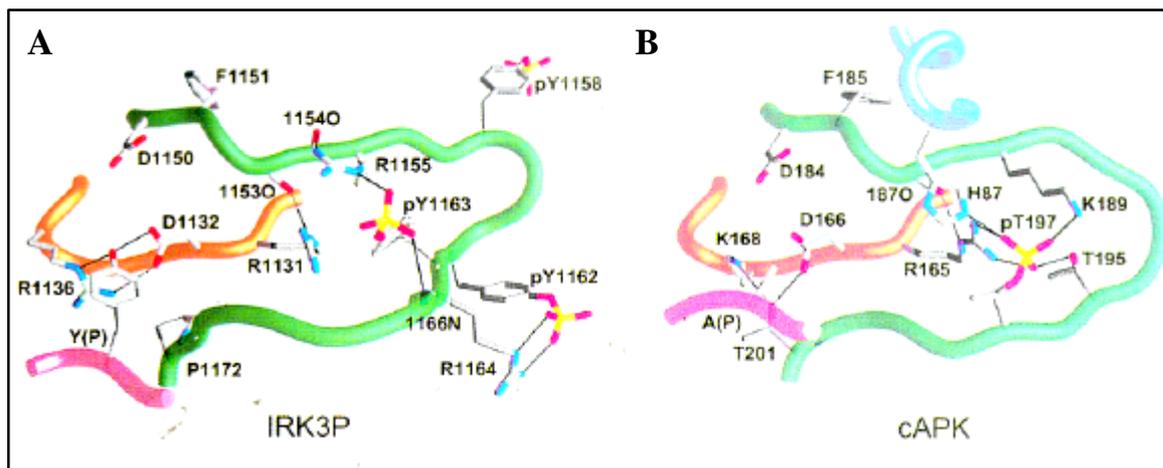
**Tab. 2.1: Serin- und Threoninphosphorylierungsstellen in der cytoplasmatischen Untereinheit des Insulinrezeptors.** Angegeben sind die identifizierten Phosphorylierungsstellen, die Quelle des untersuchten Rezeptorproteins und die von den Autoren dafür verantwortlich gemachte Kinase. Nomenklatur der Aminosäuren nach Ullrich et al. 1985.

Bislang konnte der Serinphosphorylierung auf Rezeptorebene keine eindeutige biologische Funktion zugeordnet werden. Während einige Autoren ihr einen negativen Einfluß auf die Auto- und Substratphosphorylierung der Rezeptorkinase zuschreiben (Takayama et al. 1988, Häring et al. 1986, Anderson und Olefsky 1991, Torrosian et al. 1993), konnten andere diesen Effekt nicht bestätigen (Jacobs und Cuatrecasas 1986, Bottaro et al. 1989, Pillay et al. 1991, Quentmeier et al. 1993, Coghlan und Siddle 1993, Chin et al. 1993). Allerdings zeigt sich bei der Verwendung unterschiedlicher Zelllinien, daß auch Unterschiede in den Phosphorylierungsmustern der Serin- und Threoninphosphorylierung bestehen (Feener et al. 1994, Pillay et al. 1991, Duronio und Jacobs 1990, Tavare et al. 1988). Der Einzelaustausch der Serinreste Ser<sup>994</sup> bzw. Ser<sup>1023</sup>, Ser<sup>1025</sup> und Ser<sup>1309</sup> gegen Alanin bewirkt eine Erhöhung der Rezeptorautophosphorylierung nach Insulinstimulation *in situ* (Strack et al. 1997). Dabei scheint dem Serinrest Ser<sup>994</sup> aufgrund seiner Lokalisation in der Nähe der ATP-Bindungsstelle eine inhibitorische Rolle zuzukommen. Die Phosphorylierung dieser Aminosäure durch die Proteinkinase C soll eine verminderte ATP-Bindung bewirken. Neben der Beeinflussung der katalytischen Aktivität der Kinase scheint die Serinphosphorylierung auch die Wechselwirkung mit Signalproteinen zu beeinflussen. Die lösliche Insulinrezeptorkinase zeigt nach Autophosphorylierung der C-terminalen Serinphosphorylierungsstellen eine deutlich geringere Assoziation mit einer rekombinanten SH2-Domäne der p85-Untereinheit der PI-3 Kinase (Parvaresh persönliche Mitteilung), für die eine Bindung an den phosphorylierten Tyrosinrest Tyr<sup>1322</sup> beschrieben werden konnte (Staubs et al. 1994). Demnach könnte die intrinsische Serinkinaseaktivität der Insulinrezeptorkinase möglicherweise einen homologen Desensitivierungsmechanismus in der Rezeptor-vermittelten Signalweiterleitung darstellen.

Bei der Möglichkeit der Insulinrezeptorkinase in der Autophosphorylierung sowohl Serin als auch Tyrosin als Phosphatakzeptor zu nutzen, ergibt sich die Frage nach einem Katalysemechanismus, der sowohl die Phosphorylierung der aliphatischen als auch der aromatischen Aminosäurereste zuläßt. Bis vor kurzem galt die Meinung, daß Proteinkinasen entweder die Phosphorylierung von Serin-/Threoninresten oder Tyrosinresten katalysieren können. Sie wurden daher in die Gruppe der Serin-/Threoninkinasen oder der Tyrosinkinasen eingeteilt. Sequenzvergleiche von Vertretern beider Gruppen zeigten neben Gemeinsamkeiten aber auch Unterschiede im Aufbau der katalytischen

Domäne. Diese befinden sich im sogenannten katalytischen Loop, dem Aktivierungs-„Loop“ und dem sogenannten P+1-„Loop“ beider Kinasen. Während der katalytische „Loop“ von Tyrosinkinase durch die Aminosäuresequenz HRDLAARN charakterisiert ist, findet sich in Serin/Threoninkinasen die Sequenz HRDLKPEN. Im Aktivierungs-„Loop“ unterscheiden sich die beiden Kinasefamilien in den hier vorhandenen Phosphorylierungsstellen. Während Serin/Threoninkinasen hier einen oder mehrere phosphorylierbare Serin- und oder Threoninreste besitzen, finden sich bei Tyrosinkinase ein oder mehrere Tyrosinphosphorylierungsstellen. Mit diesen Unterschieden wurde die unterschiedliche Spezifität der Kinasen begründet. Neu identifizierte Proteinkinase wurden dann alleine aufgrund von Sequenzvergleichen ihrer Primärsequenz mit denen schon bekannter und klassifizierter Proteinkinase in eine der beiden Gruppe eingeordnet. Mit der Entdeckung sogenannter dualer Proteinkinase mußte die Möglichkeit dieser Klassifizierung neu überdacht werden (Lindberg et al. 1992). So wurde z. B. die Proteinkinase *wee1* aus *Schizosaccharomyces pombe* aufgrund ihrer Primärsequenz in die Gruppe der Serin-/Threoninkinasen eingeordnet. Allerdings zeigte die biochemische Charakterisierung dieses Enzyms, daß es in der Lage ist, nach Serinautophosphorylierung, einen Tyrosin- und Threoninrest in der p34<sup>cdc2</sup>-Kinase zu phosphorylieren (Featherstone und Russel 1991). Dadurch scheint die Aktivität dieser im Zellzyklus involvierten Kinase negativ beeinflusst zu werden (Lundgren et al. 1991, Parker et al. 1991). Auch die MAPK Kinase (MEK) zeigt duale Spezifität, ist aber aufgrund ihrer Primärsequenz der Familie der Serin-/ Threoninkinasen zugeordnet. Nach Aktivierung ihrer katalytischen Aktivität durch die Phosphorylierung zweier Serinreste durch die Serinkinase Raf phosphoryliert das Enzym einen Tyrosin- und einen Threoninrest in der MAP Kinase (Zhang et al. 1995, Payne et al. 1991), welches zur Aktivierung dieser Kinase führt (Anderson et al. 1990, Zhang et al. 1995). Dabei scheint die Phosphorylierung des Substrates einem distributivem Mechanismus zu unterliegen. Nach Tyrosinphosphorylierung dissoziiert das Substrat von der Kinase ab und wird erst im nächsten Schritt an Threonin phosphoryliert. Beide Phosphorylierungen sind aber unbedingte Voraussetzung für eine maximale Aktivierung der MAP Kinase (Ferrell und Bhatt 1997). Diese Beobachtungen definieren den Begriff einer dualspezifischen Kinase. Diese sollte in der Lage sein, sowohl phenolische als auch aliphatische Hydroxyaminosäuren in Substraten phosphorylieren zu können (Lindberg et al. 1992). Die strukturellen Voraussetzungen des katalytischen Zentrums für einen Phosphotransfer auf Serin/Threonin oder Tyrosin sollten sehr verschieden sein. In der Tat ergibt der Vergleich dieser Region in der Röntgenstruktur der phosphorylierten IRKD mit der bekannten Struktur der cAMP abhängigen Proteinkinase (cAPK) einige strukturelle Merkmale, die das unterschiedliche Phosphorylierungsverhalten beider Enzyme erklären könnten (Abb. 2.4). Die Analyse der Substratspezifität der Insulinrezeptorkinase mit synthetischen Peptiden zeigt, daß die Kinase Substrate bevorzugt, in denen ein oder zwei saure Aminosäurereste der Tyrosinphosphorylierungsstelle voranstehen und welcher dann ein oder mehrere hydrophobe Aminosäure folgen (Shoelson et al. 1992, Songyang et al. 1995). Diese Aussage läßt sich mit der Kristallstrukturanalyse in Übereinstimmung bringen. Neben verschiedenen basischen Aminosäureseitenketten im N-terminalen Loop (Lys<sup>1073</sup>, Arg<sup>1077</sup> und Lys<sup>1080</sup>) finden sich auch einigen hydrophobe Seitenketten im C-terminalen Loop (Val<sup>1161</sup> und Leu<sup>1207</sup>), die ein Substrat mit den beschriebenen Eigenschaften durch Wasserstoffbrücken und hydrophoben Wechselwirkungen stabilisieren können.

Im Gegensatz dazu finden sich in der cAPK viele negativ geladene Aminosäureseitenketten, so daß die zu phosphorylierende aliphatische Aminosäure bevorzugt in einer positiv geladenen Aminosäureumgebung lokalisiert sein muß (Taylor et al. 1995). Wird die räumliche Anordnung der beiden Aktivierungs-„Loops“ miteinander verglichen, zeigt sich eine identische Konformation. Dabei nimmt der phosphorylierte Threoninrest Thr<sup>197</sup> der cAPK strukturell zu dem Tyrosinrest Tyr<sup>1151</sup> des IR eine vergleichbare Stellung ein. Weiterhin ist zu erkennen, daß der Aktivierungs-„Loop“ nicht direkt an der Substraterkennung und -bindung beteiligt ist. Aus dieser und der Beobachtung, daß die Umgebung des Tyrosinrestes im Substrat (negativ geladene Aminosäure in +1 Stellung zum Tyrosin, gefolgt von hydrophoben Aminosäuren in -1 Position) nicht unbedingt zwingend für eine effektive Phosphorylierung zu sein scheint (Shoelson et al. 1992, Songyang et al. 1995), folgert Hubbard, daß die Konformation des P+1 Loops die maßgebliche strukturelle Determinante für die Spezifität der IRKD-Tyrosinkinase darstellt. In der Tat finden sich hier zwischen Serin/Threoninkinasen und Tyrosinkinase große Unterschiede in der Aminosäureabfolge.



**Abb. 2.4: Konformation des phosphorylierten Aktivierungs-“Loop“ der IRKD im Vergleich zum phosphorylierten Aktivierungs-“Loop“ der cAMP abhängigen Proteinkinase.** Der Aktivierungs-“Loop“ ist in grün, der katalytische Loop in orange und das Peptidsubstrat in pink dargestellt. Nomenklatur nach Ebina et al. 1985 (aus Hubbard, S.R. (1997) *EMBO J.*, **16**, S. 5576).

In der IRKD werden Wasserstoffbrücken zwischen diesem Bereich und dem Substrat gefunden, die zeigen, daß nur eine Tyrosinseitenkette lang genug ist, um in das katalytische Zentrum zu gelangen. Dabei scheint der Prolinrest Pro<sup>1160</sup> eine wichtige Stellung einzunehmen. Ein weiterer Unterschied in der Substraterkennung besteht in der katalytischen Domäne. In Serin/Threoninkinasen findet sich hier ein konservierter Lysin-, in Tyrosinkinasen ein Argininrest. Beide Aminosäuren sind über Wasserstoffbrücken mit dem Substrat verbunden (Taylor et al. 1995). Allerdings ergibt sich aus diesen Beobachtungen nicht unbedingt die eine alleinige Spezifität der IRKD für Tyrosinreste. Allen Erkenntnissen zufolge besitzen duale Kinasen eine sehr hohe Flexibilität in ihren aktiven Zentrum (Knighton et al. 1993, Bossemeyer et al. 1993, Taylor et al. 1995). Untersuchungen mit konformationssensitiven Antikörper zeigen, daß gerade dieser Bereich in der Rezeptorkinase eine hohe Beweglichkeit ausmacht (Herrera und Rosen 1986). Ferner beantwortet das Modell nicht die Frage nach der Reihenfolge in der Besetzung der einzelnen Tyrosinphosphorylierungsstellen in dem Aktivierungs-“Loop“ des Enzyms. Möglicherweise ergeben sich vollkommen andere strukturelle Verhältnisse bei der Besetzung nur einer oder zwei Tyrosinphosphorylierungsstellen, wodurch sich auch Änderungen in der Konformation es P(+1)-“Loops“ ergeben sollten. Studien über den *in situ* Phosphorylierungsstatus der Kinase zeigen, daß wahrscheinlich nur zwei der drei Tyrosinphosphorylierungsstellen besetzt sind (White 1998). Ferner kann auch nicht die Frage nach einem Einfluß der Juxtamembran- und der C-terminalen Domäne auf die Struktur der katalytische Domäne beantwortet werden. Letzendlich bleiben damit Zweifel, ob die vorliegende Kinasestruktur tatsächlich die Spezifität für Tyrosinreste begründet. Das eine solche Differenzierung nicht möglich ist, zeigen die Sequenzvergleiche bisher bekannter Serin/Threoninkinasen, die eine duale Spezifität besitzen. Sie zeigen keine Sequenzhomologie zueinander, die über die Homologie zu anderen Serin/Threoninkinasen hinausgeht (Lindberg et al. 1992).

## 2.6 *Signalwege des Insulinrezeptors*

Bei allen bisher untersuchten Rezeptortyrosinkinasen führt die Bindung des Liganden zur Tyrosin-Autophosphorylierung des Rezeptors. Diese Autophosphorylierung bewirkt zum einen die Aktivierung des Rezeptors und führt zur Phosphorylierung exogener Substrate, zum anderen können diese Autophosphorylierungsstellen Bindungsstellen für andere Signalproteine darstellen. In allen Fällen kommt es zur Ausbildung von Signalkomplexen, die zur spezifischen Signalweiterleitung führen. Dabei spielen vor allen Dingen Protein-Protein-Interaktionen eine Rolle, die über spezifische Strukturmodule vermittelt zur Aktivierung oder Inaktivierung einzelner Enzyme führen können. Den sogenannten Src-homologen Domänen (SH2) kommt eine besondere Schlüsselrolle in der Erkennung phosphorylierter Tyrosinreste zu. Dieses Motiv aus 100 Aminosäuren wurde erstmals von Sadowsky et al. (1986) in der Tyrosinkinase pp60<sup>src</sup> beschrieben. Strukturell bestehen SH2-Domänen aus einer zentralem  $\beta$ -Faltblattstruktur, aus mehreren anti-parallelen Strängen, die von zwei  $\alpha$ -Helices flankiert wird (Kurian und Cowburn 1997, Xu et al. 1997). Bindungsstudien mit Phosphotyrosin enthaltenden Peptiden und Röntgenstruktur-Analysen haben gezeigt, daß die Region, die von SH2-Domänen erkannt wird, nur 4-5 Aminosäuren umfaßt. Die Aminosäuren C-terminal von dem phosphorylierten Tyrosinrest bestimmen dabei die Selektivität der SH2-Domäne (Fantl et al. 1992, Songyang et al. 1995, Huyer et al. 1995, Fauman et al. 1996). Ein charakteristisches Erkennungsmotiv stellt die Sequenz YXXM (Pawson 1995). SH2-Domänen werden in vielen cytoplasmatischen Signalproteinen gefunden (Liu und Roth 1998). Häufig besitzen sie enzymatische Aktivität oder können die anderer Proteine beeinflussen, andere wiederum stellen Adapterproteine dar. Ein weiteres wichtiges Motiv für die Protein-Protein-Interaktion ist die SH3-Domäne, ein konservierter Bereich von 60-85 Aminosäuren (Koch et al. 1991). Proteine, die eine SH2-Domäne tragen, beinhalten oftmals auch dieses strukturelle Modul, dessen Bindungsspezifität sich auf Prolinreiche Sequenzen erstreckt (Rickles et al. 1994). Pleckstrin homologe Domänen (PH-Domänen) werden in einer Vielzahl von Signal- und Cytoskelettproteinen gefunden. Die genaue Funktion dieser 100 Aminosäure umfassenden Domäne ist unbekannt, es gibt jedoch Hinweise, daß sie an der Translokation von Proteinen zur Plasmamembran beteiligt sind (Lefkowitz 1993, Pawson 1995). Die 200 Aminosäure umfassende PTB-Domäne scheint wie die SH2-Domäne spezifische Phosphotyrosinreste zu binden. Dabei stellt die Sequenzabfolge NPXpY ein bevorzugtes Bindungsmotiv dar (Kavanaugh und Williams 1994).

Für den Insulinrezeptor werden einige direkte Interaktionen mit Signalproteinen beschrieben (s. Kap. 2.5), allerdings ist der entscheidende Schritt in der Signalweiterleitung die Phosphorylierung sogenannter Insulinrezeptorsubstrate, die ihrerseits als Adaptermoleküle für eine Reihe von Signalproteinen dienen (Kahn 1998). Die Verwendung von Adapterproteinen in der Signalweiterleitung bringt mehrere Vorteile mit sich. Gemessen an den vielfältigen metabolischen und mitogenen Effekten, die Insulin vermittelt, stellt die Möglichkeit, verschiedene Proteine durch ein Rezeptormolekül phosphorylieren zu können, eine Vervielfältigung des biologischen Signals dar und eliminiert damit die stöchiometrische Begrenzung zwischen Rezeptoranzahl und vorhandenen Bindungspartnern. Das Insulinrezeptorsubstrat-1 (IRS-1) wurde als erstes Adapterprotein des Insulinrezeptors identifiziert (White et al. 1985). Das menschliche IRS-1 (hIRS-1) wird von einem einzigen Exon auf dem Chromosom 2 (2q36-37) kodiert und besitzt ein rechnerisches Molekulargewicht von 132 kDa (Araki et al. 1993). Die Tatsache, daß in transgenen Mäusen mit homozygot defektem IRS-1 Locus die Signalweiterleitung durch den Insulinrezeptor nicht vollständig zum Erliegen kommt (Araki et al. 1994), führten zur Klonierung des Insulinrezeptorsubstrates 2 (hIRS-2). Das Protein ist um etwa 10 kDa größer als hIRS-1 und wird von einem einzigen Exon in der Nähe des Genlokus des hIRS-1 kodiert (Sun et al. 1995). Neben diesen beiden Vertretern wurden weitere Proteine identifiziert, die wegen struktureller Homologien in die IRS-Familie eingeordnet werden müssen. IRS-3 besitzt ein Molekulargewicht von 60 kDa und N-terminal eine PH- und eine PTB-Domäne (Smith-Hall et al. 1997, Lavan et al. 1997). Diese Domänen finden sich auch in IRS-4, ein 160 kDa-Protein, welches aus menschlichen Nierenzelle isoliert werden konnte (Lavan et al. 1997). Röntgenstruktur-Analysen zeigen, daß IRS-1 mit seiner PTB-Domäne an das phosphorylierte NPXY-Motiv eines Peptids bindet, das einen Ausschnitt aus der Juxtamembranregion des Rezeptors beinhaltet (Eck et al. 1996). Daneben gibt es Hinweise, daß die PH-Domäne eine Rolle bei der Assoziation der Proteine mit dem

aktivierten Rezeptor spielt (Yenush et al. 1996). Die PH-Domäne wird darüber hinaus auch für die Bindung an Phospholipide verantwortlich gemacht, die eine Rekrutierung der IRS-Proteine an der Membran ermöglichen könnte (Myers et al. 1995). Die folgenden C-terminalen Regionen sind nicht sehr stark konserviert, beinhalten aber mehrere Tyrosin- und Serinphosphorylierungsstellen. IRS-1 enthält 21 potentielle Tyrosinphosphorylierungsstellen und über 30 potentielle Serin/Threoninphosphorylierungsstellen (Sun et al. 1991). Das Protein zeigt *in situ* eine hohe basale Serinphosphorylierung, die nach Insulinstimulation noch weiter erhöht wird (Sun et al. 1992). Von den Tyrosinphosphorylierungsstellen werden mindestens acht vom Insulinrezeptor phosphoryliert (Sun et al. 1993). Das IRS-2 enthält 22 potentielle Tyrosinphosphorylierungsstellen, von denen 14 identische Sequenzumgebungen zeigen wie IRS-1 (Lavan et al. 1997). Ein weiteres Adapterprotein stellt das 1996 entdeckte Gab-1 Protein dar (Holgado-Madruga et al. 1996). Das Molekül trägt eine N-terminale PH-Domäne, der zwei SH3-Domänen folgen und mehrere Tyrosinphosphorylierungsstellen. Dieses Protein ist auch an Signalweiterleitung des EGF-Rezeptors beteiligt. Infolge multipler Tyrosinphosphorylierungen der Proteine der IRS-Familie durch den Insulinrezeptor kommt es zur Ausbildung von Signalkomplexen mit Signalproteinen, die an die Phosphorylierungsstellen binden. Dabei ergeben sich aufgrund der Vielfalt der Adapterproteine, der Phosphorylierungsstellen und der Bindungspartner eine Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten (Abb. 2.5).

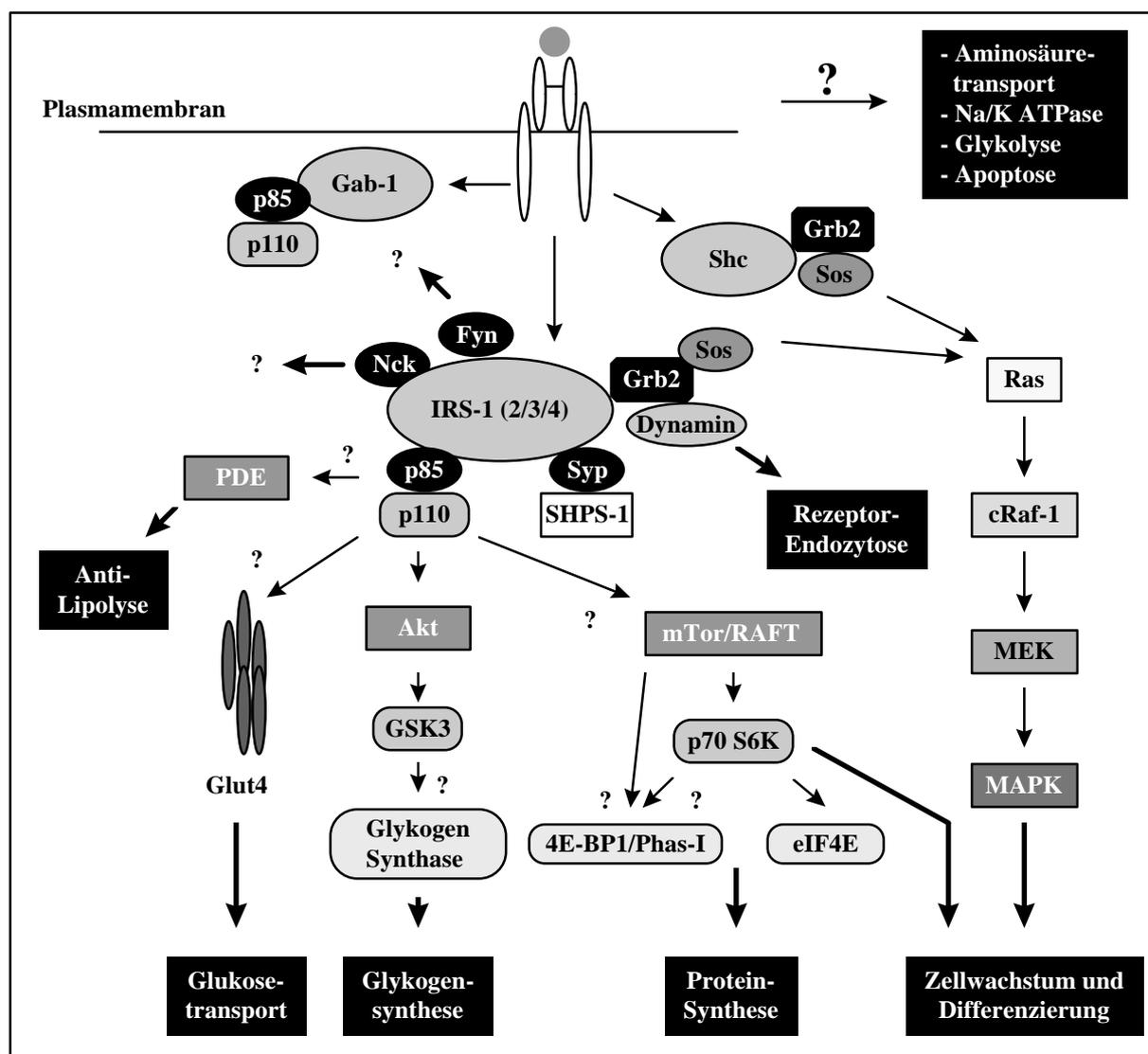


Abb. 2.5: Bisher bekannte Signalwege des Insulinrezeptors bei der Vermittlung seiner mitogenen und metabolischen Effekte.

Als eines der wichtigsten Schlüsselenzyme gilt die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K). Das Enzym besteht aus einer katalytischen Untereinheit (p110), die mit einer regulatorischen Untereinheit (p85) assoziiert ist. Für beide Untereinheiten werden verschiedene Isotypen gefunden (White 1998). Die Bindung der regulatorischen Untereinheit mit seinen beiden SH2-Domänen, bevorzugt an das phosphorylierte Tyrosin in dem Motiv YMXM, bewirkt die Aktivierung der katalytischen Untereinheit (Backer et al. 1992). Diese Konsensussequenz ist einmal im Insulinrezeptor, neunmal im IRS-1 und IRS-2 und zweimal im IRS-3 vorhanden. Bisher konnte aber eine direkte Protein-Protein-Interaktion der p85-Untereinheit nur mit dem Insulinrezeptor (Staub et al. 1994) und dem IRS-1 nachgewiesen werden (Backer et al. 1992). Das Enzym katalysiert die Phosphorylierung von Membran-gebundenen Inositolresten. Dhand et al. (1994) konnte zusätzlich eine intrinsische Serin/Threoninkinaseaktivität aufzeigen, die möglicherweise auch eine Serinphosphorylierung des IRS-1 bewirkt (Tanti et al. 1994). Die durch die PI3K beeinflussten Signalwege sind sehr vielseitig und scheinen sowohl mitogene als auch metabolische Wege zu umfassen. Infolge der PI3K-Aktivierung kommt es z. B. zur Translokation von Glut4, einem Glukosetransporter, zur Plasmamembran (Rodnick et al. 1992, Satoh et al. 1993, Hara et al. 1994) und damit zur Glukoseaufnahme in die Zelle (Quon et al. 1995, Kotani et al. 1995). Desweiteren aktiviert das Enzym die Serinkinase AKT (auch PKB genannt), deren gesteigerte Aktivität zur Regulation der Glykogensynthese führt (Khon et al. 1995, Alessi et al. 1996). Daneben stimuliert es die Proteinsynthese von Stoffwechsellzymen durch Aktivierung der p70-S6K, die zur Phosphorylierung verschiedener Transkriptionsfaktoren führt (Cheatham et al. 1994, Hara et al. 1995). Weitere Prozesse, wie Aktivierung der Fettsäuresynthese durch Regulation der cAMP Phosphodiesterase (PDK, Moule et al. 1995) oder Regulation des Cytoskeletts (Kotani et al. 1995b) werden ebenfalls beeinflusst, die genauen Signalwege sind hier aber noch unverstanden.

Grb2 (Growth factor receptor binding protein) ist ein Adapterprotein ohne enzymatische Aktivität und beinhaltet eine SH2- und zwei SH3-Domänen (Lowenstein et al. 1992). Mit seinen SH3-Domänen bildet es einen Komplex mit Sos, einem GTP-Austauschfaktor für Ras. Insulin induziert die Assoziation des Grb-Sos Komplexes mit IRS-1 und Ras, induziert den Austausch von GDP-Ras zu GTP-Ras und aktiviert damit die MAP-Kinase-Kaskade (Roberts et al. 1992). Patti et al. (1995) konnten die Interaktion des Grb-Sos-Komplexes auch für das IRS-2 nachweisen. Infolge kommt es zur Aktivierung verschiedener Serin/Threoninkinasen, die letztendlich zu Zellwachstum und DNA-Synthese führen (Moller et al. 1992, Sakaue et al. 1995). Studien mit inaktivem Ras-Protein, deletierten Grb oder Knock-out von IRS-1 führen konsequenterweise zur Termination der durch diese Kinase induzierten mitogenen Effekte, haben aber keinen Einfluß auf die durch Insulin vermittelten metabolischen Wirkungen (Sakaue et al. 1995, Waters et al. 1993, Lazar et al. 1995). Interessanterweise findet sich in der MAP-Kinase-Kaskade mit MEK eine Kinase mit dualer Aktivität (Anderson et al. 1990). Ihre Aktivierung führt zur Autophosphorylierung an Tyrosin, Serin und Threonin und katalysiert wiederum die Phosphorylierung der MAPK an Threonin und Tyrosin. Grb2 assoziiert nach Insulinstimulation auch mit Dynamin (Ando et al. 1994). Aufgrund der Beteiligung dieses Proteins an der EGFR-Endozytose (Wang et al. 1996) wird daher angenommen, daß Grb-Dynamin auch bei der Insulinrezeptor-Internalisation beteiligt ist.

Shc (src homology 2/ $\alpha$ -collagen related protein) ist ein Adapterprotein, welches in verschiedenen Isoformen vorliegen kann (Bork et al. 1995). Das Protein wird nach Insulinstimulation an Tyrosinresten phosphoryliert (Giorgetti et al. 1994) und ist ebenfalls in der Lage, den Grb-Sos-Komplex über einen Tyrosinrest zu binden (Sasaoka et al. 1996). Damit stehen für die Ras-Aktivierung zwei alternative Wege zur Verfügung. Die Überexpression von IRS-1 oder Shc zeigt, daß beide Proteine um den in der Zelle vorhandenen Grb2-Pool kompetieren. Der Grund hierfür ist zur Zeit noch nicht geklärt, hängt aber möglicherweise von einer gewebe- oder zellspezifischen Expression beider Proteine ab (Sasaoka et al. 1996).

Syp (Src homology-protein tyrosin phosphatase 2, SH-PTP2) ist eine cytoplasmatische Tyrosinphosphatase, die zwei SH2-Domänen enthält. Für dieses Protein wurde eine Bindung an den aktivierten Insulinrezeptor (Kharitonov et al. 1995), an IRS-1 (Khune et al. 1993) und IRS-2 (Patti et al. 1995) nachgewiesen. Daneben ist die Assoziation an andere Wachstumsfaktor-Rezeptoren bekannt (Freeman et al. 1992, Feng et al. 1993, Lechleider et al. 1993). Daneben bindet es an ein integrales

Membranprotein (SHPS-1), welches ein direktes Substrat für den Insulinrezeptor darstellen könnte (Yamao et al. 1997). Dabei wird ihre Möglichkeit, an verschiedenen Signalmolekülen zu binden, als ein Mittel angesehen, eine Phosphataseaktivität in verschiedenen Kompartimenten zu positionieren (White 1998). Die Funktion dieses Moleküls wird kontrovers diskutiert. Einerseits schreibt man ihm die Vermittlung von Signalen zu, da die Expression einer katalytisch inaktiven Mutante zur Inhibition der MAP-Kinase-Kaskade führt (Yamauchi et al. 1995, Noguchi et al. 1994, Sasaoka et al. 1994). Andererseits könnte das Enzym zur Dephosphorylierung von IRS-1 führen und damit zur Attenuation des Insulinsignales beitragen (Arrandale et al. 1996, Mendez et al. 1996).

## 2.7 Die Termination des Insulinrezeptor-Signals

Ebenso wie die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden durch den Insulinrezeptor ist deren Beendigung von entscheidender Bedeutung. Einen wichtigen Beitrag leisten hier Proteinphosphatasen, die spezifisch zur Dephosphorylierung einzelner Proteine führen. Proteinphosphatasen können generell in vier Klassen eingeteilt werden, wobei die Klasse der Proteintyrosinphosphatasen (PTP) zu den am besten charakterisierten zählt. Diese Enzyme sind an vielen Signalwegen, die zu Wachstum, Stoffwechsel oder Zelldifferenzierung führen, beteiligt (Maegawa et al. 1993). PTP besitzen eine 230 Aminosäure umfassende Domäne, welche die charakteristische Konsensussequenz (I/V)HCXAGXGR (S/T)G beinhaltet (Goldstein 1996). Die von ihnen vermittelte Dephosphorylierung von Tyrosinresten verläuft über einen katalytischen Cysteinrest (Guan und Dixon 1990) in einem Säure-katalysierten „*in line*“-Mechanismus. Die strukturelle Grundlage bildet dabei das Motiv C(x)<sub>5</sub>R, wobei ein dem Cystein benachbartes Histidin das Thiolatanion stabilisiert (Zhang et al. 1994). Die Reaktion erfolgt über den Angriff des Thiolatanions auf die trigonale pyramidale Struktur, die die Phosphatgruppe mit der Aminosäureseitenkette kennzeichnet. Dabei wirkt eine Asparaginsäure als katalytische Säure. Über einen pentakovalenten Übergangszustand kommt es dann zur Ausbildung eines Thiolphosphatintermediates. Nach dem Angriff von Wasser, der ebenfalls über einen trigonal bipyramidalen Zustand verläuft, werden anorganischem Phosphat und das Thiolatanion erhalten.

Die Beendigung des Insulinsignals durch den Einfluß von Proteinphosphatasen kann auf drei Ebenen erfolgen: (1) Auf Ebenen der Insulinrezeptorkinase durch Dephosphorylierung der für die Kinaseaktivität bedeutsamen Tyrosinreste der katalytischen Domäne (2) oder Dephosphorylierung von Tyrosinphosphorylierungsstellen, die für eine direkte Interaktion mit Signalmolekülen verantwortlich sind und (3) auf Ebene der Signalproteine durch Modulation ihres Phosphorylierungsstatus. Die molekularen Mechanismen und die beteiligten Phosphatasen, die die Attenuation vermitteln, sind allerdings noch nicht vollkommen analysiert bzw. identifiziert. Der Rezeptor wird nach Hormonbindung und Autophosphorylierung sehr schnell internalisiert und kann in tubulovesikulären Strukturen (Endosomen) im Cytosol nachgewiesen werden. Endosomen vermitteln die Sortierung und Prozessierung vieler Hormon-Rezeptorkomplexe und scheinen eine Rolle in der Signaltransduktion und Termination zu spielen (Baass et al. 1995, Bevan et al. 1996). Nach Aktivierung von Protonenpumpen und einer dadurch erreichten pH-Verschiebung im Endosom kommt es zu einer Dissoziation des Hormons vom Rezeptor, welches anschließend durch eine spezifische Insulinprotease degradiert wird (Authier et al. 1996). Kinetische Untersuchungen *in situ* und *in vitro* zeigen aber, daß der vom Hormon befreite Rezeptor weiterhin Tyrosinkinaseaktivität besitzt (Khan et al. 1986, Khan et al. 1989, Backer et al. 1989, Klein et al. 1987, Kublaoui et al. 1995, Whang et al. 1996). Dabei ist bemerkenswert, daß im Cytosol weiterhin die Interaktion mit IRS-1 oder der PI3-Kinase nachgewiesen werden kann (Bevan et al. 1995, Kelly et al. 1993). Demnach ist also nicht alleine die Dissoziation von Insulin für eine Beendigung des Rezeptorsignals entscheidend, vielmehr muß noch eine spezifische Dephosphorylierung erfolgen, die zur Beendigung des Hormonsignals führt. Aufgrund vieler *in vitro* Studien ist bekannt, daß die Dephosphorylierung der Tyrosine in der katalytischen Domäne zur Inaktivierung der Insulinrezeptorkinase führt (Kap 2.4). *In situ* Studien zeigen, daß diese Domäne ein sehr sensitives Ziel von Phosphatasen darstellt. Allerdings konnten noch keine Enzyme identifiziert werden, die diese spezifische Dephosphorylierung bewirken (Drake und Posner 1998). In der Diskussion stehen die Proteintyrosinphosphatasen Syp (SH-PTP2, Feng et al. 1993), LAR, LRP, PTP1B und RPTP- $\kappa$  (Goldstein et al. 1998). Dabei ist bemerkenswert, daß in Folge der

Dephosphorylierung des internalisierten Rezeptors kurzfristig eine erhöhte Tyrosinkinaseaktivität beobachtet wird (Wang et al. 1996, Burgess et al. 1992). Der Mechanismus, der zu dieser Aktivierung der Kinase führt, ist bislang nicht verstanden. Untersuchungen mit C-terminalen Deletionmutanten (Maegawa et al. 1988, Bernier et al. 1994, Tavare et al. 1992) oder Substitution der beiden Phosphorylierungsstellen Tyr<sup>1316</sup> und Tyr<sup>1322</sup> zeigen einen Anstieg sowohl in der Autophosphorylierung als auch in der exogenen Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors *in situ*. Demnach scheint eine PTPase-Aktivität zunächst die Dephosphorylierung dieser Phosphorylierungsstellen zu bewirken. Interessanterweise wurde von mehreren Arbeitsgruppen über eine intrinsische Phosphataseaktivität des Insulinrezeptors und seiner löslichen Kinase berichtet (Kole et al. 1988, Gruppuso et al. 1992, Al-Hasani et al. 1994, Cobb et al. 1989). Dabei wird in allen Fällen im Verlauf der Autophosphorylierungsreaktion über eine Dephosphorylierung des Enzyms berichtet, die nicht durch die Anwesenheit exogener Phosphatasen begründet werden kann. Während Cobb et al. (1989) diese Dephosphorylierung der Rückreaktion von ADP und Phosphoenzym zu Dephosphoenzym und ATP zuschreiben, konnten Gruppuso et al. (1992) eine Neusynthese von ATP nicht detektieren. Letztere Beobachtung wird durch Untersuchungen von Heidenreich (1995), Matthey (1993) und Al-Hasani (1995) unterstützt, die während der Autophosphorylierung die Freisetzung von anorganischem Phosphat nachweisen können. Dabei konnte im Reaktionsansatz weder eine exogene Phosphatase- noch eine ATPase-Aktivität nachgewiesen werden, vielmehr ist die Aktivität des Enzyms entscheidend und in einer intrinsischen Phosphataseaktivität begründet. In diesem Zusammenhang konnte Al-Hasani (1995) zeigen, daß diese intrinsische Phosphataseaktivität primär auf die beiden C-terminalen Tyrosinphosphorylierungsstellen einwirkt. Allerdings scheinen auch weitere Tyrosinreste in der katalytischen Domäne und in der Juxtamembrandomäne davon betroffen zu sein (Heidenreich 1995, Kayatz 1994, Magg 1995, Al-Hasani 1995). Möglicherweise kommt dieser intrinsischen Dephosphorylierungsaktivität eine Rolle in der Signalweiterleitung der Rezeptorkinase zu. Kole et al. (1988) berichten zudem, daß sich diese Dephosphorylierung nicht alleine auf die Insulinrezeptorkinase beschränkt, sie beobachten diese auch bei einem vorphosphorylierten Substrat. Auch für andere Rezeptor-Tyrosinkinase konnte eine solche intrinsische Phosphataseaktivität nachgewiesen werden (Beemelmans 1997, Magg 1997, Affüpper 1997), allerdings ist in allen Fällen eine mechanistische Grundlage für eine Erklärung zur Zeit nicht gegeben. Auf Ebene der Regulation von Signalproteinen finden sich zahlreiche Beispiele, die die Bedeutung von Proteinphosphatasen belegen, in vielen Fällen sind die dafür verantwortlichen Enzyme aber noch nicht bekannt. So bewirkt die Dephosphorylierung von Grb2 durch die PTPase LRP die Dissoziation des Grb2-Sos-Komplexes und terminiert somit die Signalweiterleitung durch die MAP-Kinase-Kaskade (den Hertog et al. 1994). Syp (SH-PTP2) wird die Fähigkeit zugesprochen, Tyrosinreste in IRS-1 zu dephosphorylieren (Kuhne et al. 1994, Ugi et al. 1994). Auch in der MAP-Kinase-Kaskade scheinen eine Vielzahl von PTPasen beteiligt, die zur Abschaltung dieses Signalweges führen (Hunter 1995). Raf wird *in vitro* durch die Proteinserinphosphatase PP1 dephosphoryliert, die Dephosphorylierung des Serinrestes in der Mek-Kinase oder des Threoninrestes der Map-Kinase durch PP2a führt zur Inaktivierung dieser Enzyme (Nakielny et al. 1992, Anderson et al. 1990). Neben der Beendigung einzelner Signalwege durch Proteindephosphorylierung finden sich in der Literatur einige Beispiele, die belegen, daß auch eine zusätzliche Serinphosphorylierung verschiedener Signalmoleküle eine Rolle in der Termination des Insulinrezeptorsignals spielen könnte. Diskutiert werden hierbei Mechanismen, die zu einer reduzierten Kinaseaktivität des Rezeptors, einer Verhinderung der Phosphorylierbarkeit bestimmter Phosphorylierungsstellen oder die Unterbindung von Protein-Protein-Interaktionen führen. Die Aktivierung des Insulinrezeptorsignalweges führt auf Rezeptorebene zu einer erhöhten Serinphosphorylierung der  $\beta$ -Untereinheit (s. Kap. 2.5). Dabei soll die Phosphorylierung des Serinrestes Ser<sup>994</sup> in der katalytischen Domäne zu einer Verminderung der Kinaseaktivität führen (Strack et al. 1997). Ferner scheint Serinphosphorylierung der beiden C-terminalen Serinreste Ser<sup>1275</sup> und Ser<sup>1309</sup> eine reduzierte Assoziation der SH2-Domäne der regulatorischen Untereinheit der PI3K zu bewirken (Pavaresch, unveröffentlicht). Auch für IRS-1 wurde eine erhöhte Serinphosphorylierung nach Insulinstimulation nachgewiesen (Tanti et al. 1994). Mothe und Van Oberghen (1996) zeigen in diesem Zusammenhang, daß die Phosphorylierung von vier Serinresten in der zentralen Domäne des Moleküls zu einer Reduktion der PI3K-Aktivität führt, die wahrscheinlich in einer Unterbindung der Protein-Protein-

Interaktion mit der SH2-Domäne der regulatorischen Untereinheit der PI3K begründet ist. Die verantwortliche Kinase ist aber noch nicht identifiziert. Tranissijevik et al. (1993) belegen eine Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten im IRS-1 durch die Caseinkinase II. Die Phosphorylierungsstellen liegen im N-terminalen Bereich des Moleküls und scheinen eine Interaktion der PH-Domäne mit dem Rezeptor zu unterbinden.

## 2.8 Die lösliche Insulinrezeptorkinase als Modellenzym

Aufgrund seiner molekularen Komplexität und einem aufwendigem Reinigungsverfahren aus Humanplazenta, bei geringer Ausbeute, sind der Analyse der strukturellen Organisation und katalytischen Aktivität des Insulinrezeptors Grenzen gesetzt. Die Klonierung der cDNA durch Ullrich et al. (1985) und Ebina et al. (1985) ermöglichte die Expression großer Mengen des intakten durch Mutagenese veränderten Rezeptors in Vertebratenzell-Linien und vereinfachte die Untersuchungen zum Mechanismus und der Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion erheblich. Die Möglichkeit,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit getrennt als funktionelle Moleküle im Baculovirus-Expressionssystem darzustellen, erlaubt in Verbindung mit Mutagenesetechniken eine detaillierte Untersuchung der Insulinbindung, der Kinaseaktivität und Protein-Protein-Interaktion.

Die sogenannte lösliche Insulinrezeptorkinase liegt nach der Reinigung als Monomer vor und enthält in ihrer unmodifizierten Form die cytoplasmatische Aminosäuresequenz des humanen Insulinrezeptors. Das Enzym zeigt konstitutive Phosphotransferaseaktivität (Ellis et al. 1988, Herrera et al. 1988, Cobb et al. 1989, Villalba et al. 1989). Die Reaktion ist, analog dem Insulinrezeptor, von der Gegenwart divalenter Kationen abhängig, das pH-Optimum liegt bei pH 7,5-8, das Temperaturoptimum bei 22-25°C. Die maximale Phosphatinkorporation liegt zwischen 3 und 6 mol Phosphat pro mol Enzym (Argetsinger und Schafer 1992, Kohanski, 1993a). Die Initialgeschwindigkeit der Autophosphorylierung kann durch Stimulation mit Polykationen (Poly(Lysin) oder Protamin) um den Faktor 10-20 gesteigert werden (Rosen und Lebwohl 1988). Verschiedene Autoren vermuten, daß ihre Anwesenheit Molekülaggregation stimuliert und damit die *trans*-Phosphorylierung zwischen den einzelnen Molekülen bewirkt (Kohanski 1993a, Yan et al. 1993). In Abwesenheit der Poly(Kationen) wird dagegen eine Konzentrationsunabhängigkeit in der Autophosphorylierung beobachtet, woraus andere Autoren einen *cis*-Autophosphorylierungsmechanismus ableiten (Kohanski 1993b, Herrera et al. 1988, Villalba et al. 1989). Allerdings scheint hiervon nur die Phosphorylierung des Juxtamembranbereiches betroffen (Cann und Kohanski 1997), die Besetzung der Tyrosine der katalytischen Domäne und des C-Terminus erfolgt in *trans*. Kinetisch betrachtet ähnelt die durch Polykationen stimulierte Reaktion der insulinstimulierten Autophosphorylierungsreaktion, allerdings ist die Initialgeschwindigkeit im Vergleich zum Insulinrezeptor deutlich erhöht (Heidenreich et al. 1994, Kohanski 1993a). Im Gegensatz dazu entspricht die nicht stimulierte Reaktion der basalen Kinaseaktivität des Rezeptors (Kohanski 1993a).

Die Analyse der Besetzung einzelner Tyrosinautophosphorylierungsstellen zeigt, daß alle für den Rezeptor beschriebenen Tyrosinreste zugänglich sind und phosphoryliert werden können (Al-Hasani et al. 1997, Cann und Kohanski 1997). Allerdings ergeben sich Unterschiede in der Verteilung der Phosphate in die einzelnen Positionen. Während im Insulinrezeptor nach Autophosphorylierung *in situ* die vollständige Besetzung der katalytischen Domäne nicht beobachtet werden kann, scheint in der löslichen Kinase die „tris-Form“ (alle Tyrosinreste in der katalytischen Domäne sind phosphoryliert) voll ausgeprägt (White 1998, Magg 1995, Al-Hasani 1995). Im Gegensatz dazu ist der Anteil der Phosphate in der Juxtamembrandomäne im Insulinrezeptor höher als im löslichen Enzym. Möglicherweise bewirkt die Abwesenheit der Transmembrandomäne oder der monomere Status des Moleküls diesen Effekt (Cann und Kohanski 1997, Al-Hasani 1995). Auch in der Reihenfolge der Besetzung der Tyrosinphosphorylierungsstellen der katalytischen Domäne ergeben sich im Vergleich zum Insulinrezeptor Unterschiede. Für den Insulinrezeptor wird die Phosphorylierung des Tyr<sup>1150</sup> und dann in Folge die Besetzung der Tyrosine Tyr<sup>1146</sup> und Tyr<sup>1151</sup> erhalten (s. Kap. 2.4). Im Gegensatz dazu ergibt sich für die lösliche Kinase die Reihenfolge Tyr<sup>1151</sup>, Tyr<sup>1150</sup> und Tyr<sup>1146</sup> (Nölle 1998).

In der Autophosphorylierungsreaktion der löslichen Kinase wird, in Analogie zum gereinigten Insulinrezeptor (Heidenreich et al. 1994), die Phosphatinkorporation in Serinreste beobachtet (Ellis et al. 1988, Al-Hasani 1995, Tavare et al. 1991, Tennagels 1995). Während Ellis et al. (1988) und Tavare et al. (1991) diese Serinphosphorylierung einer exogenen Serinkinase zuschreiben, belegen die Studien von Al-Hasani (1995), daß es sich bei dieser Phosphorylierung um eine intrinsische Eigenschaft des Enzyms handelt. Die Anwesenheit von Kinaseinhibitoren (Al Hasani 1995) oder die Inaktivierung der Kinase durch Mutation invarianter Aminosäurereste (Lys<sup>1018</sup>→Ala, Tennagels, 1995; Asp<sup>1120</sup>→Ala Kessler, 1998) führen zum Verlust der Phosphorylierung von Tyrosin und Serinresten und belegen die Abhängigkeit der Serinphosphorylierung von einer aktiven Kinase. Durch direkte Sequenzierung tryptischer Phosphopeptide konnten die Serinphosphorylierungsstellen Ser<sup>1275</sup> und Ser<sup>1309</sup> identifiziert werden (Al-Hasani et al. 1997). In der Substratphosphorylierung zeigen lösliche Kinasen im Vergleich zum gereinigten Insulinrezeptor vergleichbare kinetische Konstanten. Dabei ergeben sich keine anderen Spezifitäten in der Phosphorylierung von Modellsubstraten, synthetischer Peptide oder natürlichen Substraten, die sich aus Domänen des Insulinrezeptors oder Signalmolekülen wie IRS-1 ableiten. Generell verläuft der Phosphotransfer im Vergleich zum gereinigten Insulinrezeptor mit einer höheren Geschwindigkeit (Al-Hasani 1995, Herrera et al. 1988, Villalba et al. 1989, Cobb et al. 1989). Zusammengefaßt ist die lösliche Insulinrezeptorkinase, aufgrund ihrer vergleichbaren Eigenschaften zum Insulinrezeptor, ein hervorragendes Modellsystem, welches neue Wege im Bezug auf die Analyse der Rezeptorautophosphorylierung und Substratphosphorylierung ermöglicht. Die Bereitstellung großer Mengen an hochreinem Enzym mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystems, erlaubt in Verbindung mit ortsspezifischer Mutagenese vielfältige Möglichkeiten der biochemischen Charakterisierung und wird damit auch apparativ aufwendigen Analyseverfahren gerecht. Die <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopischen Untersuchungen der Kinasereaktion (Levine et al. 1991), CD-spektroskopische Untersuchungen (Villalba et al. 1989, Kessler 1998) oder die Aufklärung der Kristallstruktur der katalytischen Domäne (Hubbard et al. 1994, Hubbard 1997) sind dafür nur einige Beispiele.

## 2.9 Fragestellung der Arbeit

Ausgangspunkt für die Untersuchungen waren die beobachtete Serinkinaseaktivität des gereinigten humanen Insulinrezeptors *in vitro* (Heidenreich 1995). Die gleiche duale Aktivität wurde auch bei seiner im Baculovirus-Expressionssystem dargestellten löslichen Kinase beobachtet, die als Modellsystem von Al Hasani (1995) in unserem Labor etabliert werden konnte. Durch Phosphopeptidkartierung konnten von ihm die Serinreste Ser<sup>1275</sup> und Ser<sup>1309</sup> *in vitro* als Hauptserinautophosphorylierungsstellen identifiziert werden (Al Hasani et al. 1997).

- Die *in vitro* identifizierten Serinautophosphorylierungsstellen Ser<sup>1275</sup> und Ser<sup>1309</sup> sollten *in situ* nachgewiesen werden. Dazu sollten „*in situ*-labeling“-Experimente in Zusammenarbeit mit Dr. Maassen in Leiden durchgeführt und mit der im Labor etablierten Methode der Phosphopeptidkartierung identifiziert werden.
- Um große Proteinmengen für biochemische und physikalische Analysen der Auto- und Substratphosphorylierungsreaktion zu erhalten, sollte die lösliche Insulinrezeptorkinase IRKD im Baculovirus-Expressionssystem überexprimiert und gereinigt werden. Desweiteren sollten für die verschiedenen mechanistischen Fragestellungen Kinasevarianten mit Aminosäuresubstitutionen durch ortsspezifische Mutagenese generiert und ebenfalls in dem eukaryontischen Expressionssystem dargestellt werden.
- Mit der gereinigten löslichen Kinase und der verschiedenen Varianten sollten weitergehende Charakterisierungen der intrinsischen Serinkinaseaktivität durchgeführt werden.

Die beobachtete Serinphosphorylierung beschränkte sich nur auf die Autophosphorylierungsreaktion. Für die Charakterisierung der IRKD als eine Kinase mit dualer Spezifität ist aber unbedingt der Nachweis einer enzymkatalysierten Serinphosphorylierung in einem exogenen Substrat erforderlich.

- Für kinetische Untersuchungen der Substratphosphorylierungsreaktion sollten rekombinante Substrate in *E.coli* hergestellt, gereinigt und charakterisiert werden.
- Mit der gereinigten löslichen Kinase und der verschiedenen Varianten sollten Analysen ihrer Substratphosphorylierungsreaktionen erfolgen, um Bedingungen zu finden, die eine Serinphosphorylierung in Substraten erlauben.

Eine weitere Besonderheit des Insulinrezeptors und seiner löslichen Kinase war eine beobachtete intrinsische Phosphatase-Aktivität, die vor allem die C-terminalen Tyrosinphosphorylierungsstellen in der Autophosphorylierungsreaktion betreffen (Heidenreich 1995, Al Hasani et al. 1994). Bislang war unklar, ob diese Phosphataseaktivität auf die Autophosphorylierungsreaktion beschränkt ist und ob Verbindungen zwischen den beiden Mechanismen, intrinsische Serinkinaseaktivität und Phosphataseaktivität, bestehen.

- Mit der gereinigten löslichen Kinase und der verschiedenen Varianten sollten weitergehende Charakterisierungen der beobachteten Phosphataseaktivität in der Autophosphorylierungsreaktion durchgeführt werden.
- Ferner sollte die Frage geklärt werden, ob die Phosphataseaktivität auch in der Substratphosphorylierungsreaktion der Kinase zu beobachten ist.

### 3 Konstruktion, Expression und Reinigung der Insulinrezeptorkinase-Domäne

#### 3.1 Das Baculovirus-Expressionssystem

Baculoviren gehören zu der Gruppe der doppelsträngigen DNA-Viren. Jede Art befällt stammes- und wirtsspezifisch Insekten. Der am besten charakterisierte 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 stäbchenförmigen Proteinhülle verpackt, die zusätzlich mit einer Lipidmembran umgeben ist; bis zu 100 solcher Partikel bilden, in einer aus Polyhedrin bestehenden Proteinhülle, das Dauerstadium des Virus (Einschlußkörper; occlusion body). Die Einschlußkörper werden vom Wirt oral aufgenommen und gelangen so in den Verdauungstrakt des Insektes. Dort wird die Polyhedrinhülle abgedaut und die infektiösen Viruspartikel verschmelzen, nach Passieren der peritrophischen Membran, mit der Zellmembran ihrer 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 (10 h p.I.) verlassen vornehmlich stäbchenförmige Partikel durch Knospung die Zelle und infizieren Zellen in ihrer Umgebung; erst im weiteren Verlauf der Infektion kommt es zur Bildung der Einschlußkörper (48 Stunden p.I.). Diese Partikel schützen die eingeschlossenen vor der Inaktivierung. Die Lyse der Zellen setzt nach 72 Stunden ein, die Einschlußkörper werden mit dem Kot ausgeschieden und können bis zu mehreren Jahre außerhalb des Wirtes überdauern. Damit ist das Polyhedrin für den Lebenszyklus des Virus ein sehr wichtiges Protein, unter Zellkulturbedingungen ist es aber weder für die Infektiosität noch für die Replikation der Viren von Bedeutung (Summers und Smith 1987). Ein unter Kontrolle des Polyhedrin-Promoters in das virale Genom eingeschleustes Gen kann daher in hohen Konzentrationen in den Insektenzellen exprimiert und anschließend gereinigt werden (1 g/10<sup>9</sup> Zellen). Der weitere 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 homologe Rekombination eines die DNA enthaltenen speziellen Transfervektors mit linearisierter AcNPV-DNA. Dazu wird die DNA des zu exprimierenden Proteins in einen Transfektor kloniert, der homologe Sequenzen zur 5'- und 3'-Region des Polyhedrin-Gens enthält. Durch Kotransfektion von Vektor- und linearisierter AcNPV-DNA, die eine Letal-Deletion in der 3'- flankierenden Region des Polyhedrin-Gens besitzt, kommt es in vivo zu homologen Rekombinationsereignissen, aus denen nur intakte, Fremd-DNA tragende Viren hervorgehen. Die rekombinanten Viren werden mit dem „Plaque-assay“ isoliert und in eine weitere Infektion eingesetzt, bei der anschließend die Zellen auf Expression des Proteins immunologisch überprüft werden. Nach der sukzessiven Erhöhung der Virustiter während mehrerer Passagen in der Zellkultur können die so erhaltenen Viren für die Infektion großer Insektenzellkulturen verwendet werden.

#### 3.2 Konstruktion des Transfervektors pVL-IRKD

Der Transfektor pVL-IRKD enthält die Sequenz des cytoplasmatischen Bereiches des humanen Insulinrezeptors und kodiert für die Aminosäuren Arg<sup>941</sup>-Ser<sup>1343</sup> (Ullrich et al. 1985). Zusätzlich enthält die 403 Aminosäuren lange Proteinsequenz an Position eins das Initiator-Methionin der Proteinsynthese (Abb. 3.1). Grundlage für dessen Konstruktion war ein Klonierungsvektor, der ein 1599 Bp großes Fragment der cDNA des humanen Insulinrezeptors trägt (Position 2697-4345, pUCir-PstIA, Aretz 1994). Aus diesem wurde das 1378 Bp lange BglI-PstI-Fragment (Gly<sup>947</sup>-Ser<sup>1343</sup>) zusammen mit einem N-terminalen Linkerfragment, welches am 5'-Ende eine BamHI- und am 3'-Ende eine BglI-Schnittstelle trug und die fehlenden Aminosäuren Arg<sup>941</sup>-Asp<sup>946</sup> beinhaltete, in den BamHI-PstI-linearisierten bakteriellen Klonierungsvektor pUC19 ligiert (pUC-IRKD). Das 1407 Bp große BamHI-PstI-Fragment wurde anschließend in die Multiklonierungsstelle des Expressionsvektors pVL1393 ligiert (Tennagels 1995).

	↓ Arg <sup>941</sup>				
1:	mRKRQPDGPL	GL <b>Y</b> ASSNPE <b>Y</b>	LSASDVFP <b>C</b> S	V <b>Y</b> VPDEWEVS	REKITLLREL
51:	GQGSFGMVYE	GNARDIIK <b>G</b> E	AETRVAV <b>K</b> TV	NESASLRERI	EFLNEASVMK
101:	GFTCHHV <b>V</b> RL	LGVVSKGQ <b>P</b> T	LVV <b>M</b> ELMAHG	DLKSYLRSLR	PEAENNPGRP
151:	PPTLQEMI <b>Q</b> M	AAEIADGM <b>A</b> Y	LNAK <b>K</b> FVHRD	LAARN <b>C</b> MVAH	DFTVKIGDFG
201:	MTRDI <b>Y</b> ETD <b>Y</b>	<b>Y</b> RKGGKGL <b>L</b> P	VRW <b>M</b> APESLK	DGVFTTSS <b>D</b> M	WSFGVVLWEI
251:	TSLAEQPY <b>Q</b> G	LSNEQVL <b>K</b> FV	MDGGYLDQ <b>P</b> D	NCPERVTD <b>L</b> M	RMCWQFNPKM
301:	RPTFLEIV <b>N</b> L	LKDDLHPS <b>F</b> P	EVSFFH <b>S</b> EEN	KAP <b>E</b> SE <b>E</b> LEM	EFEDMEN <b>V</b> PL
351:	DRSSHCQ <b>R</b> EE	AGGRDGG <b>S</b> SL	G <b>F</b> KRS <b>Y</b> EE <b>H</b> I	P <b>Y</b> THMNGG <b>K</b> K	NGRILTL <b>P</b> RS
401:	NPS				
	↑ Ser <sup>1343</sup>				

**Abb. 3.1: Aminosäuresequenz der IRKD.** Das Initiator-Methionin der Proteinsynthese ist kleingedruckt. Fettgedruckt sind die Tyrosine, die als Autophosphorylierungsstellen im humanen Insulinrezeptor beschrieben wurden. Im Fett- und Kursivdruck ist das Lysin 1018 dargestellt, welches für die ATP-Bindung des Enzyms essentiell ist. Das Protein enthält 403 Aminosäuren und besitzt ein rechnerischen Molekulargewicht von 45,7 kDa. Sequenz nach Ullrich et al. (1985).

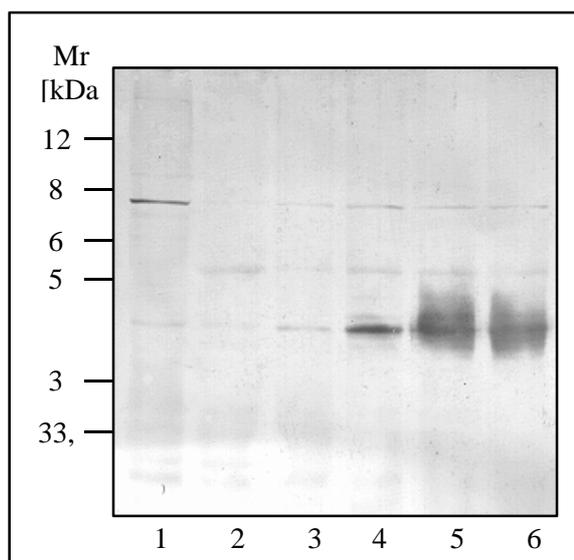
### 3.3 Herstellung und Isolierung rekombinanter Baculoviren

Der Transfervektor pVL-IRKD wurde zusammen mit der AcNPV-DNA in Sf9-Zellen kotransfiziert und rekombinante Virusklone nach 5 Tagen mit Hilfe des „Plaque-assays“ isoliert. Die Klone wurden zur Infektion von Sf9-Zellen verwendet und nach 3 Tagen geerntet. Die resultierenden Zell-Lysate wurden anschließend auf die Proteinexpression der löslichen Kinasemoleküle durch „Western-Blotting“ mit einem gegen den C-Terminus des Insulinrezeptors gerichteten Antikörpers untersucht. In diesen Analysen zeigte sich in positiven Klonen eine starke Kreuzreaktion mit einem etwa 50 kDa großen Protein, welches weder in nicht infizierten Kontrollzellen noch in mit AcNPV-Wildtyp infizierten Zellen nachgewiesen werden konnte. Der Virusklon mit dem stärksten immunologischen Signal (AcNPV-IRKD) wurde durch mehrere Schritte bis zu einem Virustiter von  $3 \times 10^8$  pfu/ml (Plaque forming units/ml) amplifiziert und für die nachfolgende Proteinexpression verwendet („working stock“).

### 3.4 Zeitverlauf der Proteinexpression der löslichen Insulinrezeptorkinase

Um den Zeitpunkt der maximalen Proteinexpression zu ermitteln, wurden Sf9-Zellen mit dem „working stock“ infiziert und zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion (p.I.) die erhaltenen Zell-Lysate immunologisch durch Western-Blot-Analyse mit einem gegen den C-Terminus des Insulinrezeptors gerichteten Antikörper auf das Vorhandensein der Rezeptorkinase untersucht. Der Versuch wurde in einer 200 ml Suspensionskultur durchgeführt, um Anhaltspunkte für die spätere Proteinexpression im präparativen Maßstab zu erhalten. Der Zeitverlauf der Proteinexpression ist für die IRKD in Abbildung 3.2 dargestellt.

Die Expression der IRKD kann deutlich 36 Stunden nach Infektion nachgewiesen werden. (Abb. 3.2, Bahn 4). Die Kreuzreaktion des Antikörpers mit einem Zellprotein im gleichen Molekulargewichtsbereich (Bahn 1) macht eine frühere Bestimmung nicht möglich. Das Expressionsmaximum wird nach 48 Stunden erreicht, bleibt aber darüber hinaus noch weitere 24 Stunden konstant. Nach etwa 80 Stunden kommt es zur viral bedingten Lyse der Zellen, was die Freisetzung der Kinase in das Medium zur Folge hat. Um eine hohe Ausbeute an intaktem Protein zu erhalten, wurden infizierte Zellen daher nach 72 Stunden geerntet.

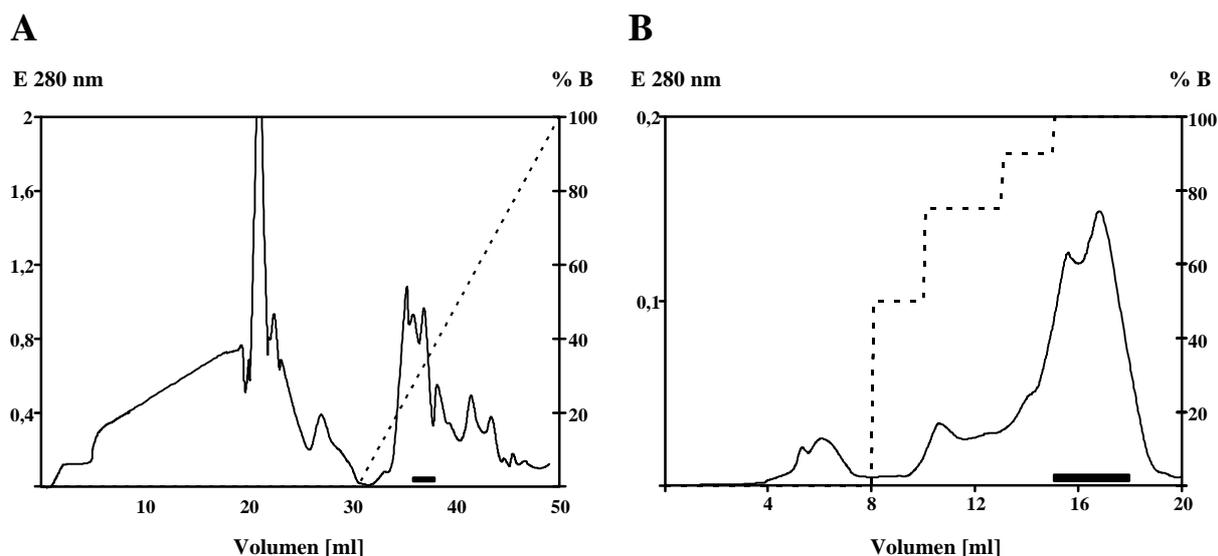


**Abb. 3.2: Zeitabhängige Proteinexpression der IRKD.** Eine 200 ml Suspensionskultur ( $2 \times 10^8$  Zellen) wurde mit rekombinanten Baculoviren (*multiplicity of infection*  $\geq 25$ ) infiziert. Jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen wurden zu den angegebenen Zeiten geerntet, in SDS-Probenpuffer lysiert und immunologisch durch Western-Blot-Analyse mit einem gegen den C-Terminus des Insulinrezeptors gerichteten Antikörper auf Proteinexpression untersucht. Aufgetragen wurden jeweils  $1,5 \times 10^5$  Zellen pro Bahn. Die Zeitpunkt der Zell-Ernte ist in Stunden angegeben. 1: nicht infizierte Zellen 72 h, 2: AcNPV-infizierte Zellen (Wildtyp) 72 h; mit AcNPV-IRKD infizierte Zellen: 3: 24 h, 4: 36 h, 5: 48 h, 6: 72 h nach Infektion. Western-Blot nach 12 % SDS-PAGE, immunologischer Nachweis durch  $\alpha$ -Gst-CT-Antikörper.

### 3.5 Reinigung der löslichen Insulinrezeptorkinase IRKD

Die Reinigung der Rezeptorkinase erfolgte in Anlehnung an Villalba et al. (1989) und Al-Hasani (1995). Dabei werden zwei aufeinanderfolgende chromatographische Verfahren, Anionenaustausch- und hydrophobe Interaktionschromatographie, angewandt. Hierbei werden die intrinsischen Eigenschaften des Moleküls, Ladung und Hydrophobizität ausgenutzt. Als zusätzlicher Reinigungsschritt kann eine Gelfiltration durchgeführt werden. Das Ausgangsmaterial für die Reinigung ist die lösliche cytosolische Zellfraktion, die nach dem Zellaufschluß durch Sonifikation, Homogenisation im Elvehjem-Potter, anschließendem Abtrennen unlöslicher Zellbestandteile durch niedertourige Zentrifugation und nachfolgender Ultrazentrifugation erhalten wird.

Die Kinase bindet bei neutralem pH-Wert an Anionenaustauscher mit stark positiv geladenen quartären Ammoniumgruppen wie MonoQ oder ResourceQ und kann anschließend selektiv durch Anlegen eines NaCl-Gradienten eluiert werden. In Verbindung mit der Mitteldruck-Flüssigkeitschromatographie (FPLC) erweist sich diese Trennmethode als äußerst effektiv, da sich Vorteile wie kurze Trennzeit und hohe Trennschärfe ergeben. Die Kinase eluiert bei einer NaCl-Konzentration von 0,2 mM von der Säule (Abb 3.3 A). Im Durchschnitt wurde in diesem Reinigungsschritt etwa ein Gesamtproteingehalt von 1,6 mg in 3 ml Eluat erreicht. Bezogen auf den Proteingehalt des Zellysats beträgt die Ausbeute 11 %. Die Reinheit der vereinigten Überstände nach Coomassie-Färbung ist in Abbildung 3.1 dokumentiert. Unter Berücksichtigung der angewandten Färbetechnik ergibt sich nach diesem Reinigungsschritt ein Reinheitsgrad von ca. 40 %. Die nachfolgende hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) erlaubt die Trennung von Proteinen aufgrund unterschiedlicher Hydrophobizität. Die Bindung der Proteine an das Säulenmaterial durch hydrophobe Wechselwirkungen wird durch Erhöhung der Ionenstärke im Lösungsmittel verstärkt. Die IRKD bindet an Phenyl-Sepharose vollständig nach 20 %iger Sättigung der MonoQ-Fraktion mit Ammoniumsulfat. Eine vor dem Probenauftrag durchgeführte Zentrifugation führt zur Entfernung einiger Proteine, die unter diesen Bedingungen bereits präzipitieren, die Kinase selbst bleibt jedoch gelöst. Damit wird ein eine zusätzliche Erhöhung des Reinigungsfaktors erreicht (Al-Hasani, 1995, Villalba et al. 1989).



**Abb. 3.3: Exemplarische Darstellung der UV-Profile aus der IRKD-Reinigung.** Die kinaseaktiven Fraktionen sind durch Balken gekennzeichnet. **A:** Anionenaustauschchromatographie mit MonoQ. Aufgetragen wurden 10 ml (15 mg Gesamtprotein) cytosolischer Überstand. Die vereinigten, kinaseaktiven Fraktionen wurden nach einer Ammoniumsulfatfällung für die hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) eingesetzt. **B:** HIC mit Phenyl-Sepharose. Die kinaseaktiven Fraktionen wurden vereinigt und im Centricon 30 eingengt.

Die Elution erfolgt durch Erniedrigung der Ionenstärke des Lösungsmittels, wodurch die Proteine in der Reihenfolge ihrer steigenden Hydrophobizität die Säule verlassen. Wie aus Abbildung 3.3 B ersichtlich, eluiert die Kinase erst bei niedrigen Ionenstärke (50 mM Tris/HCl, pH 7,5) von der Säule. Die die Kinasen enthaltenen Fraktionen wurden anschließend vereinigt und in einem Centricon 30 auf eine Konzentration von 0,45 - 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  eingestellt. Die Gesamtausbeute bei diesem Reinigungsschritt liegt bei ca. 70 %, die vereinigten Fraktionen enthalten die Kinase, unter Berücksichtigung der verwendeten Färbetechnik zu mehr als 95 % (Abb. 3.1). Der Reinigungsverlauf ist in Tabelle 3.1 und Abbildung 3.1 dokumentiert.

Fraktion	Protein [mg]	Volumen [ml]	Phosphateinbau [pmol/mg]	spez. Akt. für Poly(Glu:Tyr) [nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> ]	Reinigungsfaktor
Cytosolischer Überstand	15	10	n.b.	11	1
Mono Q	1,6	3	34091	49	4,5
Phenyl-Sepharose	0,4	0,7	101111	148	13,5

**Tab. 3.1:** Die Daten beziehen sich auf die Reinigung der IRKD aus  $10^8$  Zellen. Der spezifische Phosphateinbau und die Substratphosphorylierung von Poly(Glu:Tyr) wurden unter Standardbedingungen durchgeführt (1 mg/ml Poly(Glu:Tyr), 250  $\mu\text{M}$  ATP, 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin)) und durch die Phosphozellulose-Methode analysiert.

### 3.6 Konstruktion, Expression und Reinigung abgewandelter Kinasekonstrukte

#### 3.6.1 Konstruktion der Transfervektoren pVL-IRKD-K1018A, pVL-IRKD-Y1316/22F, pVL-IRKD-Y1316/22T

Der bakterielle Klonierungsvektor pUC-IRKD diente zur Generierung einer Vielzahl von Expressionsvektoren, die eine veränderte Basenabfolge und daraus resultierende Punktmutationen im Molekül aufweisen (Gerold 1995, Behle 1997, Koenen und Fried, persönliche Mitteilung, Nölle 1996). Bereits im Rahmen der Diplomarbeit wurde ein Transfervektor für eine lösliche Insulinrezeptor-Kinase hergestellt, in dem das Lysin<sup>1018</sup> gegen Alanin ersetzt wurde (Tennagels 1995). Der Austausch dieser invarianten Aminosäure verhindert die ATP-Bindung und führt zur Inaktivierung der Kinase und zu einem Verlust der biologischen Aktivität (Chou et al. 1987, Ebina et al. 1987, Mc Clain et al. 1987). Zusätzlich wurden für diese Arbeit zwei Transfervektoren konstruiert, in denen die kodierenden Sequenzen für die C-terminalen Tyrosinphosphorylierungsstellen Tyr<sup>1316</sup> und Tyr<sup>1322</sup> gegen Phenylalanin bzw. Threonin ersetzt wurden. Die Funktion dieser C-terminalen Phosphorylierungsstellen ist nicht völlig geklärt. Die Inkorporation von Phosphat in diese Domäne beträgt sowohl im humanen Insulinrezeptor (Tornqvist et al. 1987; Tavare und Denton 1988; White et al. 1988; Lee et al. 1993) als auch in der löslichen Insulinrezeptorkinase (Al-Hasani 1995) bis zu 40 % der Gesamtphosphorylierung. Der Austausch der Tyrosine Tyr<sup>1316</sup> und Tyr<sup>1322</sup> gegen Phenylalanin oder die Deletion der C-terminalen Domäne führt auf Rezeptorebene *in vitro* zu einer normalen Kinaseaktivität, *in vivo* allerdings zu verstärkten mitogenen und reduzierten metabolischen Effekten (Maegawa et al. 1988; Takata et al. 1991; Ando et al. 1992). Myers et al. (1991) konnte, unter der Verwendung anderer Zell-Linien, keinen Unterschied in der biologischen Aktivität des verkürzten bzw. mutierten Rezeptors feststellen. Die Frage welchen Einfluß der Austausch der Tyrosinphosphorylierungsstellen sowohl auf die katalytischen Eigenschaften als auch auf die Autophosphorylierung hat, sollte mit diesen Mutanten untersucht werden. Für die ortsspezifische Mutagenese wurde das Verfahren von Deng und Nickoloff (1992) angewandt. Das Prinzip basiert auf einer Polymerase-reaktion mit zwei Oligonukleotid-Primern an einen Strang eines denaturierten Plasmids. Der eine Primer führt dabei die gewünschte Mutation in die klonierte cDNA ein (Mutageneseprimer) und schafft gleichzeitig in einer stillen Mutation eine neue, für das Plasmid einmalige Restriktionsschnittstelle. Diese dient zur späteren Identifizierung von Klonen mit einer erfolgreichen Mutagenese, führt aber auf Proteinebene zu keiner Veränderung. Der zweite Primer verändert eine einmalig vorkommende Restriktionsschnittstelle in der Sequenz der Plasmid-DNA, so daß diese nicht mehr vom betreffenden Restriktionsenzym erkannt werden kann (Selektionsprimer). Nach der DNA-Elongation, Ligation und einer ersten Selektion mit einer Restriktionsendonuklease werden Plasmide erhalten, die in einem Strang die Mutationen aufweisen. Die Replikation in dem *E.coli*-Stamm BMH *mutS*, der einen Defekt im Basenfehlpaarungs-Reparatur-Mechanismus (mismatch repair) aufweist, ergibt einen Plasmid-Pool mit mutierten und nicht mutierten Plasmiden, der einem zweiten selektiven Restriktionsverdau unterzogen wird. Mutierte Plasmide, denen die Schnittstelle für das Restriktionsenzym fehlt, bleiben zirkulär, nicht mutierte Plasmide linearisieren und werden bei der folgenden Transformation des gesamten Ansatzes in *E.coli* DH5 $\alpha$ -Zellen um den Faktor 10<sup>9</sup> schlechter aufgenommen. Die erhaltenen Klone werden von einer Agarplatte einzeln isoliert und als 5 ml Suspensionskultur für 12 Stunden kultiviert. Der anschließenden Präparation von Plasmid-DNA folgt die Identifizierung von Klonen mit der gewünschten Mutation durch Restriktionsanalyse auf die neue, durch den Mutageneseprimer eingeführte Restriktionsschnittstelle. Die Effizienz dieses Mutagenese-Verfahrens liegt zwischen 70 und 90 %.

Für die Generierung des Transfervektors pVL-IRKD-K1018A wurde ein 29 Bp langer Mutationsprimer verwendet, der der cDNA-Sequenz des kodogenen Stranges des humanen Insulinrezeptors 3043-3072 entspricht. Durch den Austausch der Nukleotide A (Pos. 3052) und A (Pos. 3053) gegen G und C wird eine Änderung der Aminosäuresequenz von Lysin nach Alanin erreicht. Durch einen zusätzlichen Austausch des Nukleotids C (Pos. 3060) gegen T wird zusätzlich in einer stillen Mutation eine Restriktionsschnittstelle für die Restriktionsendonuklease HpaI erzeugt, die für den beschriebenen Klonierungsvektor pUC-IRKD einmalig ist (Tennagels 1995).

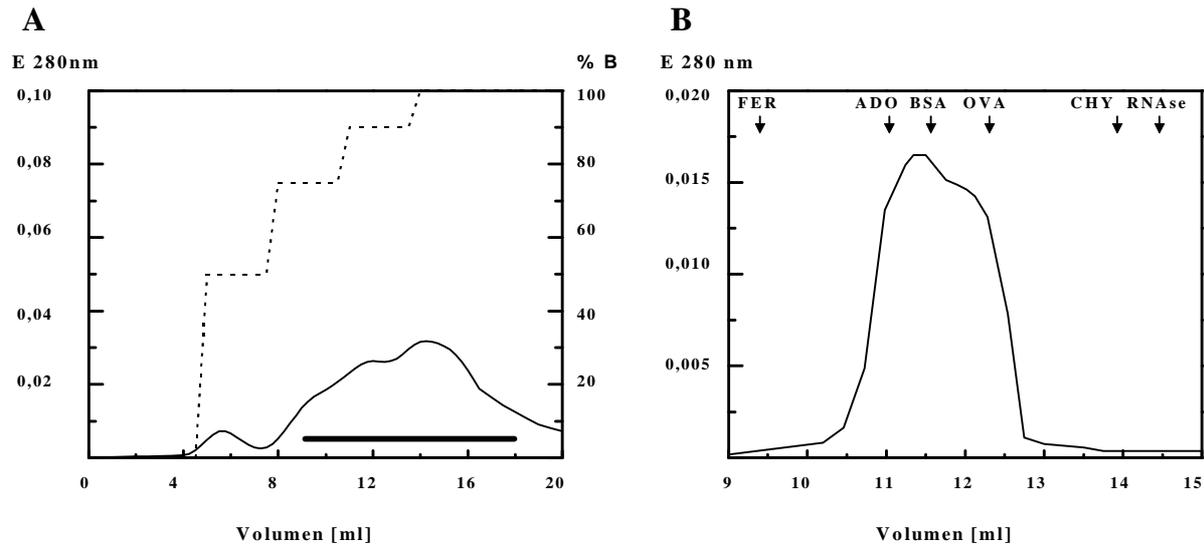
Für die Generierung der Transfervektoren pVL-IRKD-Y1316/22F und pVL-IRKD-Y1316/22T wurden zwei 40 Bp lange Oligonukleotide verwendet, die der cDNA Position des kodogenen Stranges des humanen Insulinrezeptors von 4065 - 4105 entsprechen. Durch den Austausch eines oder mehrerer Nukleotide (Tyr<sup>1316</sup> → Phe: A (Position 4077) → T, Tyr<sup>1322</sup> → F: A (Position 4096) → T; Tyr<sup>1316</sup> → Thr: T (Position 4076) und A (Position 4077) gegen A und C, Tyr<sup>1322</sup> → T: (Position 4095) und A (Position 4096) gegen A und C) wird eine Änderung der Aminosäuresequenz von Tyrosin nach Phenylalanin bzw. Threonin erreicht. Ferner wird durch den Austausch des Nukleotides C (Position 4091) gegen T in einer stillen Mutation eine weitere Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease XmnI erzeugt. Für dieses Enzym sind im 4075 Bp großen Ausgangsvektor bereits zwei Schnittstellen vorhanden (Fragmentlänge nach Spaltung: 1121, 2954 Bp), die zusätzliche Schnittstelle erzeugt daher in der Restriktionsanalyse eines mutierten Plasmids ein weiteres DNA-Fragment, welches im Agarosegel eindeutig identifiziert werden kann (Fragmentlängen nach Spaltung: 1121, 835, 2119 Bp). Nach Durchführung der Mutagenesereaktion wurde die Plasmid-DNA der erhaltenen Klone hinsichtlich ihrer neuen Restriktionsschnittstelle überprüft und die Einführung der Mutationen durch DNA-Sequenzierung nach Sanger (1977) verifiziert.

Die sequenzierte DNA der Klone wurde im Fall der K1018A-Mutante mit den Restriktionsenzymen XhoI und BstXI oder im Fall der IRKD-Y1316/22F und pVL-IRKD-Y1316/22T mit BstXI und PstI jeweils aus dem pUC19 Vektor isoliert und in einen XhoI/BstXI bzw. BstXI/PstI linearisierten pUC-IRKD subkloniert. Diese Vorgehensweise ist erforderlich, da durch die Verwendung der reparaturdefekten Bakterien in dem Mutagenese-Protokoll sich die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass weitere, spontan auftretende Mutationen amplifiziert werden. Aus diesen Vektoren wurden anschließend die BamHI/PstI Fragmente, die für die IRKD-K1018A, IRKD-Y1316/22F bzw. IRKD-Y1316/22T kodieren, isoliert und in den BamHI/PstI linearisierten Transfervektor pVL1393 subkloniert.

### **3.6.2 Expression und Reinigung der Kinasekonstrukte IRKD-K1018A, IRKD-Y1316/22F und IRKD-Y1316/22T**

Die jeweiligen Transfervektoren pVL-IRKD-K1018A, pVL-IRKD-Y1316/22F, pVL-IRKD-Y1316/22T wurden zusammen mit der AcNPV-DNA in einer Kotransfektion mit Sf9-Zellen verwendet. In Analogie zur IRKD-Expression wurden rekombinante Viruskclone durch „Western Blotting“ identifiziert, der Virustiters bis zum „working stock“ amplifiziert und anschließend die Proteinexpression für 72 Stunden durchgeführt. Für die Expression der löslichen Insulinrezeptor-kinase IRKD-HIS und IRKD-Y960/1316/22F wurden „working stocks“ verwendet, die mir freundlicherweise von Dr. Al-Hasani und Frau C. Fried zur Verfügung gestellt wurden.

Die Reinigung der jeweiligen Kinasekonstrukte erfolgte in Analogie zur Reinigung der IRKD durch Anionenaustausch- (IEX) und hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC). In allen Fällen eluierten die Enzyme bei denselben Ionenstärken von den Säulen, die Reinigungseffizienz war vergleichbar. Eine Ausnahme bildete das Kinase-Konstrukt IRKD-Y1316/22T. Während die Anionenaustauschchromatographie mit derselben Güte durchgeführt werden konnte, erwies sich die nachfolgende Reinigung durch HIC als ungeeignet. Die Kinase eluierte bereits bei sehr hohen Ionenstärken von der Säule, was die Ausbeute an Protein in Puffer niedriger Ionenstärke wesentlich verminderte (Abb. 3.4 A). Um die Ausbeute zu erhöhen, wurden die Fraktionen aus der Anionenaustauschchromatographie, die die Kinase zu einem hohen Anteil enthielten, vereinigt und einer Gelfiltration zugeführt. Die Gelfiltration beruht auf der Annahme, dass die Proteine eine ideale globuläre Form annehmen. Daher verteilen sie sich zwischen der Gelmatrix und dem Lösungsmittel entsprechend ihrem Stokes'schen Radius. Allerdings verhielt sich das Enzym auch in diesem Reinigungsschritt auffällig. Während die nichtphosphorylierte IRKD und die IRKD-Y1316/22F von der Gelfiltrations-säule in einem distinkten Peak eluieren (Abb. 3.2), verläßt die IRKD-Y1316/22T die Säule in einem nicht aufgelösten Doppelpeak (Abb. 3.4 B). Unter der Berücksichtigung der für die Eichproteine ermittelten Verteilungskoeffizienten  $K_{av}$  ergab sich ein apparentes Molekulargewicht, welches in einem Bereich von ca. 100 - 60 kDa liegt. Dies steht im Gegensatz zu dem ermittelten apparenten Molekulargewicht für die nichtphosphorylierte IRKD oder der IRKD-Y1316/22F von 60 kDa.

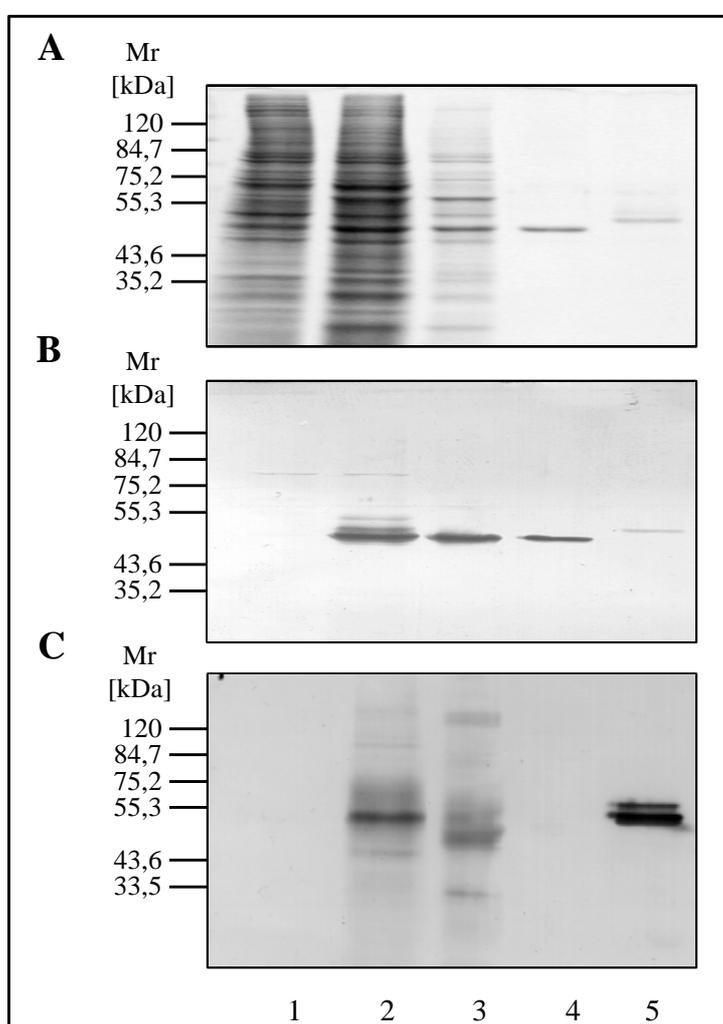


**Abb. 3.4: Darstellung der UV-Profile aus der IRKD-Y1316/22T Reinigung. A:** HIC mit Phenyl-Sepharose. Aufgetragen wurden 3 ml (2 mg Gesamtprotein) der vereinigten, kinaseaktiven Fraktionen, die nach Anionenaustauschchromatographie (IEX) und Ammoniumsulfatfällung erhalten wurden. Die die Kinase enthaltenden Fraktionen sind durch den Balken gekennzeichnet. **B:** Die die Kinase enthaltenden Fraktionen aus der IEX wurden vereinigt und eine Gelfiltration mit Superose 12 durchgeführt. Eingezeichnet sind die entsprechenden Absorptionsmaxima der Eichproteine: FER: Ferritin 440 kDa, ADO: Aldolase 158 kDa, BSA: Rinderserumalbumin 67 kDa, OVA: Ovalbumin 43 kDa, CHY: Chymotrypsin 25 kDa, RNase: Ribonuklease A 13,7 kDa. Kinaseaktive Fraktionen wurden vereinigt und im Centicon 30 eingengt.

#### 4 Charakterisierung der gereinigten IRKD

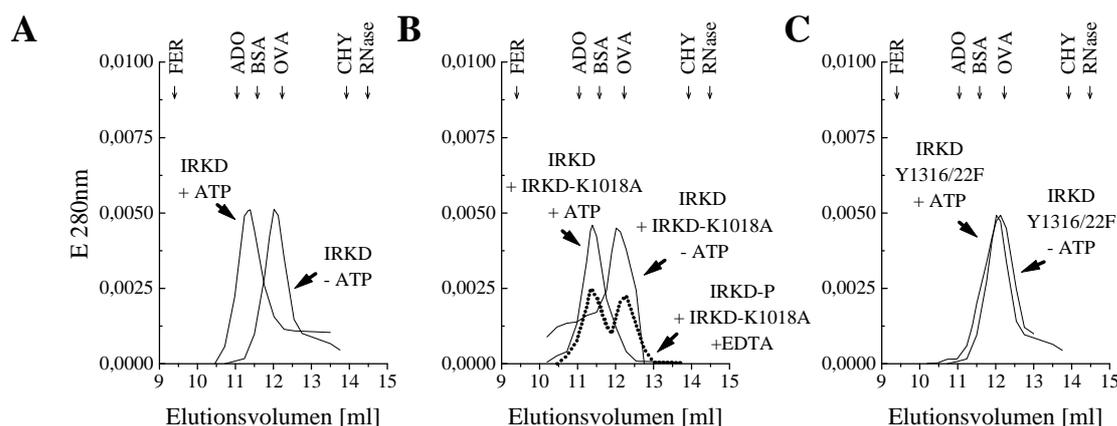
##### 4.1 Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes und des Phosphorylierungsstatus des Enzyms

Zur Dokumentation des Reinigungsverlaufs der IRKD und des Phosphorylierungsstatus des Enzyms wurden Aliquots der einzelnen Reinigungsschritte durch SDS-Page analysiert und anschließend die Kinase durch Western-Blot-Analyse mit einem gegen den C-Terminus des Insulinrezeptors gerichteten Antikörper und einem  $\alpha$ -Phosphotyrosin-Antikörper immunologisch nachgewiesen (Abb. 4.1). Als Kontrolle dienten ein Zell-Lysat nicht infizierter Zellen und die gereinigte, unter Standardbedingungen phosphorylierte IRKD. Die IRKD zeigt in der SDS-PAGE unter reduzierenden (0,1 M DTT) als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen (Daten nicht gezeigt) ein apparentes Molekulargewicht von 48 kDa. Damit stimmen das berechnete (45,7 kDa) mit dem beobachteten Molekulargewicht nahezu überein.



**Abb. 4.1: Reinigungsverlauf der IRKD.** **A:** M: Protein-Molekulargewichtsmarker (Broad Range), 1: Cytosolischer Überstand nicht infizierter Zellen, 2: Cytosolischer Überstand infizierter Zellen (72 h p.I.), 3: IEX Fraktion, 4: Phenyl-Sepharose-Fraktion ohne Autophosphorylierungsreaktion 5: Phenyl-Sepharose-Fraktion nach Autophosphorylierungsreaktion (10 min, 1  $\mu$ M IRKD, 250  $\mu$ M ATP, 1  $\mu$ M Poly(Lysin), 5 mM  $MnCl_2$ , 5 mM  $MgCl_2$ , 50 mM Tris/HCl, pH 7,5), 12 % SDS-PAGE, Proteinfärbung nach Blakesley und Boezi (1977). **B:** Western-Blot, immunologischer Nachweis durch  $\alpha$ -GST-CT-Antikörper. **C:** Western-Blot, immunologischer Nachweis durch  $\alpha$ -Phosphotyrosin-Antikörper.

Abweichende Ergebnisse werden bei der Analyse des phosphorylierten Enzym gefunden. In der SDS-PAGE erhöht sich das apparente Molekulargewicht um 5 kDa, wobei bis zu drei Phosphoprotein-Banden unterschieden werden können. Die Erhöhung ist wahrscheinlich auf eine verminderte SDS-Bindung zurückzuführen. Im Western Blot mit  $\alpha$ -Phosphotyrosin-Antikörper wird deutlich, daß die Verschiebung des apparenten Molekulargewichtes auf die Phosphorylierung zurückgeführt werden kann. Interessanterweise zeigt das Enzym eine starke Kreuzreaktion mit dem Antikörper im rohen Zell-Lysat infizierter Zellen. Dieses ist ein Ausdruck seiner konstitutiven Kinaseaktivität. Nach Homogenisierung und Ultrazentrifugation ist deutlich die Abnahme des Phosphorylierungsgrades zu erkennen, das gereinigte Enzym zeigt keine Kreuzreaktion mit dem Antikörper. Offensichtlich führt die Aufarbeitung zur Dephosphorylierung des Enzyms durch zelleigene Phosphatasen (Abb. 4.1 C). Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes ist die Gelfiltrationsanalyse, bei der das Molekulargewicht des entsprechenden Proteins durch den Vergleich der Retentionszeiten von Markerproteinen mit bekanntem Molekulargewicht erhalten wird. Für die Analyse wurden 10  $\mu$ g Enzym auf eine FPLC-Gelfiltrationssäule (Superose 12) aufgetragen und die Elution photometrisch bei 280 nm verfolgt. Für das Molekulargewicht ergibt sich anhand des Verteilungskoeffizienten  $K_{av}$  ein apparentes Molekulargewicht von etwa 60 kDa für das nicht phosphorylierte Enzym (Abb. 4.2 A). Damit zeigt sich ein Unterschied zu dem durch SDS-PAGE ermittelten Molekulargewicht, welcher in der Tertiärstruktur des nativen Proteins begründet sein könnte. In der SDS-PAGE wird angenommen, daß die spezifische Bindung des Detergenz an die Eichproteine und an das zu analysierende Protein gleich ist. Damit wird die Eigenladung des Proteins vernachlässigbar und die Wanderungsstrecke nur noch abhängig von der Größe des Polypeptids. Ausnahmen bilden dabei Glyko- oder Phosphoproteine, die weniger SDS binden als nichtmodifizierte Proteine. Im Gegensatz dazu wird bei der Bestimmung des Molekulargewichts durch Gelfiltration die Annahme gemacht, daß die Proteine eine ideale globuläre Form einnehmen und sich entsprechend ihrem Stokes'schen Radius zwischen Gelmatrix und Lösungsmittel verteilen. Eine Änderung oder Abweichung der idealen globulären Struktur kann daher zu Unterschieden bei der Molekulargewichtsbestimmung durch SDS-PAGE und Gelfiltration führen. Interessanterweise werden andere Verhältnisse gefunden, wenn das phosphorylierte Enzym für die Gelfiltration verwendet wird. Das Phosphoenzym eluiert zwischen den Eichproteinen Aldolase (158 kDa) und BSA (67 kDa). Gegenüber den 60 kDa des nicht phosphorylierten Enzyms ergibt sich ein apparentes  $M_r$  von 100 kDa. Für dieses Verhalten könnte eine Dimerisierung der phosphorylierten Kinase oder eine Konformationsänderung ursächlich sein. Dieselbe Veränderung im apparenten Molekulargewicht konnte auch dann beobachtet werden, wenn die IRKD zusammen mit der kinaseinaktiven Mutante IRKD-K1018A als Substrat in einem 1:1 Verhältnis in einer Phosphorylierungsreaktion eingesetzt und der Ansatz auf der Gelfiltrationssäule aufgetragen wurde (Abb. 4.2 B). Im Gegensatz zur Kontrollreaktion, in der für die IRKD-K1018A und der IRKD ein Molekulargewicht von 60 kDa bestimmt wurde, ergab sich nach der Phosphorylierungsreaktion nur ein distinkter Peak im höheren Molekulargewichtsbereich. Diese Beobachtung führte zu einem Experiment, in dem das aktive Enzym für 10 Minuten vorphosphoryliert und nach Abstoppen der Reaktion durch 20 mM EDTA das inaktive Enzym äquimolar zugesetzt wurde. Die Analyse durch Gelfiltration in Gegenwart von EDTA im Laufpuffer zeigte hier das Auftreten eines Doppelpeaks. Demzufolge scheint die Phosphorylierung der kinaseinaktiven Mutante zu einer gleichartigen Molekulargewichtsveränderung wie bei dem aktiven Enzym zu führen. Ferner zeigt das Experiment, daß die Möglichkeit einer Dimerisierung des phosphorylierten Enzyms mit der nichtphosphorylierten IRKD-K1018A auszuschließen ist. Demnach ist die Phosphorylierung entweder Voraussetzung für eine Dimerisierung beider Moleküle oder sie induziert eine Konformationsänderung, die sowohl im aktiven als auch im inaktiven Enzym vergleichbar ist. Für eine Konformationsänderung in Folge der Phosphorylierung spricht die Beobachtung, daß nach Phosphorylierung der C-terminalen Mutante IRKD-Y1316/22F in der Gelfiltrationsanalyse keine Veränderung des apparenten Molekulargewichtes beobachtet wird (Abb. 4.2 C). Die Kinase eluiert sowohl in ihrer nicht phosphorylierten als auch in ihrer phosphorylierten Form bei einem Molekulargewicht von 60 kDa von der Säule. Daher kann angenommen werden, daß die Phosphorylierung der beiden C-terminalen Tyrosinphosphorylierungsstellen die Ursache für das veränderte Laufverhalten der IRKD zu sein scheint.



**Abb. 4.2: UV-Profil nach Gelfiltration mit Superose 12.** Eingezeichnet sind die Absorptionsmaxima der Eichproteine: FER: Ferritin (440 kDa), ADO: Aldolase (158 kDa), BSA: Rinderserumalbumin (67 kDa), OVA: Ovalbumin (43 kDa), CHY: Chymotrypsin (25 kDa), RNase: Ribonuklease A (13,7 kDa). **A:** Vergleich der UV-Profile, die ohne bzw. nach Autophosphorylierungsreaktion der IRKD erhalten wurden. Eingesetzt wurden jeweils 10 µg Enzym (IRKD: nicht phosphoryliert, IRKD-P: phosphoryliert). **B:** Vergleich der UV-Profile von IRKD und IRKD-K1018A. Beide Proteine wurden in einem 1:1 Verhältnis eingesetzt (5 µg : 5 µg). IRKD + IRKD-K1018A -ATP: nicht phosphoryliert, IRKD + IRKD-K1018A +ATP: phosphoryliert, IRKD-P + IRKD-K1018A + EDTA: 5 µg IRKD wurden für 10 Minuten vorphosphoryliert, die Reaktion durch Zugabe von 20 mM EDTA beendet und nach Zugabe der kinaseinaktiven Variante die Gelfiltration in Anwesenheit von 50 mM EDTA durchgeführt. **C:** Vergleich der UV-Profile, die ohne bzw. nach Autophosphorylierungsreaktion der IRKD-Y1316/22F erhalten wurden. Eingesetzt wurden jeweils 10 µg Enzym (IRKD-Y1316/22F: nicht phosphoryliert, IRKD-Y1316/22F-P: phosphoryliert).

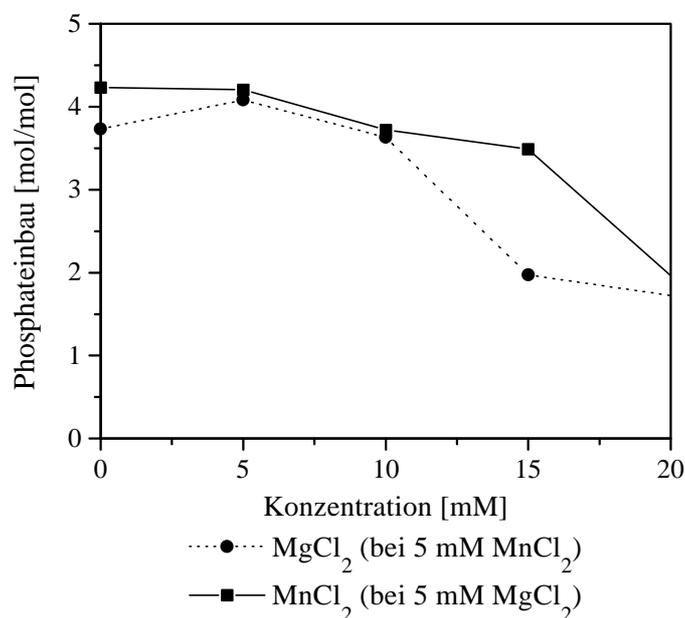
## 4.2 Bedingungen für die Autophosphorylierungsreaktion der IRKD

Die lösliche Insulinrezeptorkinase ist im Gegensatz zum Insulinrezeptor ein konstitutiv aktives Enzym. Unter Berücksichtigung dieser Eigenschaft sollten in den folgenden Versuchen die Bedingungen gefunden werden, unter denen die Kinase ihre maximale Phosphotransferaseaktivität in der Autophosphorylierung erreicht. Dabei wurden der Einfluß der zweiwertigen Metallionen  $Mg^{2+}$  und  $Mn^{2+}$ , der ATP-Konzentration, der Temperatur, des pH-Wertes, die Anwesenheit des Polykation Poly(Lysin), des stark positiv geladenen Histon2B und die Konzentrationsabhängigkeit auf die Autophosphorylierung der Kinase untersucht.

### 4.2.1 Ionenabhängigkeit der Autophosphorylierungsreaktion

Tyrosinkinasen zeigen eine Präferenz für das zweiwertige Metallkation Mangan gegenüber Magnesium (Swarup et al. 1984). Diese Beobachtung scheint sowohl auf die IRKD-HIS wie auch den Insulinrezeptor zuzutreffen, bei denen die Mangan-Abhängigkeit in der Autophosphorylierung eine Optimumskurve zeigt. Allerdings kann die maximale Phosphotransferaseaktivität des Insulinrezeptors als auch des löslichen Enzyms durch die gleichzeitige Anwesenheit von  $MgCl_2$  gesteigert werden. Für den Insulinrezeptor wurden optimale Bedingungen bei 0,5 mM  $MnCl_2$  und 10 mM  $MgCl_2$  gefunden, während die IRKD-HIS ihre maximale Transferaseaktivität bei 5 mM  $MnCl_2$  und 5 mM  $MgCl_2$  erreicht (Schmidt 1991, Al-Hasani 1995). Zur Ermittlung des optimalen Ionenverhältnisses für die Autophosphorylierung wurde die Kinase in Anwesenheit unterschiedlichen Ionenkonzentrationen des einen Metallions bei einer konstanten Ionenkonzentration des anderen Metallions inkubiert, die Reaktion nach 20 Minuten durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet und die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Lokalisation der radioaktiv markierten Proteine durch Autoradiographie wurde der Phosphateinbau in das Enzym durch Messung der Cerenkov-Strahlung der Gelbanden ermittelt.

Abbildung 4.3 zeigt die Abhängigkeit der Autophosphorylierungsreaktion von dem verwendeten Ionenverhältnis. Analog zu den in der Literatur beschriebenen Werten zeigt das Enzym maximale Aktivität, wenn  $\text{Mg}^{2+}$ - und  $\text{Mn}^{2+}$ -Ionen in einem Konzentrationsverhältnis von 5 mM zueinander vorliegen. Höhere Konzentrationen des jeweils anderen Kations führen zu einer Hemmung der Reaktion.



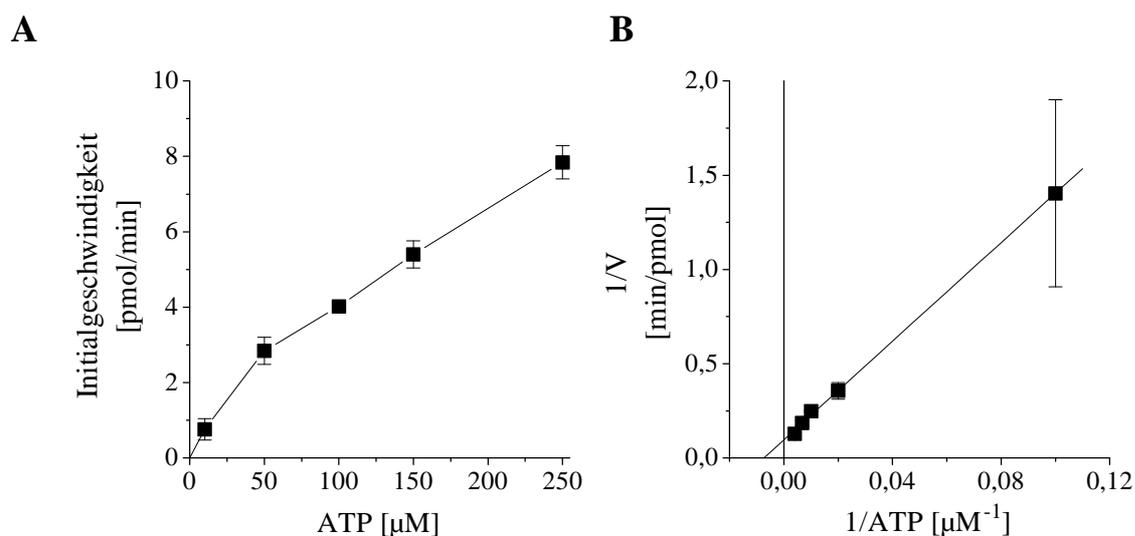
**Abb. 4.3: Abhängigkeit der Autophosphorylierungsreaktion vom eingesetzten Ionenverhältnis.** Die Reaktionsansätze enthielten jeweils 5 mM des einen Metallanions und variierende Konzentrationen des anderen Metallanions, 250  $\mu\text{M}$   $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin) und 1  $\mu\text{M}$  IRKD. Die Reaktionen wurden durch Zugabe des Enzyms gestartet und nach 20 Minuten durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Nach SDS-PAGE wurden die IRKD-Banden durch Autoradiographie lokalisiert und die Radioaktivität durch Messung der Cerenkov-Strahlung bestimmt.

#### 4.2.2 ATP-Abhängigkeit der Autophosphorylierungsreaktion

Die Autophosphorylierungsreaktion der IRKD folgt formal der Gleichung:



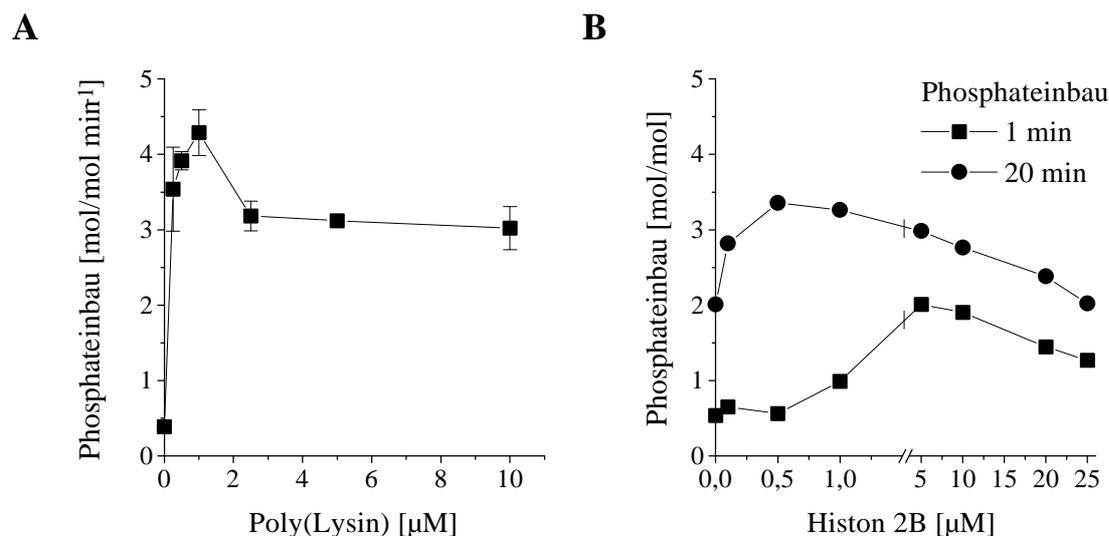
Zur Ermittlung der kinetischen Konstanten für ATP wurden die Initialgeschwindigkeiten des Phosphateinbaus in Abhängigkeit der ATP-Konzentration bestimmt. Dazu wurden Autophosphorylierungen in Gegenwart von Poly(Lysin) mit variierenden ATP-Konzentrationen durchgeführt und der Phosphateinbau in das Enzym durch Cerenkov-Zählung der erhaltenen Gelbanden nach einer SDS-PAGE ermittelt (Abb. 4.4). Der apparente  $K_m$ -Wert kann mit  $135 \pm 28 \mu\text{M}$  angegeben werden, für  $V_{\max}$ -Wert werden  $230 \pm 23 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  erhalten. Damit errechnet sich für die Kinase eine Wechselzahl von  $10 \text{ min}^{-1}$  ( $k_{\text{cat}}$ ). Die erhaltenen Werte stimmen in der Größenordnung mit früher berichteten Werten für die lösliche Rezeptorkinase überein (Cobb et al. 1989, Wei et al, 1995)



**Abb. 4.4: Phosphateinbau in der Autophosphorylierungsreaktion der IRKD in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration.** **A:** Initialgeschwindigkeiten der Phosphatinkorporation in die IRKD. Die Ansätze enthielten 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP und 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin). Die Reaktionen wurden durch Zugabe des Enzyms gestartet und durch Zugabe von SDS-Probenpuffer nach 0,5 oder 1 Minute beendet. Nach SDS-PAGE wurde die Radioaktivität der Banden durch Messung der Cerenkov-Strahlung bestimmt. **B:** Lineweaver-Burk Auftragung.

#### 4.2.3 Aktivierung der Autophosphorylierung durch Poly(Lysin) und Histon 2b

Die Phosphotransferaseaktivität der löslichen Insulinrezeptorkinase und des Insulinrezeptors kann durch Polykationen, wie Poly(Lysin) oder Protamin, gesteigert werden (Rosen und Lebowitz 1988, Kohanski 1989, Li et al. 1992, Al Hasani 1995). Allerdings ist der zugrunde liegende Wirkungsmechanismus nicht geklärt. Während Rosen und Lebowitz den stimulatorischen Einfluß auf eine regulatorische Kationenbindungsstelle zurückführen, wird von anderen Autoren eine Förderung der Molekülaggregation postuliert, die zu einer intermolekularen Phosphorylierung (*trans*-Phosphorylierung) führt (Kohanski 1989, Li et al. 1992, Yan et al. 1993). Um die maximale Aktivierung der IRKD zu ermitteln, wurde die Initialgeschwindigkeit der Autophosphorylierung in Abhängigkeit der Poly(Lysin)-Konzentration bestimmt. Dazu wurden Autophosphorylierungsreaktionen in Anwesenheit variierender Poly(Lysin)-Konzentrationen durchgeführt (Abb. 4.5 A). Die Reaktionsansätze enthielten 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP und 1  $\mu\text{M}$  IRKD. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Kinase gestartet und nach 0,5 und 1 Minute durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Nach SDS-PAGE wurde die Radioaktivität durch Messung der Cerenkov-Strahlung in den Proteinbanden bestimmt. Abbildung 4.5 A zeigt, daß stöchiometrische Konzentrationen des Polykations zu der Kinase im Vergleich zu der nicht stimulierten Reaktion eine 11fache Beschleunigung der initialen Phosphorylierungsgeschwindigkeit des Enzyms bewirken. Allerdings hat der äquimolare Einsatz des Polykations nur einen geringen Einfluß auf den maximal erreichbaren Phosphorylierungsgrad der Kinase. Das Enzym inkorporierte ohne Poly(Lysin)-Stimulierung etwa 1,5 - 2 mol Phosphat pro mol Enzym, bei Stimulierung wurden spezifische Phosphateinbauraten von 4 - 4,5 mol/mol Enzym ermittelt (Abb. 4.3 A, B). Die Möglichkeit, die initiale Phosphorylierungsgeschwindigkeit der Autophosphorylierung durch ein positiv geladenes Molekül zu stimulieren, konnte auch für das 14 kDa große Histon 2b (H2b), ein Protein aus dem Kälberthymus, demonstriert werden. In Analogie zum obigen Experiment wurden variierende Konzentrationen des H2b in der Autophosphorylierungsreaktion eingesetzt und die Initialgeschwindigkeiten bestimmt (Abb. 4.5 B). Das Experiment zeigt, das eine 4fache Steigerung der Initialgeschwindigkeit erreicht wird, wenn H2b in einem Konzentrationsbereich von 5 - 10  $\mu\text{M}$  eingesetzt wird. Daraus resultiert ein maximaler Phosphateinbau von 3,3 mol/mol nach 20 Minuten Reaktionszeit.



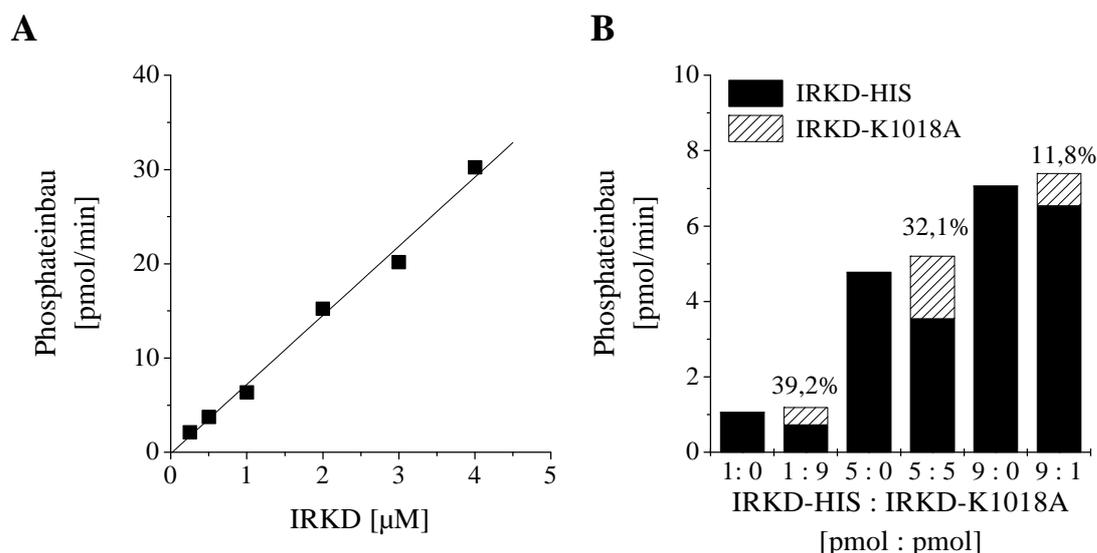
**Abb. 4.5: Initialgeschwindigkeit der Phosphatinkorporation der IRKD in Abhängigkeit von der Poly(Lysin)- und H2b-Konzentration.** Die Reaktionen wurden durch Zugabe des Enzyms gestartet und nach 1 bzw. 1 und 20 Minuten durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Anschließend erfolgte eine SDS-PAGE und die Bestimmung der inkorporierten Radioaktivität in den Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung.

#### 4.2.4 Konzentrationsabhängigkeit der Autophosphorylierung

Die Abhängigkeit der Initialgeschwindigkeit der Autophosphorylierung von der Enzymkonzentration kann einen Hinweis auf den Aktivierungsmechanismus der monomeren löslichen Kinase liefern. Verläuft der Phosphateinbau konzentrationsunabhängig und damit linear, kann dies als eine intramolekulare Phosphorylierung der einzelnen oder als intermolekulare Phosphorylierung zwischen bereits dimerisierten Enzymmolekülen gewertet werden. Im Gegensatz dazu würde ein exponentieller Anstieg des Phosphateinbaus in Abhängigkeit der Enzymkonzentration auf einen intermolekularen Phosphorylierungsmechanismus hindeuten, d.h. erst hohe Enzymkonzentrationen führen zur Dimerisierung und damit Aktivierung des Enzyms. Dieser Umstand wird in der Literatur für die lösliche Insulinrezeptorkinase widersprüchlich diskutiert. Während Cobb et al. (1989) eine Konzentrationsabhängigkeit der Autophosphorylierung beobachteten und daher einen *trans*-Phosphorylierungsmechanismus postulierten, konnten andere dieses Ergebnis nicht bestätigen (Villalba et al. 1989, Kohanski 1993, Al Hasani 1995). Auch die IRKD zeigt keinen exponentiellen Anstieg der Phosphatinkorporation in Abhängigkeit der Enzymkonzentration (Abb. 4.6 A). Dazu wurde die Initialgeschwindigkeit in Abwesenheit von Poly(Lysin) mit variierenden Kinasekonzentrationen im Reaktionsansatz untersucht. Der Phosphateinbau läuft im Konzentrationsbereich von 0,25 bis 4 µM in Abwesenheit von Poly(Lysin) nahezu linear. Das Enzym inkorporierte dabei im Mittel 0,7 mol Phosphat pro mol Molekül nach einer Reaktionszeit von 1 Minute.

Der lineare Verlauf deutet demnach auf eine intramolekulare Phosphorylierung. Allerdings besteht auch die Möglichkeit, daß eine Phosphorylierung zwischen bereits bestehenden Dimeren stattfinden könnte. Zur weiteren Untersuchung wurden daher Substratphosphorylierungen der aktiven Kinase IRKD-HIS und der kinaseinaktiven Mutante IRKD-K1018A in variierenden Verhältnissen analysiert (Abb. 4.6 B). Aufgrund der N-terminalen Histidin-Affinitätsmarkierung der IRKD-HIS unterscheiden sich die beiden Moleküle in der denaturierenden SDS-PAGE in ihren Molekulargewichten um etwa 5 kDa. Durch diese strukturelle Eigenschaft ist es möglich, beide in einer Phosphorylierungsreaktion zu kombinieren, sie durch Elektrophorese voneinander zu trennen und separat zu analysieren. Für die folgende Untersuchung wurden die beiden Proteine im Verhältnis 9:1, 1:1 und 1:9 in einer Autophosphorylierung in Abwesenheit von Poly(Lysin) eingesetzt und anschließend der Phosphateinbau in dem jeweiligen Molekül nach der SDS-PAGE analysiert (Abb. 4.6 B). Die Summe der Phosphat-

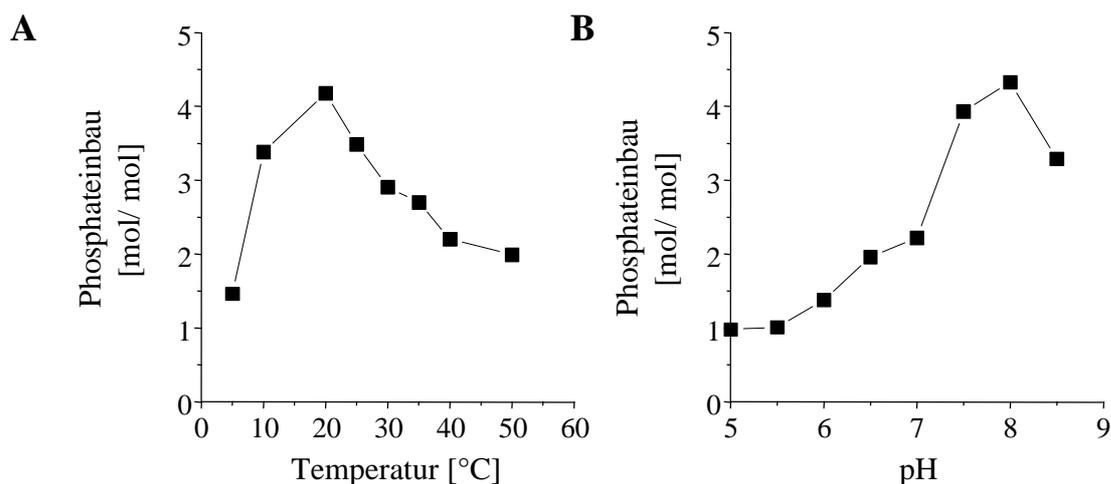
inkorporation in beide Moleküle, IRKD-HIS und IRKD-K1018A, ist gemessen an den Kontrollreaktionen ohne Substrat nahezu identisch. Dabei ergibt sich, daß die Verteilung der Phosphate in den einzelnen Molekülen bei den Konzentrationsverhältnissen 1:9 und 5:5 in etwa korreliert, was indirekt auf einen stöchiometrischen Komplex zwischen inaktiven und aktiven Molekül hindeuten könnte. Im 9:1 Ansatz werden etwa 10% der Phosphate in dem inaktiven Molekül wiedergefunden, im 1:1 Verhältnis ergeben sich 32 %. Wird die kinaseinaktive Variante dagegen im Überschuß angeboten, so entspricht der Einbau von 34% nicht dem gegebenen Verhältnis von 1:9. Allerdings ist auch hier die Gesamtphosphatinkorporation verglichen mit der Kontrollreaktion nahezu identisch.



**Abb. 4.6: A: Konzentrationsabhängigkeit der Initialgeschwindigkeit der IRKD-Autophosphorylierung.** Die Reaktionsansätze enthielten  $250 \mu\text{M}$   $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  und  $1 \text{ mg/ml}$  BSA als Stützprotein. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Kinase gestartet und nach 1 Minute durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE wurde die Radioaktivität durch Messung der Cerenkov-Strahlung bestimmt. **B: Untersuchung der Initialgeschwindigkeit der Auto- und Substratphosphorylierung bei variierenden Konzentrationsverhältnissen von IRKD und IRKD-K1018A.** IRKD und IRKD-K1018A wurden in den Konzentrationsverhältnissen 1:9, 5:5 und 9:1 pmol phosphoryliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der aktiven Kinase gestartet und nach 0,5 Minuten durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Nach Auftrennung der Proteinen durch SDS-PAGE und Lokalisation der Proteinbanden durch Autoradiographie wurde die Radioaktivität durch Messung der Cerenkov-Strahlung bestimmt.

#### 4.2.5 pH- und Temperaturoptimum der Autophosphorylierung

Um das pH- und Temperatur-Optimum der Autophosphorylierung zu ermitteln, wurden Autophosphorylierungen bei unterschiedlichen pH-Werten und Temperaturen durchgeführt. Die Ansätze enthielten 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP und jeweils 1  $\mu\text{M}$  IRKD. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Kinase gestartet und die Reaktion nach einer Reaktionszeit von 20 Minuten durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Nach SDS-PAGE und Lokalisation der IRKD-Banden durch Autoradiographie wurde der Phosphateinbau in die Kinase bestimmt. Für das Temperatur-Optimum wurde ein Wert von 20°C ermittelt (Abb. 4.7 A), der maximale Phosphateinbau bei unterschiedlichen pH-Werten wurde bei pH 7,5 - 8 erreicht (Abb. 4.7 B).



**Abb. 4.7: Abhängigkeit der maximalen Phosphatinkorporation der IRKD von der Temperatur (A) und dem pH Wert (B).** **A:** Für die Untersuchung der Temperaturabhängigkeit wurden die Ansätze vor der Reaktion für 15 min bei der jeweiligen Temperatur inkubiert und durch Zugabe der Kinase gestartet. Nach 20 Minuten wurden Aliquots entnommen, die Reaktionen durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet und durch SDS-PAGE aufgetrennt. **B:** Zur Bestimmung des pH-Optimums der Reaktion wurden die Reaktionen bei unterschiedlichen pH-Werten in einem Drei-Komponenten-Puffersystem für 20 Minuten durchgeführt. Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von SDS-Probenpuffer und SDS-PAGE wurde die Radioaktivität der Protein-Banden durch Messung der Cerenkov-Strahlung ermittelt.

## 5 Die Duale Aktivität der Insulinrezeptorkinase

Sowohl für den Insulinrezeptor (IR) als auch die lösliche Insulinrezeptorkinase IRKD-HIS wurde *in vitro* neben der Tyrosin- eine Serinkinaseaktivität beschrieben (Lewis et al. 1990, Baltensperger et al. 1992, Heidenreich 1995, Al-Hasani 1995, Tauer et al. 1997), die die folgenden Eigenschaften aufweist:

- Das Ausmaß der Serinphosphorylierung beträgt ca. 25 % der insgesamt inkorporierten Radioaktivität nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten.
- Die Stöchiometrie der Serinphosphorylierung ist unabhängig vom Reinheitsgrad der IR-Präparation.
- Die Serinphosphorylierung ist ebenso wie die Tyrosinphosphorylierung abhängig von einer Insulinstimulation. Die Serinphosphorylierung und Tyrosinphosphorylierung der löslichen Kinase werden gleichermaßen durch Polykationen wie Poly(Lysin) stimuliert.
- Die Serinphosphorylierung ist sowohl beim IR als auch der löslichen Kinase zeitlich der Tyrosinphosphorylierung nachgeschaltet.
- Die Serinphosphorylierung ist abhängig von der Kinaseaktivität des IR.

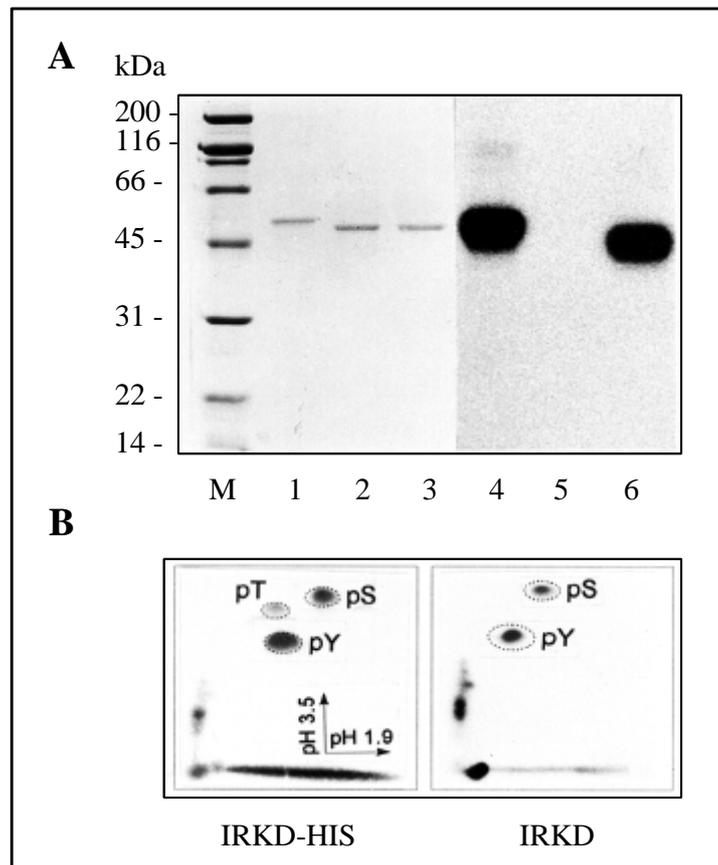
Diese Eigenschaften deuten entweder auf eine den Kinasen assoziierte Serinkinase, wie es von anderen Gruppen postuliert wird (Zick et al. 1983, Ballotti et al. 1986, Smith et al. 1988, Biener und Zick, 1990, Tavare und Dickens 1991, Pillay und Siddle 1991, Asamoah et al. 1995) oder auf eine der Insulinrezeptorkinase immanente Eigenschaft. Letzterer Befund wird durch die Identifizierung zweier Serinauto-phosphorylierungsstellen im C-Terminus der Kinase hinreichend unterstützt (Al-Hasani et al. 1997). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Serinkinaseaktivität der löslichen Insulinrezeptorkinase IRKD und abgewandelter Formen dieses Enzyms untersucht, um einen Einblick in den Katalysemechanismus einer Kinase mit dualer Spezifität zu erhalten.

### 5.1 Methoden zum Nachweis von Phosphoaminosäuren

Zur Markierung von Phosphoaminosäuren in Enzymen oder in deren Substraten wird im allgemeinen  $[\gamma^{32}]$ -ATP verwendet. Nach Abschluß der Reaktion wird der überschüssige radioaktive Marker durch SDS-PAGE oder Gelfiltration entfernt und danach eine Partialhydrolyse aufgrund der Säurestabilität der O-Phosphoesterbindung unter sauren Bedingungen durchgeführt (Ringer 1991). Der Nachweis und die Quantifizierung der radioaktiv markierten Verbindungen kann entweder dünnschichtchromatographisch oder elektrophoretisch erfolgen, wobei es, abhängig von der angewandten Methode, zu quantitativen Abweichungen bis zu 5 % kommen kann. In der Dünnschichtchromatographie besitzt Phosphotyrosin die größte Mobilität. Die Phosphoaminosäuren Phosphoserin und Phosphothreonin können dagegen aufgrund gleicher Retardationsfaktoren (Rf-Wert) nicht getrennt werden (Munoz und Marshall 1990). Allerdings kann die Quantifizierung der radioaktiven Signale im Bereich der Phosphoaminosäuren durch eine relativ starke Hintergrundstrahlung beeinträchtigt werden, welche durch die Migration nicht hydrolysierter Peptide mit der Lösungsmittelfront bedingt ist. Eine genauere Quantifizierung erlauben die elektrophoretischen Methoden (Ein- und zweidimensionale Elektrophorese), in denen die Auftrennung der Phosphoaminosäuren aufgrund der unterschiedlichen Ladungen erfolgt. Anorganisches Phosphat zeigt die höchste Mobilität, gefolgt von Phosphoserin, Phosphothreonin und Phosphotyrosin (Boyle et al. 1991). Die Identifizierung der radioaktiv markierten Phosphoaminosäuren erfolgt nach Auftrennung über den Vergleich der relativen Mobilitäten mit ninhydringefärbten Phosphoaminosäurestandards. Mit den hier angewandten Phosphoaminosäureanalysen kann aber nur eine apparente Zusammensetzung ermittelt werden. Eine absolute Quantifizierung des Phosphoaminosäure-Gehalts ist nicht möglich, da das Protein unter den Bedingungen der sauren Hydrolyse (6 N HCl, 110°C, 1,5 h) nur zu etwa 25 % in Aminosäuren gespalten wird. Eine Erhöhung der Ausbeute durch eine längere Hydrolysezeit ist nicht möglich, da die Phosphatester-Bindungen von Phosphotyrosin und Phosphoserin unterschiedliche Stabilitäten besitzen (Duclos et al. 1991). Eine längere Hydrolysezeit würde die Ausbeute von Phosphotyrosin und anorganischem Phosphat gegenüber Phosphoserin selektiv begünstigen.

## 5.2 Die Duale Aktivität der Insulinrezeptorkinase in der Autophosphorylierung

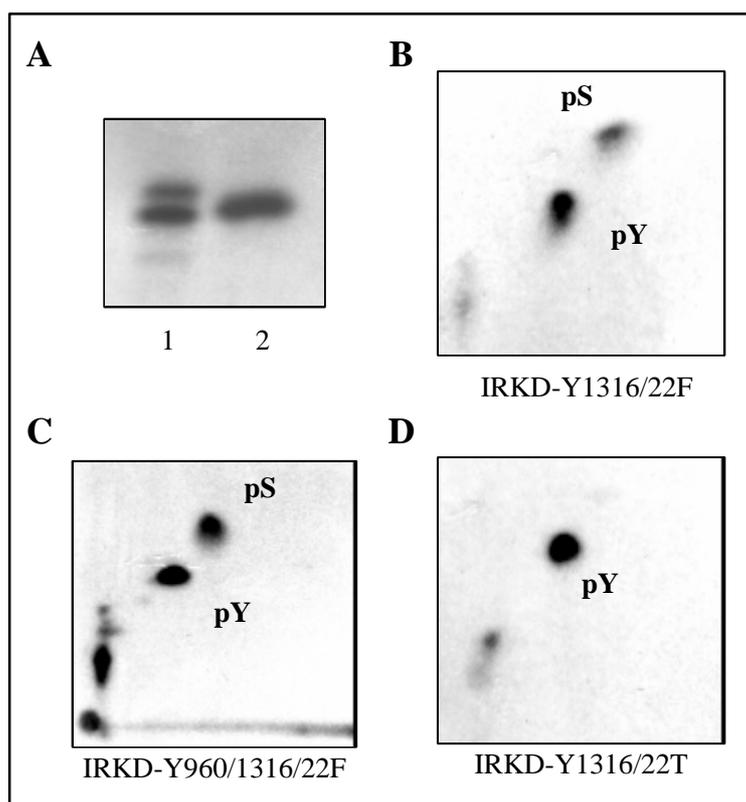
Die Serinphosphorylierung ist abhängig von der Kinaseaktivität. Die gleichzeitige Anwesenheit von Inhibitoren wie AMP-PNP, EDTA oder Staurosporin in der Autophosphorylierungsreaktion des Insulinrezeptors oder der löslichen Kinase IRKD-HIS führen in gleichem Maße sowohl zur Inhibition der Tyrosin- als auch der Serinphosphorylierung (Heidenreich 1995, Al-Hasani 1995). Zur Bestätigung der Abhängigkeit der Serinphosphorylierung von der Kinaseaktivität wurde die Kinasevariante IRKD-K1018A konstruiert, in welcher die Aminosäure Lysin 1018 durch Alanin substituiert ist. Der Austausch dieser invarianten Aminosäure im Glycin-reichen Loop (s. Einleitung) verhindert beim Insulinrezeptor die ATP-Bindung und führt zur Inaktivierung der Kinase und somit zu einem Verlust der biologischen Aktivität (Chou et al. 1987, Ebina et al. 1987, Mc Clain et al. 1987). Die IRKD-K1018A kann mittels Anionenaustausch- und hydrophober Interaktionschromatographie mit denselben Reinigungsdaten wie die aktive IRKD oder die IRKD-HIS zur Homogenität gereinigt werden (s. Kap 3.5, Abb. 3.3). Im folgenden Versuch wurden jeweils 1  $\mu\text{M}$  IRKD, IRKD-HIS und IRKD-K1018A für 30 Minuten in Anwesenheit von 250  $\mu\text{M}$   $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin), 5 mM  $\text{MnCl}_2$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 inkubiert und die Reaktionen durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Nach SDS-PAGE wurden die Proteine durch Färbung des Geles und Autoradiographie lokalisiert.



**Abb. 5.1: Autophosphorylierung der löslichen Insulinrezeptorkinasen und Phosphoaminosäureanalyse der aktiven Enzyme.** Mit den gereinigten Kinasen wurden für 30 Minuten Autophosphorylierungsreaktionen durchgeführt, die Proteine durch SDS-PAGE getrennt und durch Autoradiographie lokalisiert. Von den aktiven Kinasen wurde zudem die Phosphoaminosäure-Zusammensetzung analysiert. **A:** links: Coomassie gefärbtes Proteingel der gereinigten Kinasen (aufgetragen sind jeweils 1  $\mu\text{g}$  Protein) rechts: Autoradiographie nach 30minütiger Autophosphorylierungsreaktion. 1, 4: IRKD-HIS, 2, 5: IRKD-K1018A, 3, 6: IRKD **B:** Zweidimensionale Phosphoaminosäureanalyse der aktiven Kinasen.

Im Gegensatz zu den aktiven Kinasekonstrukten zeigt das kinaseinaktive Enzym nach der Autophosphorylierungsreaktion keine Phosphatinkorporation (Abb. 5.1 B). ATP-Konzentration in einem Konzentrationsbereich von 250  $\mu\text{M}$  bis 2,5 mM führten ebenfalls zu keiner Phosphorylierung (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt zum einen, daß der Austausch der Aminosäure Lysin gegen Alanin tatsächlich eine Inaktivierung des Enzym bewirkt, die auch nicht durch höhere ATP Konzentrationen aufgehoben werden kann. Andererseits belegt dieses die Abwesenheit einer exogenen Serin- oder Tyrosin- Kinaseaktivität in der gereinigten Enzymfraktion. Im Rahmen einer Diplomarbeit wurde zusätzlich die kinaseinaktive Variante IRKD-D1120A konstruiert (Keßler 1998). In diesem Protein wurde die katalytische Base Aspartat 1120 gegen Alanin substituiert. Die Mutation erlaubt noch die Bindung von ATP, unterbindet aber die Fähigkeit zur Hydrolyse der  $\gamma$ -Phosphoesterbindung des Moleküls. Das Protein konnte mit derselben Effizienz wie die aktive IRKD gereinigt werden, zeigte aber ebenfalls keinerlei Phosphatinkorporation in der Autophosphorylierungsreaktion. Die aktiven löslichen Rezeptorkinasen inkorporierten im Mittel 4 - 5 mol Phosphat pro mol Kinase. Die in den Gelbanden enthaltenen Proteine wurden im Anschluß durch tryptischen Verdau eluiert. Nach saurer Hydrolyse wurde eine zweidimensionale Gelelektrophorese durchgeführt und die Phosphoaminosäure-Zusammensetzung quantifiziert (Abb. 5.1 B). In beiden aktiven Enzymen wird ein Phosphoserinanteil von 20-25 % gefunden, zusätzlich wurde in der IRKD-HIS ein 3 %iger Phosphothreoninanteil erhalten, welcher aus der Phosphorylierung eines Threoninrestes aus dem Histidin-Fusionsproteinanteil resultiert (Al-Hasani 1995).

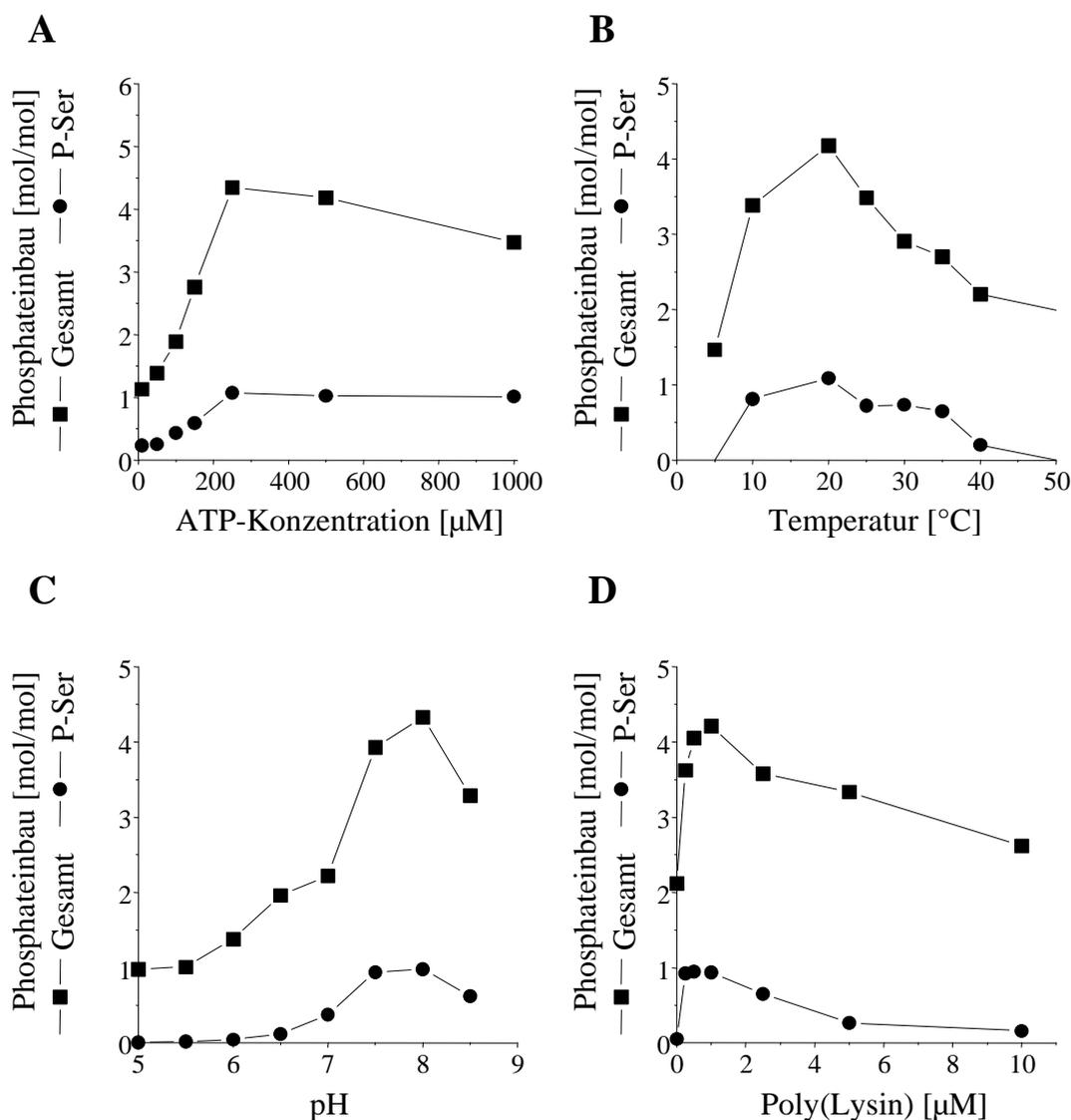
Im folgenden wurde die Fähigkeit zur Serinphosphorylierung in den Kinasen IRKD-Y1316/22F, IRKD-Y1316/22T und IRKD-Y960F-Y1316/22F unter vergleichbaren Bedingungen untersucht. Dazu wurden Autophosphorylierungsreaktionen für 30 Minuten durchgeführt. Die Reaktionsansätze enthielten 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP, 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin), 5 mM  $\text{MnCl}_2$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 und 1  $\mu\text{M}$  Kinase. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der jeweiligen Kinase gestartet, nach 30 Minuten durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet und die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Lokalisation der Kinasen durch Autoradiographie und Bestimmung des Phosphat-einbaus durch Messung der Radioaktivität im  $\beta$ -Counter wurden die erhaltenen Gelbanden durch tryptischen Verdau eluiert und die Phosphoaminosäure-Zusammensetzung bestimmt. Der Austausch der beiden C-terminalen Tyrosinphosphorylierungsstellen gegen Phenylalanin bewirkt im Vergleich zur IRKD eine Veränderung der elektrophoretischen Mobilität des Moleküls. Während die IRKD nach Phosphorylierung als Doppelbande im SDS-Gel detektiert werden kann, zeigt die Kinasevariante nur eine Bande mit einem geringeren apparenten Molekulargewicht (Abb. 5.2 A). Ein vergleichbares Laufverhalten wird auch für die beiden anderen Kinasevarianten IRKD-Y1316/22T und IRKD-Y960F-Y1316/22F beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die veränderte elektrophoretische Mobilität von Phosphoproteinen geht wahrscheinlich auf eine erniedrigte spezifische SDS-Bindung der Proteine zurück. Nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten beträgt die spezifisch inkorporierte Radioaktivität in die IRKD-Y1316/22F 3 mol/mol (Abb. 5.5 C). Dabei führt der Austausch der beiden C-terminalen Tyrosinreste zu keinem Verlust der Serinphosphorylierung. Mit einem Anteil von 38 % an der Gesamtphosphorylierung wird eine spezifische Phosphatinkorporation von  $\sim 1$  mol/mol in Serinreste erreicht (Abb. 5.2 B; Abb. 5.5 C), Threoninphosphorylierung wird nicht detektiert. Die zusätzliche Substitution der Tyrosinphosphorylierungsstelle Tyr<sup>960</sup> gegen Phenylalanin führt in der IRKD-Y960/1316/22F zu einer weiteren Verminderung der spezifischen Phosphatinkorporation, im Mittel werden 2 mol/mol erhalten (Abb. 5.5 E). Der Serinphosphatanteil in diesem Molekül kann mit 42 % angegeben werden ( $\sim 0,8$  mol/mol, Abb. 5.2 C; Abb. 5.5 D), Phosphothreonin wird nicht detektiert. Der Austausch der beiden C-terminalen Tyrosinphosphorylierungsstellen gegen Threonin resultiert in einer drastischen Änderung der maximalen Phosphatinkorporation, er beträgt nach 30minütiger Reaktionszeit 1,2 mol/mol (Abb. 5.5 E; Abb. 5.5 F). Dabei ist bemerkenswert, daß in dieser Mutante keine Serinphosphorylierung detektiert werden kann. Auch die Substitution der beiden C-terminalen Tyrosinphosphorylierungsstellen gegen Threonin führt nicht zur Phosphorylierung dieser aliphatischen Aminosäurereste (Abb. 5.2 D).



**Abb. 5.2: Die Serinphosphorylierung der IRKD-Y1316/22F IRKD-Y1316/22T und IRKD-Y960F-Y1316/22F.** Nach 30minütiger Autophosphorylierungsreaktion (1  $\mu$ M Enzym, 250  $\mu$ M [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP, 5 mM  $\text{MnCl}_2$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM Tris/HCl, pH 7,5) wurden die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und die erhaltenen Proteinbanden tryptisch eluiert. Nach Partialhydrolyse erfolgte die Auftrennung der Phosphoaminosäuren durch zweidimensionale Elektrophorese und Quantifizierung durch den Phosphoimager. pY: Phosphotyrosin, pS: Phosphoserin, pT: Phosphothreonin **A:** Vergleich der elektrophoretischen Mobilität der IRKD (Bahn 1) und der IRKD-Y1316/22F (Bahn 2) in der SDS-PAGE nach 30minütiger Autophosphorylierungsreaktion. Autoradiographie nach SDS-PAGE. **B:** Phosphoaminosäureanalyse der IRKD-Y1316/22F, **C:** der IRKD-Y960F-Y1316/22F und **D:** der IRKD-Y1316/22T. B, C, D: Autoradiographie nach zweidimensionaler Elektrophorese.

### 5.2.1 Abhängigkeit der IRKD-Serinphosphorylierung von den Reaktionsbedingungen

In den folgenden Experimenten sollte überprüft werden, ob die Serin- und Tyrosinkinaseaktivität der IRKD durch die Reaktionsbedingungen beeinflusst werden kann. Dazu wurden jeweils Autophosphorylierungsreaktionen mit variierenden ATP- und Poly(Lysin)-Konzentrationen, variierender Temperatur und pH-Wert für 20 Minuten durchgeführt. Zusätzlich wurde die Kinetik der Reaktion in Anwesenheit von 10 mM  $\text{MnCl}_2$  bzw.  $\text{MgCl}_2$  analysiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Kinase gestartet und zu den jeweiligen Zeitpunkten Aliquots entnommen. Nach dem Beenden der Reaktionen durch Zugabe von SDS-Probenpuffer und Auftrennung der Proteine in einer SDS-PAGE, wurde der Phosphateinbau in die Proteine durch Messung der Cerenkov-Strahlung ermittelt und die Phosphoaminosäure-Zusammensetzung bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, daß in allen Fällen die Fähigkeit zur Serinphosphorylierung direkt an die Kinaseaktivität des Enzyms gekoppelt ist. Maximaler Phosphateinbau resultiert auch in der maximalen Inkorporation von Phosphaten in Serinreste. Dabei bleibt im Fall variierender ATP-Konzentrationen und Temperatur das Verhältnis von Phosphotyrosin zu Phosphoserin konstant, in jedem Fall werden etwa 20 % Phosphoserin detektiert (Abb. 5.3 A,B). Bei variierenden pH-Werten zeigt das Enzym maximale Phosphatinkorporation bei pH 7,5 - 8. Unter diesen Bedingungen ist auch die Serinphosphorylierung maximal und erreicht einen prozentualen Anteil von 18 % an der maximalen Phosphatinkorporation. Bei niedrigen pH-Werten werden dagegen bevorzugt die Tyrosinreste phosphoryliert (Abb. 5.3 C).

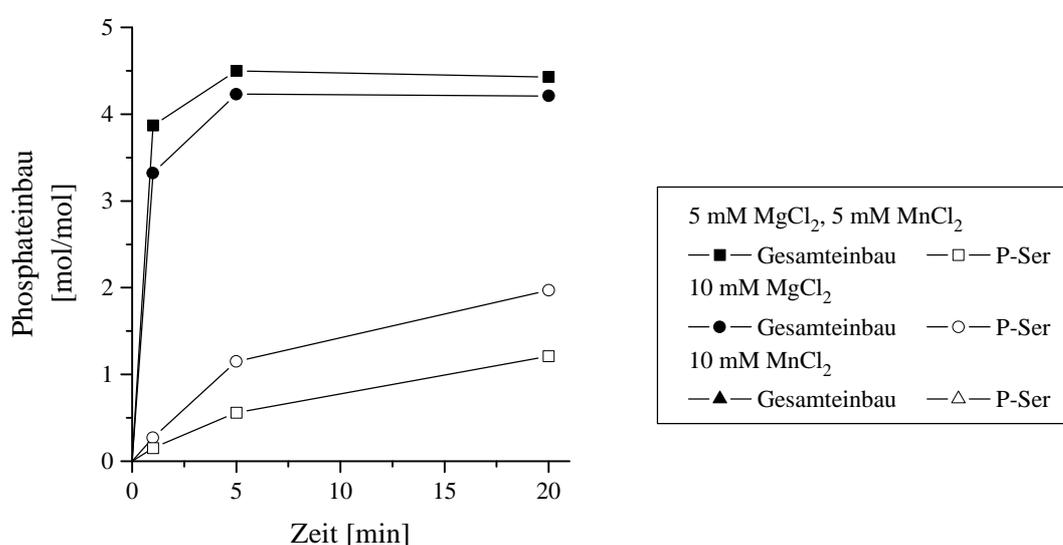


**Abb. 5.3: Abhängigkeit der IRKD-Serinphosphorylierung von den Reaktionsbedingungen.** Die Reaktionen wurden unter den jeweiligen Bedingungen für 20 Minuten durchgeführt. Die Enzymkonzentration betrug jeweils  $1 \mu\text{M}$ . Nach dem Beenden der Reaktionen mittels SDS-Probenpuffer und Auftrennung der Proteinen durch SDS-PAGE wurde der Phosphateinbau in die IRKD durch Messung der Cerenkov-Strahlung ermittelt. Im Anschluß erfolgte eine tryptische Elution der Gelbanden und die Analyse der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung. **A: ATP-Abhängigkeit:** Die Ansätze enthielten variierende ATP-Konzentrationen,  $1 \mu\text{M}$  Poly(Lysin),  $5 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $5 \text{ mM}$   $\text{MnCl}_2$  und  $50 \text{ mM}$  Tris/HCl pH 7,5. **B: Temperaturabhängigkeit:** Die Ansätze enthielten  $1 \mu\text{M}$  Poly(Lysin),  $250 \mu\text{M}$   $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ,  $5 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $5 \text{ mM}$   $\text{MnCl}_2$  und  $50 \text{ mM}$  Tris/HCl pH 7,5. Die Reaktion wurde nach vorheriger Inkubation der Reaktionsansätze für 15 Minuten bei der jeweiligen Temperatur durch Zugabe der Kinase gestartet. **C: pH-Abhängigkeit:** Die Reaktionsansätze enthielten  $250 \mu\text{M}$   $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ,  $1 \mu\text{M}$  Poly(Lysin),  $5 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  und ein Drei-Komponenten-Puffersystem ( $0,1 \text{ M}$  Kac,  $0,05 \text{ M}$  Tris,  $0,05 \text{ M}$  BisTris). Mit dem Puffersystem kann unter vergleichbaren Bedingungen ein pH-Bereich von 6,4 - 7,9 abgedeckt werden. **D: Poly(Lysin)-Abhängigkeit:** Die Reaktionsansätzen enthielten variierende Poly(Lysin)-Konzentrationen,  $250 [\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ,  $5 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ , Tris/HCl pH 7,5.

Ein Unterschied im Verhältnis von Phosphoserin und Phosphotyrosin wird auch in Abhängigkeit von der Poly(Lysin)-Konzentration beobachtet (Abb. 5.3 D). Der Versuch zeigt, daß unter nahezu äquimolaren Konzentrationsverhältnissen (IRKD zu Poly(Lysin)) der Phosphorylierungsgrad der Kinase maximal ist. Die Anwesenheit von  $1 \mu\text{M}$  Poly(Lysin) führt zu einer Verdopplung der inkorporierten Radioaktivität. Der Anteil an phosphorylierten Serinresten beträgt ca. 22 %. Dagegen wird in der

nicht stimulierten Kinase keine signifikante Serinphosphorylierung beobachtet, höhere Poly(Lysin)-Konzentrationen wirken sich ebenfalls nachteilig auf die Serinphosphorylierung aus.

Eine Besonderheit zeigten die Untersuchungen zur Abhängigkeit der Serinphosphorylierung von der verwendeten Ionensorte (Abb. 5.4) In Anwesenheit von 5 mM MgCl<sub>2</sub> und MnCl<sub>2</sub> ist die Initialgeschwindigkeit der Autophosphorylierung maximal. Die Verwendung von 10 mM MgCl<sub>2</sub> oder MnCl<sub>2</sub> führt zu einer Reduktion um 15 bzw. 20 %. Nach 20 Minuten Reaktionszeit werden in Gegenwart beider Metallkationen 4,5 mol Phosphat pro mol IRKD inkorporiert, die maximalen Einbauraten unter Verwendung von nur MgCl<sub>2</sub> oder MnCl<sub>2</sub> betragen 4,2 bzw. 3,7 mol/mol. Im Gegensatz dazu ist die Initialgeschwindigkeit und die maximale Einbaurate der Serinphosphorylierung bei Verwendung von 10 mM MgCl<sub>2</sub> stark erhöht. Nach einer Reaktionszeit von 20 Minuten erreicht sie einen Anteil von nahezu 50 % der Gesamtposphorylierung. Die Verwendung von MnCl<sub>2</sub> resultiert nach 20 Minuten Reaktionszeit in einer Phosphatinkorporation von 3,7 mol pro mol Kinase. Der prozentuale Serinphosphatanteil beträgt 22 % der Gesamtposphatinkorporation und ist damit dem der Reaktion, bei welcher beide Metallkationen eingesetzt wurden, vergleichbar.



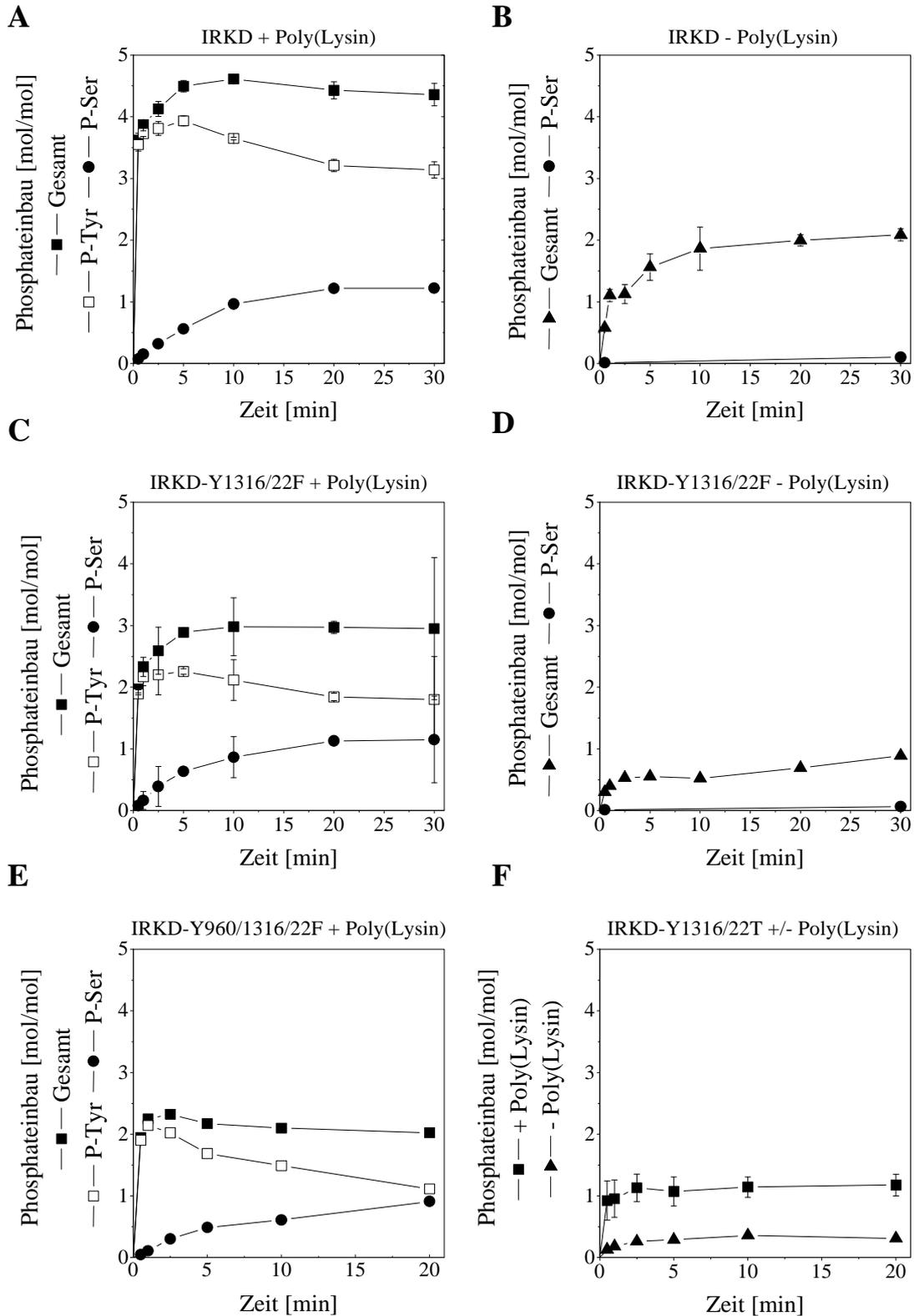
**Abb. 5.4: Zeitabhängigkeit der Serinphosphorylierung von den eingesetzten Metallionen.** Die Ansätze enthielten 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP, 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin), 10 mM MgCl<sub>2</sub> bzw. 10 mM MnCl<sub>2</sub> oder 5 mM MgCl<sub>2</sub> und 5 mM MnCl<sub>2</sub>. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  Kinase gestartet und zu den jeweiligen Zeitpunkten Aliquots entnommen. Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von SDS-Probenpuffer und SDS-PAGE wurde die inkorporierte Radioaktivität durch Messung der Cerenkov-Strahlung ermittelt, anschließend eine tryptische Elution der Gelbanden durchgeführt und die Phosphoaminosäure-Zusammensetzung analysiert.

### 5.3 Zeitverlauf der Autophosphorylierung

Um den Zeitverlauf der Autophosphorylierung näher zu charakterisieren, wurden Autophosphorylierungsreaktionen mit der IRKD und den Kinasevarianten IRKD-Y1316/22F, IRKD-Y1316/22T und IRKD-Y960/1316/22F untersucht. Dabei wurde auch der Einfluß der Poly(Lysin)-Stimulierung analysiert. Die Reaktionen erfolgten jeweils bei einer Reaktionstemperatur von 25°C und einem pH-Wert von 7,5 in 50 mM Tris/HCl mit 5mM MnCl<sub>2</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub> in An- oder Abwesenheit von 1 µM Poly(Lysin). Die [ $\gamma$ -<sup>32</sup>]ATP-Konzentrationen betragen 250 µM, die Kinasekonzentration 1 µM. Nach dem Start der Reaktion durch Zugabe des jeweiligen Enzyms wurde zu verschiedenen Zeitpunkten ein Aliquot entnommen, die Reaktion durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet und die Proteine durch SDS-PAGE getrennt. Die Kinasebanden wurden durch Autoradiographie in den getrockneten Gelen identifiziert, ausgeschnitten und die inkorporierte Radioaktivität durch Messung der Cerenkov-Zählung im  $\beta$ -Counter quantifiziert. Im Anschluß erfolgte eine tryptische Elution der Gelbanden, die partielle Hydrolyse der erhaltenen Peptide und eine dünnschichtchromatographische Analyse der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung.

Der Phosphateinbau in die IRKD gleicht einer Sättigungskurve (Abb. 5.5 A). Der maximale Phosphateinbau der Poly(Lysin)-aktivierten Kinase beträgt nach 30 min  $4,4 \pm 0,2$  mol/mol, die Halbwertszeit der Reaktion liegt bei 25 Sekunden. Die aus dem linearen Bereich der Kurve ermittelte Initialgeschwindigkeit ergibt  $161 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ . Ohne Poly(Lysin)-Stimulation ist die Sättigung des Phosphateinbaus nach 30 Minuten noch nicht erreicht, die Halbwertszeit der Reaktion muß daher mit  $> 5$  Minuten angegeben werden. Der nach dieser Zeit ermittelte Phosphateinbau beträgt  $2,1$  mol/mol, die Initialgeschwindigkeit  $26 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  (Abb. 5.5 B). Nach Austausch der beiden C-terminalen Tyrosinphosphorylierungsstellen gegen Phenylalanin ergibt sich für die IRKD-Y1316/22F ein maximaler Phosphateinbau von  $2,95 \pm 0,1$  mol/mol (Abb. 5.5 C). Die Halbwertszeit der Reaktion liegt bei 5 Minuten, die Initialgeschwindigkeit kann mit  $88 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  angegeben werden. Unterbleibt die Stimulation durch Poly(Lysin), erreicht das Enzym nach 30 Minuten einen spezifischen Phosphateinbau von  $0,89$  mol/mol. Die Halbwertszeit der Reaktion beträgt etwa 1 Minute, die Initialgeschwindigkeit  $13,3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  (Abb. 5.5 D). Das Enzym IRKD-Y960F-Y1316/22F, welches die drei Tyrosinphosphorylierungsstellen der katalytischen Domäne enthält, zeigt in der Anwesenheit von Poly(Lysin) einen maximalen Phosphateinbau von  $2$  mol/mol. Die Halbwertszeit der Reaktion beträgt etwa 15 Sekunden, die Initialgeschwindigkeit ist mit  $87 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  der der Kinase IRKD-Y1316/22F vergleichbar (Abb. 5.5 E). Die Kinase IRKD-Y1316/22T inkorporiert nach 20 Minuten Reaktionszeit  $1,2 \pm 0,2$  mol Phosphat pro mol Enzym. Die Halbwertszeit der Poly(Lysin) stimulierten Reaktion beträgt etwa 15 Sekunden, die Initialgeschwindigkeit  $41,3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ . Ohne Poly(Lysin)-Stimulation ergibt sich eine maximale Phosphatinkorporation von  $0,3$  mol/mol und eine Halbwertszeit von 30 Sekunden. Die Initialgeschwindigkeit beträgt etwa  $5,8 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  (Abb. 5.5 F).

Im Gegensatz zu den Unterschieden für die kinetischen Konstanten der Gesamtphosphorylierung, ergeben sich für die Serinphosphorylierung der Kinasen IRKD, IRKD-Y1316/22F und IRKD-Y960/1316/22F nahezu identische kinetische Daten. In allen Fällen wird in Anwesenheit des Polykations Poly(Lysin) die Serinphosphorylierung der Enzyme durch eine „Sättigungskurve“ beschrieben, die in der initialen Phase der Reaktion der Tyrosinphosphorylierung zeitlich nachzufolgen scheint. Die Halbwertszeiten der Serinphosphorylierung betragen ca. 5 - 7,5 Minuten. Nach einer Reaktionszeit von 20 Minuten werden an der Gesamtphosphorylierung gemessen, 28 % Phosphoserin in der IRKD, 38 % in der IRKD-Y1316/22F und 42 % in der IRKD-Y960/1316/22F detektiert. Aus diesen relativen Anteilen ergeben sich damit spezifische Phosphateinbauraten von  $1,2$  mol/mol für die IRKD,  $1,1$  mol/mol für die IRKD-Y1316/22F und  $0,85$  mol/mol für die IRKD-Y960/1316/22F. Aus dem linearen Anteil der Kurven können die Initialgeschwindigkeiten der Serinphosphorylierung für die IRKD mit  $3,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , für die IRKD-Y1316/22F mit  $3,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  und für die IRKD-Y960/1316/22F mit  $2,7 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  angegeben werden. Unter Berücksichtigung der geringen Signalstärke und dem damit verbundenen relativ großen Fehler in der Quantifizierung des Phosphoserinsignals in der chromatographischen Analyse sind sie damit nahezu vergleichbar.



**Abb. 5.5: Zeitverlauf der Autophosphorylierung der löslichen Rezeptorkinasen.** Die Autophosphorylierungen wurden in An- oder Abwesenheit von 1  $\mu$ M Poly(Lysin) und 250  $\mu$ M [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP durchgeführt. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und die Reaktion durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Nach Auftrennen der Proteine durch SDS-PAGE wurde der Phosphateinbau in die Enzyme bestimmt und eine Analyse der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung durchgeführt. A: IRKD + Poly(Lysin). B: IRKD - Poly(Lysin). C: IRKD-Y1316/22F + Poly(Lysin). D: IRKD-Y1316/22F - Poly(Lysin). E: IRKD-Y960/1316/22F + Poly(Lysin). F: IRKD-Y1316/22T +/- Poly(Lysin).

Im Vergleich zu den Poly(Lysin) stimulierten Reaktionen ist die Serinphosphorylierung in Abwesenheit des Polykations in allen Enzymen deutlich reduziert. In der initialen Phase der Reaktion liegt der prozentuale Anteil der Serinphosphorylierung bei in allen Kinasen bei 2-4 % der Gesamtphosphorylierung, für die letzten Zeitwerte konnte ein relativer Anteil von 5-7 % gemessen werden. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Enzymen kann in der IRKD-Y1316/22T weder in An- oder Abwesenheit von Poly(Lysin) Phosphatinkorporation in Serinreste oder Threoninreste detektiert werden. Tabelle 5.1 faßt noch einmal die ermittelten Initialgeschwindigkeiten der Autophosphorylierungsreaktion der Kinasen zusammen. Aus dem Vergleich der einzelnen Geschwindigkeiten ergibt sich, daß Poly(Lysin) die Tyrosin- und Serinphosphorylierung der einzelnen Enzyme in etwa um denselben Faktor beeinflusst. Dieses spricht zum einen für eine gleichartige Wirkung des Polykations auf die einzelnen Enzyme, zum anderen zeigt dieser identische Effekt, daß die beobachtete Serinphosphorylierung auf eine intrinsische Eigenschaft der Kinasen zurückgeführt werden kann.

Enzym	Reaktion	Geschwindigkeit mit Poly(Lysin) [nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> ]	Geschwindigkeit ohne Poly(Lysin) [nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> ]	Aktivierungsfaktor
	Gesamt	161	26	6,2
IRKD	Tyrosinphosphorylierung	157,8	25,6	6,2
	Serinphosphorylierung	3,2	0,44	7,2
	Gesamt	88	13	6,8
IRKD-Y1316/22F	Tyrosinphosphorylierung	84,5	12,5	6,76
	Serinphosphorylierung	3,5	0,47	7,4
	Gesamt	87	n.b.	-
IRKD-Y960/1316/22F	Tyrosinphosphorylierung	84,3	n.b.	-
	Serinphosphorylierung	2,7	n.b.	-
	Gesamt	41	6	6,8
IRKD-Y1316/22T	Tyrosinphosphorylierung	41	6	6,8
	Serinphosphorylierung	-	-	-

**Tab 5.1: Einfluß von Poly(Lysin) auf die Initialgeschwindigkeiten der Tyrosin- und Serinphosphorylierung.** Die Initialgeschwindigkeiten der jeweiligen Reaktionen wurden aus den linearen Anteilen der Graphen aus Abb. 5.5 und Anhang III.2 Tab III 4-7 bestimmt.

## 5.4 Identifizierung der Autophosphorylierungsstellen der Insulinrezeptorkinase

### 5.4.1 Die Methode der Phosphopeptidkartierung

Die Methode der Phosphopeptidkartierung wurde von Al-Hasani (1995) für die lösliche Insulinrezeptorkinase IRKD-HIS entwickelt. Die Autophosphorylierung dieser Kinase, die über eine N-terminale Histidin-Affinitätsmarkierung verfügt, führt zur Besetzung von Tyrosin- Serin- und zu einem geringen Anteil an Threoninresten (Abb. 5.1 B). Eine vollständige tryptische Spaltung des autophosphorylierten Enzyms liefert theoretisch 48 Peptide, von denen 29 potentielle Phosphorylierungsstellen an Tyrosin, Serin und Threonin beinhalten. Die Auftrennung des Phosphopeptid-Gemisches durch HPLC-Anionenaustausch-Chromatographie (SAX1000-8/46) mit einem zwei-stufigen Salzgradient führt zur Separation von 14, Radioaktivität enthaltenden Fraktionen. Dabei werden 90 % der aufgetragenen Ausgangsradioaktivität wiedererhalten. Die Sequenz der darin enthaltenen Phosphopeptide konnte Al-Hasani (1995) durch direkte Edman-Sequenzierung ermitteln. Somit ist es möglich, jedem einzelnen Elutionspeak im Chromatogramm die entsprechende Aminosäuresequenz und Phosphorylierungsstelle der IRKD-HIS zuzuordnen. Mit diesem Verfahren konnten alle bekannten Tyrosinphosphorylierungsstellen des C-Terminus und der katalytischen Domäne (partiell oder teilweise phosphoryliert) nachgewiesen werden.

Daneben wurden ein phosphoryliertes Threonin-Peptid und ein phosphoryliertes Tyrosinpeptid nachgewiesen, welche dem N-terminalen Poly(His)-Anteil der Kinase entstammen. Allerdings konnte keine Aussage über die Besetzung der Phosphorylierungsstellen im Juxtamembranbereich der Kinase

getroffen werden. Wichtiger war die Identifizierung von zwei Phosphopeptiden, die ausschließlich an den Serinresten Ser<sup>1275</sup> und Ser<sup>1309</sup> phosphoryliert waren und somit als Serinautophosphorylierungsstellen dieser löslichen Rezeptorkinase beschrieben werden konnten. Der Vergleich dieses Elutionsprofils mit den korrespondierenden Profilen der IRKD und des aus Humanplazenta gereinigten Insulinrezeptors zeigte, daß die Autophosphorylierungsreaktionen dieser Enzyme in der identischen Besetzung der Autophosphorylierungsstellen resultiert (Tennagels 1995, Magg 1997). Neben den Tyrosinphosphorylierungsstellen der katalytischen Domäne und des C-Terminus konnten auch die beiden Phosphoserin enthaltenen Fraktionen gefunden werden, die mit den Retentionszeiten der an Serin phosphorylierten Peptide Ser<sup>1275</sup> und Ser<sup>1309</sup> übereinstimmten. (Al-Hasani et al. 1997). In Tabelle 5.2 sind die Sequenzdaten der ausgeprägtesten Signale aus dem Elutionsprofil der IRKD-HIS zusammengefaßt.

Fraktion	ermittelte Sequenz	Aminosäuresequenz (hIR)	Position der Phosphoaminosäuren (hIR)	Domäne
a	DGGSSpLGFK	1305-1313	Ser1309	CT
b	SYpEEHIPYpTHMNGGK	1315-1329	Tyr1316, Tyr1322 vollständig phosphoryliert	CT
c	DIYpETDYpYpR	1144-1152	Tyr1146, Tyr1150, Tyr1151 partiell phosphoryliert (mono KD)	KD
d	DIYpETDYpYpR	1144-1152	Tyr1146, Tyr1150 oder Tyr1146, Tyr1151 phosphoryliert (Bis 1 KD)	KD
e	DIYETDYpYpR	1144-1152	Tyr1150 und Tyr1151 (Bis 2 KD)	KD
f	APESpEELEMEFEDMENVPLR	1272-1292	Ser1275	CT
g	DIYpETDYpYpR	1144-1152	Tyr1146, Tyr1150, Tyr1151 vollständig phosphoryliert (tris KD)	KD

**Tab 5.2: Sequenz, Position in der Aminosäuresequenz und die enthaltenen Phosphoaminosäuren der einzelnen Fraktionen der HPLC-Chromatographie.** CT: C-terminale Domäne, KD: katalytische Domäne, Yp: Phosphotyrosin, Sp: Phosphoserin. (Al-Hasani et al. 1997, Nomenklatur nach Ullrich et al. 1985)

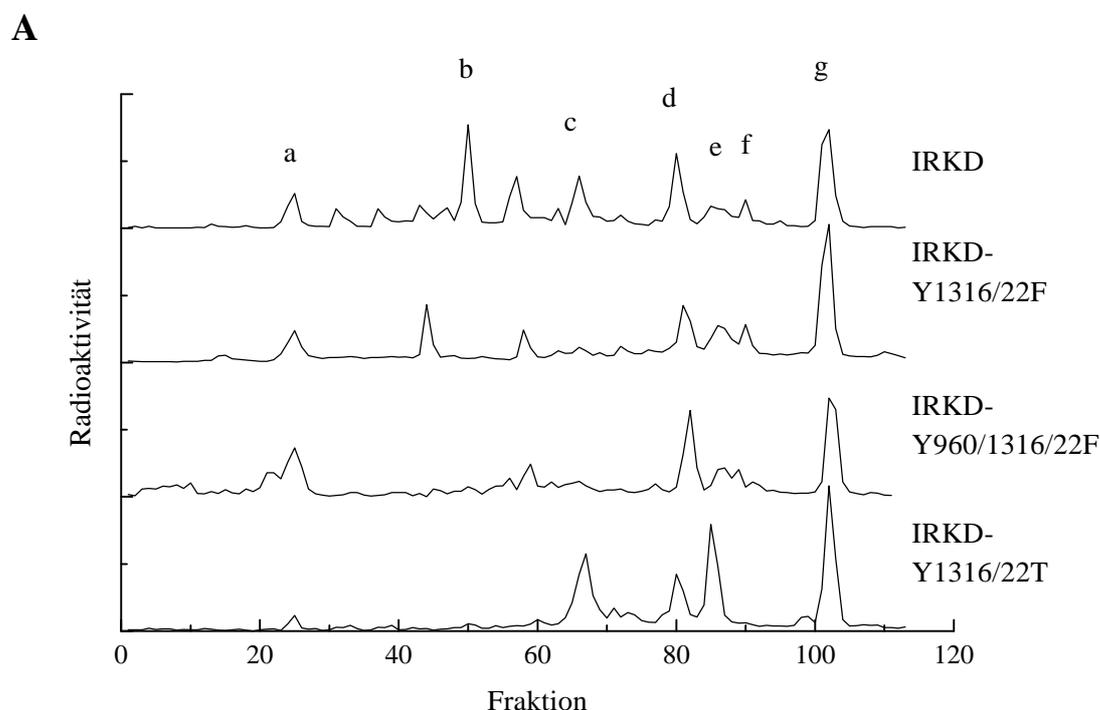
Ein Nachteil dieser Methode ist, daß die prozentuale Verteilung der Phosphate in einzelne Phosphorylierungsstellen nur als apparente Größe betrachtet werden kann. So werden z.B. bei der Analyse des für 30 Minuten autophosphorylierten Enzyms nur etwa 10 % der Radioaktivität in den korrespondierenden Peaks wiedergefunden, in der Phosphoaminosäureanalyse des Gesamtproteins werden dagegen ca. 25 % erhalten. Der Grund für diese Abweichung liegt mit aller Wahrscheinlichkeit in einer nicht vollständigen tryptischen Spaltung des Proteins, da auch in anderen Fraktionen, wenn auch zu geringeren Anteilen, Serinphosphorylierung detektiert werden kann (Al-Hasani 1995).

#### 5.4.2 Vergleich der Autophosphorylierungsstellen der IRKD, IRKD-Y1316/22F, IRKD-Y1316/22T und IRKD-Y960/1316/22F

Die durch gezielte Punktmutationen veränderten Kinasen IRKD-Y1316/22F, IRKD-Y960/1316/22F und IRKD-Y1316/22T wurden durch die Methode der Phosphopeptidkartierung untersucht, um Einflüsse der Punktmutationen auf die Besetzung der Autophosphorylierungsstellen zu studieren. Dazu wurden, wie unter 5.3 beschrieben, Autophosphorylierungsreaktionen mit jeweils 1 µM Enzym für 30 Minuten durchgeführt, die Kinasen nach SDS-PAGE tryptisch aus dem getrockneten Gel eluiert und die erhaltenen Peptide durch Anionenaustausch-Chromatographie getrennt. Die Identifizierung der einzelnen Phosphorylierungsstellen erfolgte über den Vergleich mit den Retentionszeiten der IRKD (Abb. 5. 6).

In den Profilen aller Chromatogramme können, bedingt durch die eingefügten Mutationen, Unterschiede in den relativen Höhen einzelner Peaks und auch die Abwesenheit einzelner Signale beobachtet werden. Die Tabelle in Abbildung 5.6 B faßt eine quantitative Analyse der Verteilung der Phosphate in die einzelnen Phosphorylierungsstellen zusammen. Die Berechnungsgrundlage ist die Radioaktivität der entsprechenden Fraktionen, bezogen auf die insgesamt eluierte Radioaktivität. Die

Ausbeuten der einzelnen Chromatographieläufe betrug in allen Fällen ca. 90 %, allerdings muß mit einer gewissen Selektivität in den Ausbeuten einzelner Peptide und einer nicht vollständigen tryptischen Spaltung gerechnet werden, so daß die Werte nur als apparent anzusehen sind.



**B**

		IRKD	IRKD-Y1316/22F	IRKD-960/1316/22F	IRKD-Y1316/22T
Phosphateinbau [mol/mol]:		4,5	2,9	2,1	0,9
Fraktion	Phosphorylierungsstelle	Phosphatgehalt [%]			
a	Ser 1309	5	7	12	-
b	Tyr 1316 und Tyr 1322	13	-	-	-
c	Tyr 1146 oder Tyr 1150 oder Tyr 1151	10	4	4	18
d	Tyr 1146/50 oder Tyr 1146/51	11	12	13	13
e	Tyr 1150, 1151	5	10	6	17
f	Ser 1275	5	8	6	-
g	Tyr 1146, 1150, 1151	17	23	17	22

**Abb. 5.6: Vergleich der Phosphopeptidkartierung der IRKD, IRKD-Y1316/22F, IRKD-Y960/1316/22F und IRKD-Y1316/22T.** Nach 30minütigen Autophosphorylierungsreaktionen der jeweiligen Enzyme wurden die Proteine durch SDS-PAGE getrennt und der Phosphateinbau durch Messung der Radioaktivität im  $\beta$ -Counter ermittelt. Anschließend erfolgte die tryptische Elution der Gelbanden und die Auftrennung der Phosphopeptide durch HPLC-Anionenaustausch-Chromatographie. Nach Tabelle 5.2 ergibt sich die Zuordnung der Retentionszeiten zu den Phosphopeptiden. **A:** Repräsentative Chromatogramme der autophosphorylierten Enzyme. **B:** Prozentuale Verteilung der Phosphate in die einzelnen Phosphorylierungsstellen der Enzyme.

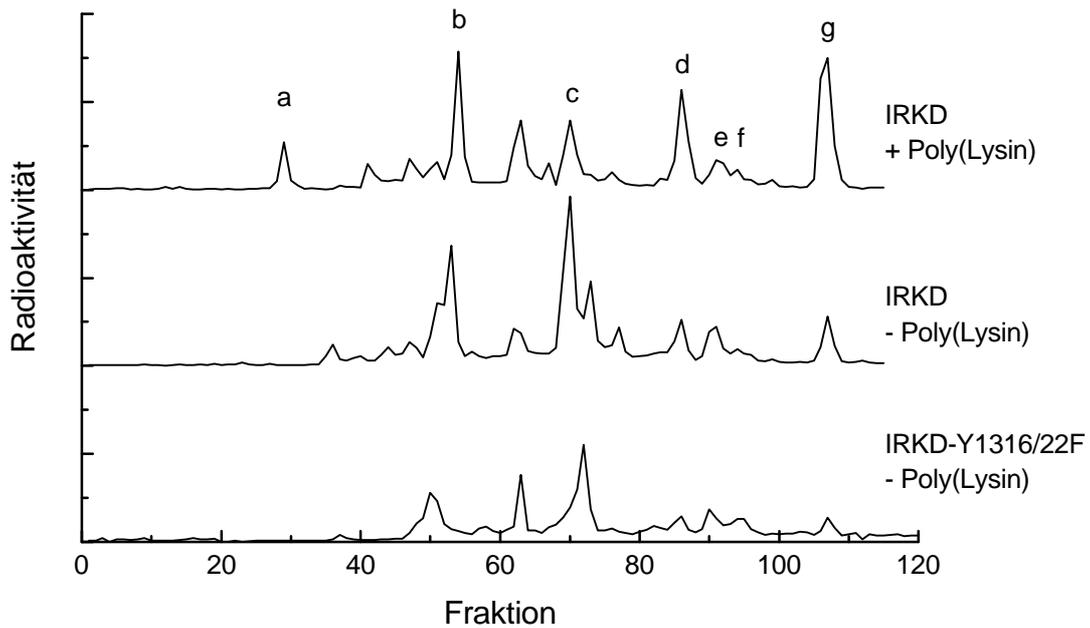
In der IRKD findet sich der Hauptanteil der inkorporierten Radioaktivität in den beiden Tyrosinphosphorylierungsstellen des C-Terminus und den drei Tyrosinresten der katalytische Domäne wieder (Fraktion b: 12,5 %, Fraktion g: 17 %). Daneben werden aber auch partiell phosphorylierte Formen der katalytischen Domäne gefunden (Fraktion c: 10 %, d: 10 %, e: 5 %). Das Serinpeptid 1309 enthält etwa 5 % (Fraktion a), das Serinpeptid 1275 etwa 5 % der Phosphate (Fraktion f). In der Summe ergibt sich damit ein Anteil von 10 %. Im Gegensatz dazu beträgt der Anteil der Serinphosphorylierung

im Hydrolysat des Gesamtproteins etwa 25 % (Abb. 5.5 A). Der Austausch der beiden C-terminalen Tyrosinreste gegen Phenylalanin in der IRKD-Y1316/22F spiegelt sich in dem Verlust des bisphosphorylierten Tyrosinpeptids der Fraktion b wider. Ferner ergeben sich Unterschiede in dem Phosphorylierungsgrad der katalytischen Domäne. So finden sich erhöhte Phosphatinkorporationen in den partiell oder vollständig phosphorylierten Peptiden, aber nur ein geringer Anteil an monophosphorylierten Peptiden. Der Anteil an Serinphosphorylierung beträgt in der Summe 15 %. Die Kinase IRKD-Y960/1316/22F zeigt die nahezu identische Besetzung der Phosphorylierungsstellen wie die IRKD-Y1316/22F. Allerdings ist der prozentuale Anteil an Serinresten deutlich erhöht (18 %). In Übereinstimmung mit der Phosphoaminosäureanalyse des Hydrolysates des Gesamtproteins wird in der Phosphopeptidkartierung der IRKD-Y1316/22T kein Signal für die beiden Serinpeptide erhalten. Die Radioaktivität wird nahezu vollständig in die Tyrosinphosphorylierungsstellen der katalytischen Domäne inkorporiert. Im Vergleich zu den anderen Enzymen ergeben sich hier Unterschiede. Der Anteil an partiell phosphorylierten Peptiden ist deutlich erhöht, ein großer Anteil der Phosphate wird in den mono- und bis-phosphorylierten Formen erhalten.

### **5.4.3 *Einfluß der Poly(Lysin)-Stimulierung auf die Verteilung der Phosphate in der IRKD***

Die Stimulierung der IRKD und der IRKD-Y1316/22F durch Poly(Lysin) führt zu einer 6 - 10fachen Steigerung der Initialgeschwindigkeit und einer ca. 2fachen Erhöhung des spezifischen Phosphateinbaus in der Autophosphorylierung (Abb. 3.5, Abb. 5.3, Tab. 5.1). Die Serinphosphorylierung scheint dabei um denselben Faktor stimuliert zu werden wie die Tyrosinphosphorylierung. Im folgenden Experiment wurde daher der Einfluß der Poly(Lysin)-Stimulierung auf die Verteilung der Phosphate nach der Autophosphorylierung der IRKD und der IRKD-Y1316/22F untersucht. Die Reaktionsansätze enthielten 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP, 1  $\mu\text{M}$  Enzym, 1  $\mu\text{M}$  bzw. kein Poly(Lysin). Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Kinase gestartet und nach 20 Minuten durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE erfolgte die Bestimmung des Phosphateinbaus und eine tryptische Elution der Phosphopeptide aus den Gelbanden. Die erhaltenen Peptide wurden anschließend durch HPLC-Anionenaustausch-Chromatographie aufgetrennt (Abb. 5.7). Die Profile aller Chromatogramme unterscheiden sich nur in den relativen Peakhöhen, die Retentionszeiten der einzelnen Peptide ist nahezu identisch. Es muß daher davon ausgegangen werden, daß Poly(Lysin) keinen Einfluß auf die Zugänglichkeit der einzelnen Phosphorylierungsstellen zu haben scheint. Deutlich sind aber Unterschiede in der relativen Verteilung der Phosphate in die einzelnen Phosphorylierungsstellen zu erkennen. In der nicht Poly(Lysin) stimulierten Reaktion inkorporiert die IRKD hauptsächlich Phosphate in mono-Formen der katalytischen Domäne (Fraktion c) und den C-terminalen Tyrosinphosphorylierungsstellen Tyr<sup>1316</sup> und Tyr<sup>1322</sup> (Fraktion b). Höhere Phosphorylierungsformen der katalytischen Domäne (Fraktion d, e, g) sind dagegen kaum vorhanden. In Anwesenheit von 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin) kommt es zu einer drastischen Erhöhung der Phosphorylierung in der katalytischen Domäne, welche auf Kosten der phosphorylierten Peptide aus der C-terminalen Region zu gehen scheint. Die Abwesenheit von Poly(Lysin) in der Reaktion der IRKD-Y1316/22F bewirkt ebenfalls eine Verschiebung der Phosphatverteilung zu Gunsten der mono-phosphorylierten Peptide der katalytischen Domäne. Die Stimulierung durch Poly(Lysin) beeinflusst auch direkt die Serinphosphorylierung der Kinase. Während in der nicht stimulierten Reaktion die beiden Serinpeptide Ser<sup>1275</sup> und Ser<sup>1309</sup> in der IRKD und der IRKD-Y1316/22F (vgl Abb. 5.6) nur sehr schwach zu detektieren sind, führt die Anwesenheit von Poly(Lysin) zu einer deutlichen Zunahme des radioaktiven Signals (Fraktion a und f).

A



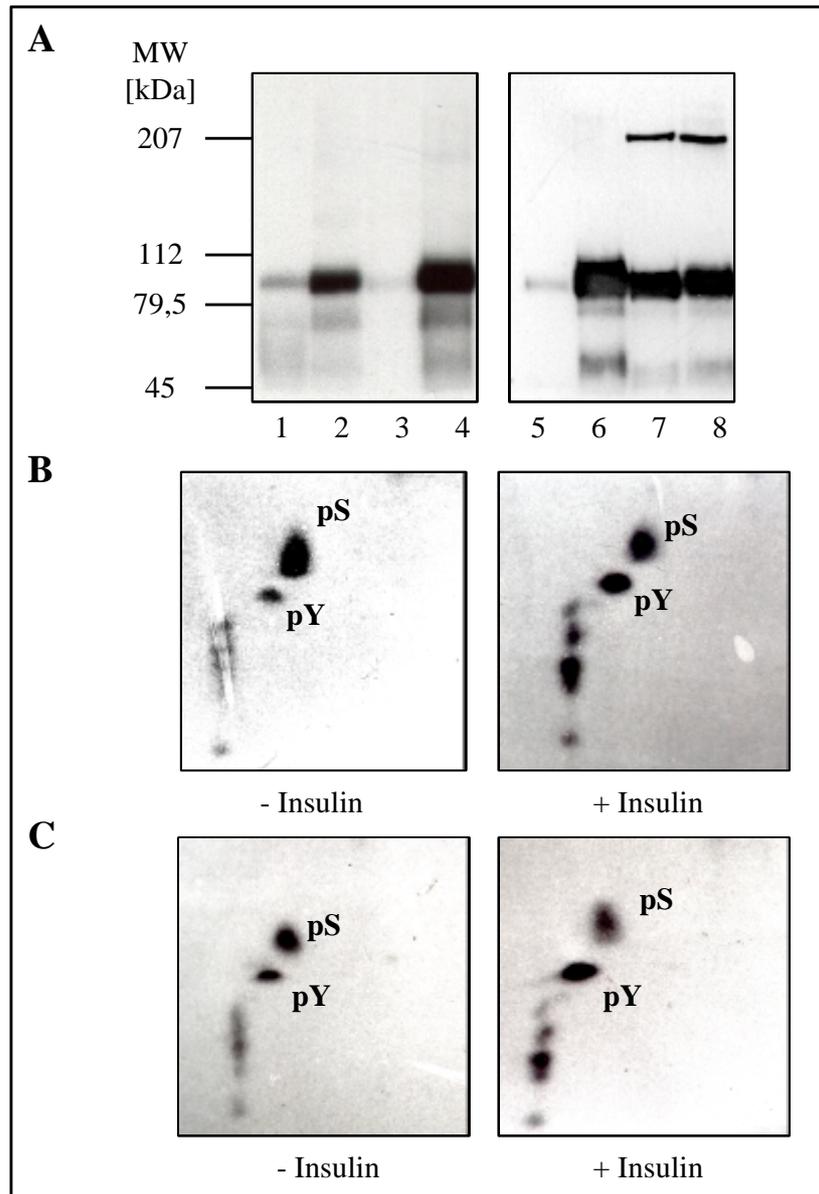
B

		IRKD + Poly(Lysin)	IRKD - Poly(Lysin)	IRKD- Y1316/22F - Poly(Lysin)
Phosphateinbau [mol/mol]:		4,1	2,1	0,9
Fraktion	Phosphorylierungsstelle	Phosphatgehalt [%]		
a	Ser 1309	3	0,2	0,1
b	Tyr 1316 und Tyr 1322	16	18,7	5
c	Tyr 1146 oder Tyr 1150 oder Tyr 1151	11	21	15
d	Tyr 1146/50 oder Tyr 1146/51	11	6	4
e	Tyr 1150, 1151	5	6	5
f	Ser 1275	3	3	4
g	Tyr 1146, 1150, 1151	17,5	5,5	4

**Abb. 5.7: Anionenaustausch-Chromatographie tryptischer Peptide der phosphorylierten IRKD und IRKD-Y1316/22F unter dem Einfluß der Poly(Lysin)-Stimulation.** Die Reaktionsansätze enthielten 250  $\mu\text{M}$   $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , 1  $\mu\text{M}$  Enzym und 1  $\mu\text{M}$  bzw. kein Poly(Lysin). Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Kinase gestartet und nach 20 Minuten durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und der Phosphateinbau ermittelt. Anschließend wurde die Kinase aus dem gel tryptisch eluiert. Von einem Teil des Peptidgemisches die Phosphoamino-säure-Zusammensetzung, der Rest durch HPLC-Anionenaustausch-chromatographie aufgetrennt. Die nicht stimulierte IRKD enthielt 2,1 mol/mol (P-Ser 0,05 mol/mol), die nicht stimulierte IRKD-Y1316/22F 0,9 mol/mol (P-Ser 0,1 mol/mol) und die Poly(Lysin) stimulierte IRKD 4,1 mol/mol (P-Ser: 0,9 mol/mol). Nach Tabelle 5.2 ergibt sich die Zuordnung der Retentionszeiten der Phosphopeptide.

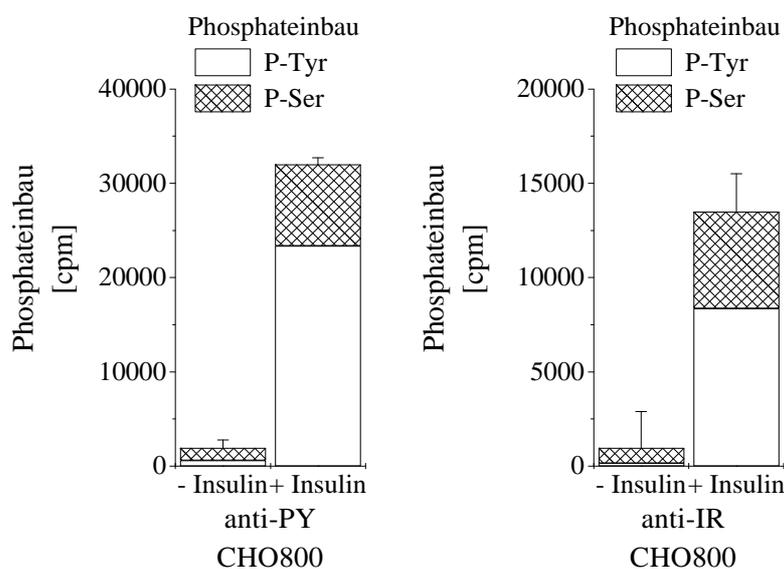
#### 5.4.4 Identifizierung der Serinphosphorylierungsstellen des humanen Insulinrezeptors *in situ*

Um zu prüfen, ob die Phosphorylierung der Serinreste Ser<sup>1275</sup> und Ser<sup>1309</sup> der löslichen Kinasen und des Insulinrezeptors *in vitro* auch nach Autophosphorylierung des Rezeptors *in situ* nachgewiesen werden kann, wurden in Zusammenarbeit mit Darryl Teltng im Labor von Dr. Maasen in Leiden (NL) „*in situ*-labeling Experimente“ durchgeführt. Dazu wurde eine humane Zell-Linie (Bezeichnung: A14, abgeleitet aus der Adipozyten-Zell-Linie NIH3T3) und eine Nager-Zell-Linie (Bezeichnung: CHO800, abgeleitet aus der Zell-Linie CHO9) verwendet, die den Rezeptor stabil mit 1 bzw. 1,6 Millionen Molekülen pro Zelle überexprimieren. Insgesamt wurden jeweils Zellzahlen eingesetzt, die bei optimaler Reinigung ca. 50 pmol bzw. 80 pmol Rezeptor liefern sollten. Die Zellen wurden über Nacht in Phosphat-freien Medium gehalten und anschließend mit radioaktiv markiertem Phosphat-Medium für 3 Stunden inkubiert (1 mCi/  $5 \times 10^6$  Zellen). Nach Stimulation der *in situ* Autophosphorylierung des Rezeptors mit Insulin für 30 Minuten (Insulinkonzentration  $10^{-7}$  M), wurden die Zellen in einem Lysipuffer aufgeschlossen und enthaltenen Rezeptoren durch Immunpräzipitation isoliert. Für die Reinigung des Rezeptors aus den A14-Zellen ein polyklonaler  $\alpha$ -PhosphotyrosinAntikörper ( $\alpha$ -PY) verwendet. Die Reinigung der Rezeptoren aus dem Zell-Lysat der CHO800 Zellen erfolgte sowohl durch Immunpräzipitation mit dem  $\alpha$ -Phosphotyrosin-Antikörper ( $\alpha$ -PY), als auch mit einem polyklonalen  $\alpha$ -Insulinrezeptor-Antikörper ( $\alpha$ -IR). Als Kontrolle dienten jeweils Präzipitate aus nicht Insulin stimulierten Zellen. Die Präzipitate wurden in einer reduzierenden SDS-PAGE aufgetrennt und die phosphorylierte  $\beta$ -Untereinheit durch Autoradiographie der getrockneten Gele lokalisiert. Durch eine zusätzliche Western-Blot-Analyse von Aliquots der Immunpräzipitate mit  $\alpha$ -Insulinrezeptor-Antikörper erfolgte eine qualitative Bestimmung der präzipitierten Rezeptormoleküle (Abb. 5.8 A). Nach der Bestimmung der inkorporierten Radioaktivität durch Messung der Cerenkov-Strahlung wurden die Rezeptorproteine durch tryptischen Verdau aus den Gelbanden eluiert. Von einem Teil des tryptischen Eluats wurde nach Partialhydrolyse die Phosphoaminosäure-Zusammensetzung durch zweidimensionale Elektrophorese bestimmt (Abb. 5.8 B), der übrige Teil wurde für eine Phosphopeptidkartierung verwendet. Abbildung 5.8 A zeigt eine repräsentative Autoradiographie und Western-Blot-Analyse der Immunpräzipitation des IR aus CHO800 Zellen. Nach Immunpräzipitation des IR aus den Zell-Lysaten nicht Insulin-stimulierter Zellen mit dem  $\alpha$ -Phosphotyrosin- oder  $\alpha$ -Insulinrezeptor-Antikörper werden im Mittel  $2949 \pm 837$  cpm bzw.  $3215 \pm 1931$  cpm inkorporierte Radioaktivität in der  $\beta$ -Untereinheit des IR erhalten. Der Serinphosphatanteil beträgt 68 % bzw. 83 % der Gesamtposphorylierung. Die 30minütige Insulinstimulation führt zu einem Anstieg der Phosphatinkorporation in die  $\beta$ -Untereinheit um den Faktor 5-10. Die Western-Blot-Analyse mit  $\alpha$ -Insulinrezeptor-Antikörper zeigt, daß der zusätzliche Phosphateinbau in Tyrosinreste zu einer qualitativ höheren Ausbeute von Rezeptorprotein unter Verwendung des  $\alpha$ -Phosphotyrosin-Antikörpers führt. Im Gegensatz dazu werden nahezu gleiche Mengen an Rezeptorprotein aus nicht oder Insulin stimulierten Zellen mit dem  $\alpha$ -Insulinrezeptor-Antikörper immunpräzipitiert (Abb. 5.8, Bahn 7 und 8). Außerdem kann hier auch der nicht prozessierte Prorezeptor (~ 207 kDa) detektiert werden. In der Präzipitation mit  $\alpha$ -Phosphotyrosin-Antikörper wird ein Phosphateinbau von  $32015 \pm 680$  cpm in der  $\beta$ -Untereinheit des Rezeptors erhalten, der durch  $\alpha$ -Insulinrezeptor-Antikörper präzipitierte IR enthält  $14919 \pm 2010$  cpm Radioaktivität. Die Analyse der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung ergibt im ersten Fall einen relativen Serinphosphatanteil von 27 %, im zweiten Fall einen Anteil von 38 % an der Gesamtposphorylierung. Damit ergeben sich für die Verwendung der beiden Antikörper Unterschiede in den Ausbeuten und in der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung der beiden Protein-Präzipitationen, welche in der unterschiedlichen Spezifität der verwendeten Antikörper begründet sind (D. Teltng, persönliche Mitteilung). Trotz dieser Differenzen wird aber deutlich, daß die  $\beta$ -Untereinheit vor der Insulinstimulation zu einem hohen Grad an Serinresten vorphosphoryliert vorliegt. Nach Insulinstimulation ergibt sich unter Berücksichtigung des erhöhten Phosphorylierungsgrades der  $\beta$ -Untereinheiten der Rezeptoren eine absolute Zunahme der Phosphatinkorporation in Tyrosin- und Serinresten. Weder in den Präzipitaten des IR aus nicht Insulin noch aus Insulin stimulierten Zellen konnte eine Threoninphosphorylierung nachgewiesen werden.



**Abb. 5.8: *In situ* Autophosphorylierung des Insulinrezeptors in der CHO800 Zell-Linie.**  $1 \times 10^8$  CHO800 Zellen, welche  $1,6 \times 10^6$  Rezeptoren pro Zelle exprimieren, wurden über Nacht in Phosphat-freiem Medium gehalten und anschließend nach Zugabe von radioaktiv markiertem  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -Orthophosphat für 3 Stunden inkubiert. Die Stimulation der IR-Autophosphorylierung (30 min) erfolgte durch Zugabe von  $1 \times 10^{-7}$  M Insulin zum Kulturmedium. Als Kontrolle dienten nicht mit Insulin stimulierte Zellen. Nach Immunpräzipitation des Rezeptors durch einen polyklonalen  $\alpha$ -Phosphotyrosin- ( $\alpha$ -PY) oder  $\alpha$ -Insulinrezeptor-Antikörper ( $\alpha$ -IR) wurden die Präzipitate durch SDS-PAGE aufgetrennt und die  $\beta$ -Untereinheit durch Autoradiographie bzw. Western-Blot-Analyse lokalisiert. Die inkorporierte Radioaktivität wurde durch Messung der Cerenkov-Strahlung ermittelt und die Rezeptorproteine durch tryptische Spaltung aus den Gelbanden eluiert. Von einem Teil des Peptidgemisches wurde die Phosphoaminosäure-Zusammensetzung durch zweidimensionale Elektrophorese analysiert. **A:** Autoradiographie und Western-Blot-Analyse von Immunpräzipitaten des IR. links: Autoradiographie eines 7 %igen SDS-PAA-Geles. rechts: Immunologischer Nachweis des Insulinrezeptors in den jeweiligen Präzipitaten durch  $\alpha$ -IR-Antikörper. Molekulargewichtsmarker (Broad Range), Bahn 1, 2, 5, 6: Immunpräzipitation des IR mit dem  $\alpha$ -PY-Antikörper nach 30minütiger Stimulation in Ab- (1, 5) oder Anwesenheit (2, 6) von Insulin. Bahn 3, 4, 7, 8: Immunpräzipitation des IR mit dem  $\alpha$ -IR-Antikörper nach 30minütiger Stimulation in Ab- (3, 7) oder Anwesenheit (4, 8) von Insulin. **B:** Phosphoaminosäureanalyse des „*in situ*“-gelabelten IR nach Immunpräzipitation mit dem  $\alpha$ -PY-Antikörper. Autoradiographie nach zweidimensionaler Elektrophorese. **C:** Phosphoaminosäureanalyse der „*in situ*“-gelabelten IR nach Immunpräzipitation mit  $\alpha$ -IR-Antikörper. Autoradiographie nach zweidimensionaler Elektrophorese.

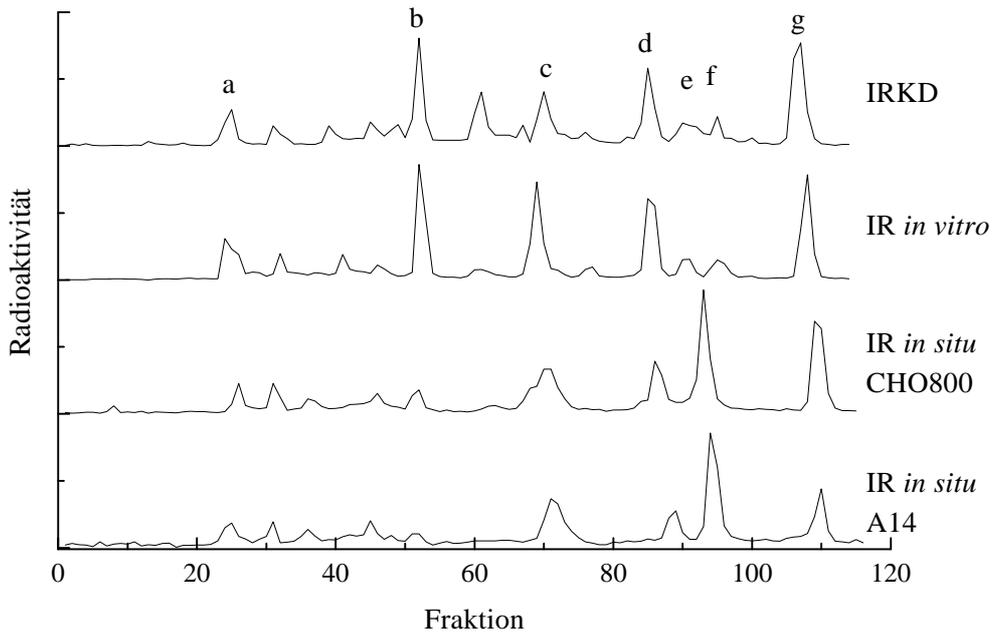
Abbildung 5.9 faßt die erhaltenen Ergebnisse für die Immunpräzipitation des Insulinrezeptors aus CHO800-Zellen grafisch zusammen.



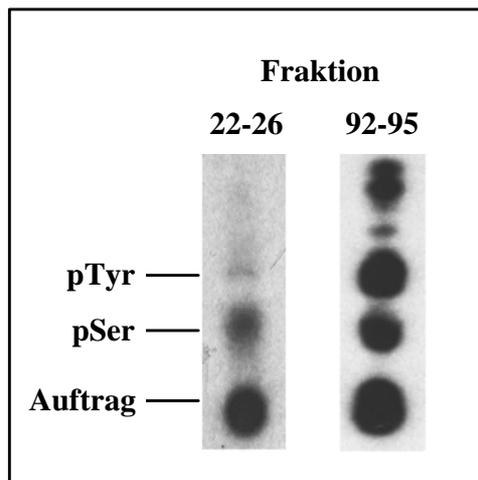
**Abb. 5. 9:** Grafische Darstellung des Phosphateinbaus in die  $\beta$ -Untereinheit des Insulinrezeptors und Analyse der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung der „*in situ*“-Autophosphorylierung des Insulinrezeptors aus der CHO800-Zell-Linie.

Die Analyse der Immunpräzipitate des IR aus der humanen Zell-Linie A14 zeigen vergleichbare Ergebnisse. Auch hier kann in den unstimulierten Zellen ein hoher Anteil an Phosphoserin in der  $\beta$ -Untereinheit detektiert werden. Die Insulin-Stimulation führt ebenfalls zu einer Erhöhung der Tyrosin- und Serinphosphorylierung (Daten nicht gezeigt), dabei ergeben sich vergleichbare Stimulationsraten in der Autophosphorylierung und der Phosphatinkorporation in Serinreste. Ob die beobachtete erhöhte Serinphosphorylierung auf die Besetzung der *in vitro* identifizierte Phosphorylierungsstellen Ser<sup>1275</sup> und Ser<sup>1309</sup> zurückzuführen ist, sollte durch den Vergleich der Phosphopeptidkartierungen der *in situ* autophosphorylierten Rezeptoren aus den CHO800 und A14 Zellen mit den Elutionsprofilen des Insulinrezeptors bzw. der IRKD nach *in vitro* Autophosphorylierung analysiert werden (Abb. 5.10). Dazu wurden die erhaltenen tryptischen Eluate durch HPLC-Anionenaustausch-Chromatographie aufgetrennt. In der Gegenüberstellung der einzelnen Elutiosprofile können zunächst Unterschiede in der Besetzung einzelner Tyrosin-Phosphorylierungsstellen beobachtet werden. Während im Profil des *in vitro* phosphorylierten IR und der löslichen Kinase IRKD die C-terminalen Phosphorylierungsstellen und die drei Tyrosine der katalytischen Domäne die stärksten radioaktiven Signale liefern (Fraktion b und g), sind im Vergleich dazu in den *in situ* phosphorylierten Rezeptoren diese Autophosphorylierungsstellen nur mäßig phosphoryliert. Hier liefert das stärkste Signal ein Peptid aus der katalytischen Domäne, in welchem die beiden Tyrosinreste 1150 und 1151 besetzt sind (Fraktion e). Dessenungeachtet führt die Autophosphorylierung *in situ* aber auch zu der Besetzung der beiden Serinphosphorylierungsstellen. Das Serinpeptid Ser<sup>1309</sup> (Fraktion a) kann sowohl in der phosphorylierten  $\beta$ -Untereinheit des IR aus den CHO800 als auch aus den A14 Zellen durch den direkten Vergleich der Retentionszeiten identifiziert werden. Eine nachfolgende Phosphoaminosäureanalyse dieser Fraktion zeigt, das in diesem Peak zu 98 % Phosphoserin enthalten ist. (Abb. 5.10 B). Im Gegensatz dazu ist das Serinpeptid Ser<sup>1275</sup> nicht direkt zu lokalisieren, da das bisphosphorylierte Tyrosinpeptid der katalytischen Domäne eine vergleichbare Retentionszeit besitzt. Werden aber die Fraktionen aufgrund der erwarteten Retentionszeit vereinigt und eine Phosphoaminosäureanalyse durchgeführt, zeigt sich ein hoher Anteil an Phosphoserin (~ 40 %). Dieser Sachverhalt scheint daher für die Anwesenheit auch dieses Phosphopeptids zu sprechen (Abb. 5.10 B).

A



B

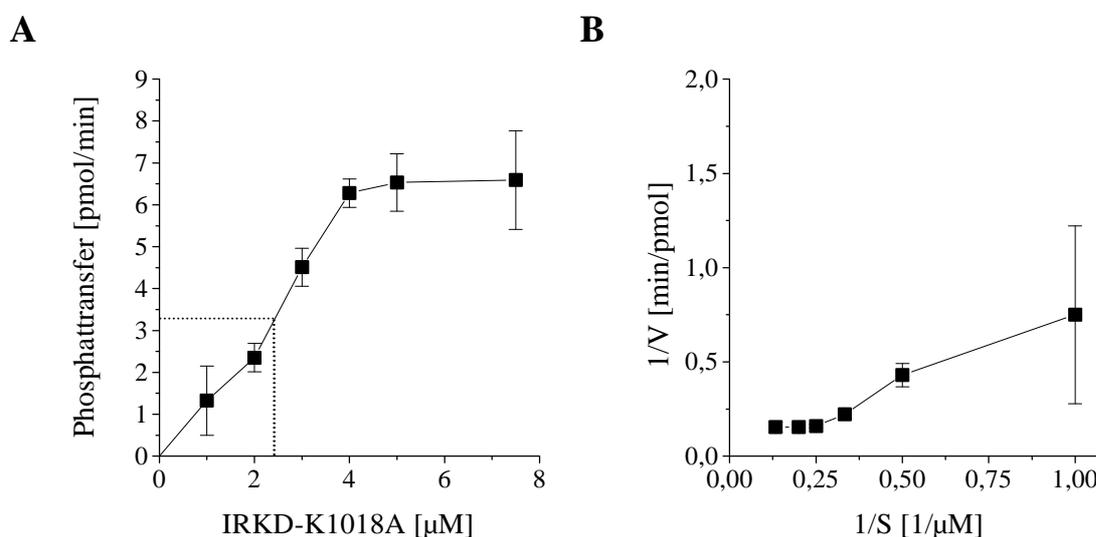


**Abb. 5.10: Vergleich der Phosphopeptidkartierungen des autophosphorylierten Insulinrezeptors, der löslichen Kinase IRKD und der *in situ* gelabelten  $\beta$ -Untereinheiten des Insulinrezeptors aus CHO800 und A14-Zellen. A:** HPLC-Anionenaustausch-Chromatographie der tryptischen Peptide. IR und IRKD (je 1  $\mu$ g Protein) wurden für 30 Minuten autophosphoryliert und durch SDS-PAGE getrennt. Nach tryptischer Elution wurden die erhaltenen Phosphopeptide durch HPLC-Anionenaustausch-Chromatographie getrennt. Das Elutionsprofil des autophosphorylierten Insulinrezeptors wurde freundlicherweise von Frau C. Magg zur Verfügung gestellt. Zur Phosphopeptidkartierung der *in situ* radioaktiv markierten Rezeptoren wurden die tryptischen Eluate der Gelbanden verwendet. Nach Tabelle 5.2 ergibt sich die Zuordnung der Retentionszeiten zu den Phosphopeptiden. **B:** Dünnschichtchromatographische Phosphoaminosäureanalyse der Peptide aus den Fraktionen 22-26 und 92-95 aus dem Elutionsprofil des IR aus CHO800 Zellen. Die Fraktionen wurden vereinigt und mit Chromabond-C8-Säulen rechromatographiert (Die Ausbeute in diesem Schritt betrug  $\sim 70\%$  der eingesetzten Radioaktivität). Im Anschluß erfolgte die saure Partialhydrolyse und dünnschichtchromatographische Auftrennung der Phosphoaminosäuren. Die Analyse der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung der Fraktionen aus dem Elutionsprofil des IR aus A14-Zellen zeigten identische Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

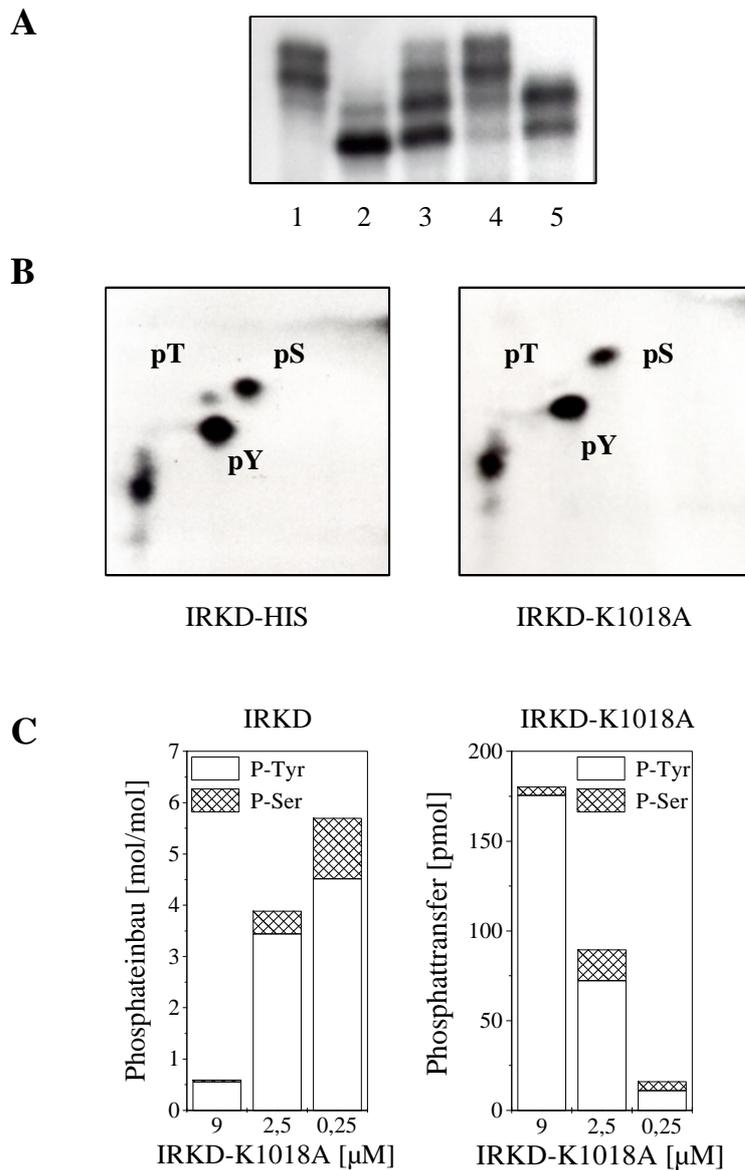
### 5.4.5 Die Serinphosphorylierung der IRKD-K1018A

Bei der Möglichkeit, die beiden Serinreste Ser<sup>1275</sup> und Ser<sup>1309</sup> in der Autophosphorylierungsreaktion zu besetzen, ergibt sich die Frage, ob diese Reaktion einem *trans*- oder *cis*-Mechanismus unterliegt. Ein Ansatz zur Untersuchung dieses Problems ist die Kombination der kinaseaktiven IRKD-HIS und der kinaseinaktiven IRKD-K1018A, welche sich aufgrund ihrer unterschiedlichen N-terminalen Struktur in ihrem apparenten Molekulargewicht in der denaturierenden SDS-PAGE unterscheiden. Durch diese Eigenschaft ist es möglich, beide Moleküle gemeinsam in einer Reaktion zu kombinieren, sie anschließend zu separieren, um sie dann getrennt hinsichtlich ihrer Phosphoaminosäure-Zusammensetzung und der Verteilung der einzelnen Phosphate der einzelnen Phosphate in die verschiedenen Phosphorylierungsstellen zu analysieren.

Zunächst wurde die kinaseinaktive Variante IRKD-K1018A hinsichtlich ihrer kinetischen Konstanten untersucht. Dazu wurde sie in variierenden Substratkonzentrationen mit der IRKD-HIS kombiniert und die Initialgeschwindigkeit der Substratphosphorylierung ermittelt. Die Reaktionsansätze enthielten 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin), 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP und 1  $\mu\text{M}$  der für 5 Minuten vorphosphorylierten IRKD-HIS. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Kinase gestartet, nach 0,5 bzw. 1 Minuten mittels Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Lokalisation der phosphorylierten Proteine durch Autoradiographie wurde die inkorporierte Radioaktivität in der IRKD-K1018A ermittelt (Abb. 5.11). Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit untersuchten Substraten (Kap. 6.2, Tab. 6.1) ergibt sich aus der Auftragung der Initialgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentration keine hyperbolische Funktion der Michaelis-Menten-Kinetik; vielmehr wird ein sigmoidaler Verlauf beschrieben, der auf einen allosterischen Prozeß der Phosphorylierung hindeutet. Daher lassen sich  $K_m$  und  $V_{max}$  für dieses Substrat nicht direkt bestimmen. Um dennoch einen Anhaltspunkt für die Größenordnung der kinetischen Konstanten zu erhalten, wurde der  $V_{max}$  bzw. der  $K_m$  Wert durch Extrapolation der maximal erzielten Geschwindigkeit und der halbmaximalen Geschwindigkeit der Reaktion bestimmt. Demnach ergibt sich für  $V_{max}$  ein Wert von etwa 146  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ , für den  $K_m$  ein Wert von 2,5  $\mu\text{M}$ . Daraus errechnet sich  $K_{cat}$  zu 6,6  $\text{min}^{-1}$  und  $k_{cat}/K_m$  zu  $2,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{min}^{-1}$ . Die kinaseinaktive IRKD-K1018A weist damit die höchste katalytische Effizienz aller untersuchten Substrate auf.



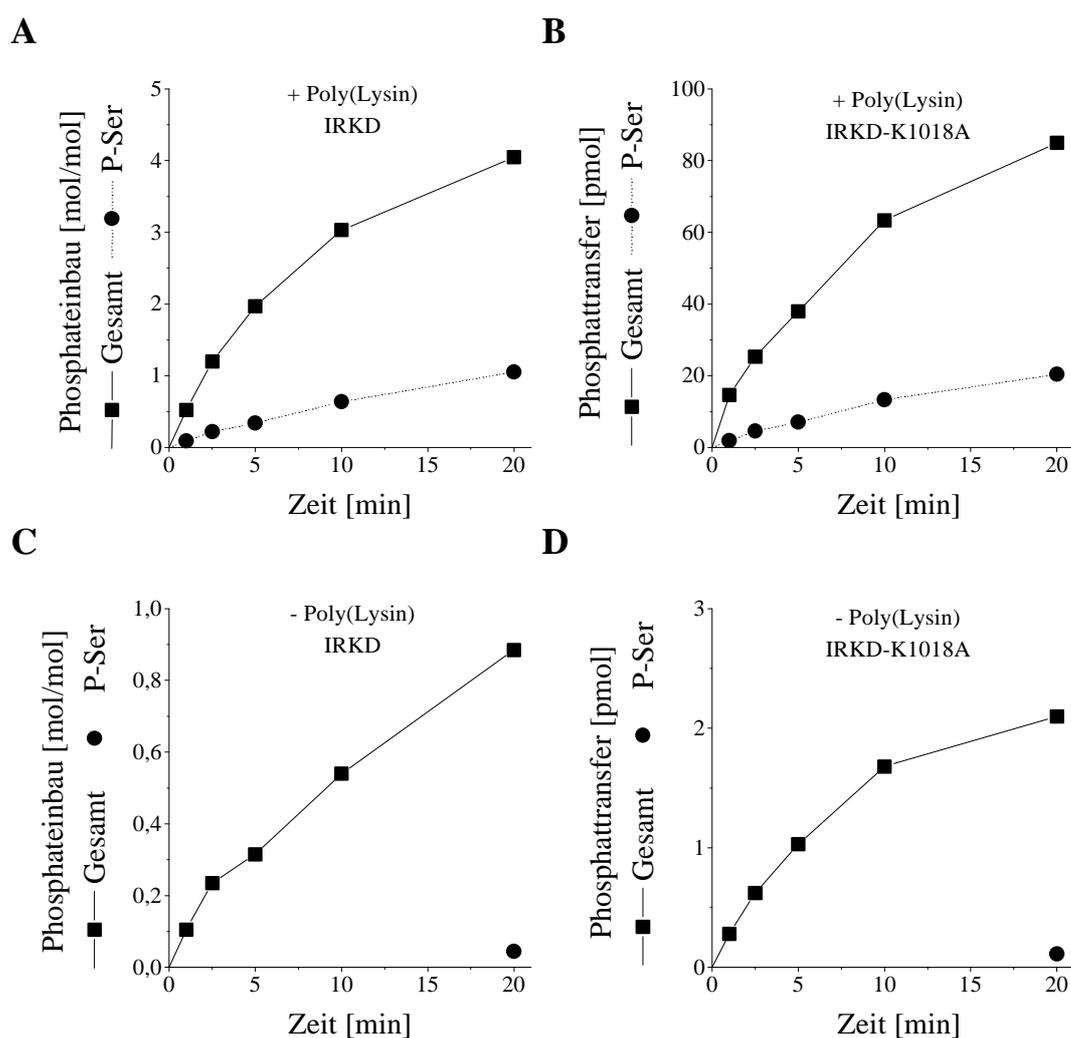
**Abb. 5.11: Die Substratphosphorylierung der IRKD-K1018A.** Die Ansätze enthielten 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin). Die Reaktionen wurden durch Zugabe der für fünf Minuten vorphosphorylierten IRKD-HIS (1  $\mu\text{M}$ ) gestartet und nach 0,5 bzw. 1 min durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Nach SDS-PAGE erfolgte die Bestimmung des Phosphateinbaus durch Messung der Cerenkov-Strahlung. **A:** Initialgeschwindigkeiten des Phosphotransfers. **B:** Doppelt reziproke Lineweaver-Burk-Auftragung.



**Abb. 5.12: Substratphosphorylierung der IRKD-K1018A durch die IRKD-HIS in Abhängigkeit von der Substratkonzentration.** Die Reaktionsansätze enthielten 1 µM Poly(Lysin), 250 µM [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP, IRKD-K1018A (9, 2,5, 0,25 µM) und 1 µM IRKD-HIS. Die Kontrolle enthielt 1 µM IRKD oder 1 µM IRKD-HIS ohne Substrat. Nach einer Reaktionszeit von 20 Minuten erfolgte nach SDS-PAGE die Bestimmung des Phosphat-einbaus und die Analyse der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung. **A:** Autoradiographie nach SDS-PAGE. 1: IRKD-HIS, 2: 9 µM IRKD-K1018A, 1 µM IRKD-HIS, 3: 2,5 µM IRKD-K1018A, 1 µM IRKD-HIS, 4: 0,25 µM IRKD-K1018A, 1 µM IRKD-HIS, 5: IRKD. **B:** Phosphoaminosäure-Zusammensetzung der IRKD-HIS (1 µM) und IRKD-K1018A (2,5 µM). Autoradiographie nach zweidimensionaler Elektrophorese der Proben aus Bahn 4. **C:** Auswertung der Phosphatinkorporation und Phosphoaminosäure-Zusammensetzung.

Im folgenden wurden konzentrationsabhängige Substratphosphorylierungsreaktionen mit der kinaseinaktiven IRKD-K1018A und der IRKD-HIS durchgeführt. Die Reaktionsansätze enthielten 1 µM Poly(Lysin) und 250 µM [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP, 9, 2,5 bzw. 0,25 µM IRKD-K1018A und 1 µM IRKD-HIS. Als Kontrolle wurde die IRKD und die IRKD-HIS ohne Substrat in einer Autophosphorylierungsreaktion eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe der IRKD-HIS gestartet und nach 20 Minuten durch SDS-Probenpuffer beendet. Nach SDS-PAGE, Lokalisierung der Kinasebanden im Gel durch Autoradiographie und Messung der inkorporierten Radioaktivität wurden die Proteine tryptisch eluiert und die Phosphoaminosäure-Zusammensetzung untersucht. In Anwesenheit von 9 µM IRKD-K1018A ist in der Autoradiographie (Abb. 5.12 A, Bahn 2) eine distinkte Substratbande zu erkennen. Die hohe

Substratkonzentration führt zu einer starken Inhibition der Autophosphorylierung der IRKD-HIS; das Enzym inkorporiert 0,6 mol/mol. Allerdings scheint diese Inhibition den Phosphotransfer nicht zu beeinträchtigen, der Phosphateinbau beträgt in der IRKD-K1018A 180,3 pmol. In Anwesenheit von 2,5  $\mu\text{M}$  Substrat ( $1 \times K_m$ ), inkorporiert die aktive Kinase 3,9 mol/mol, die Phosphatinkorporation der IRKD-K1018A beträgt 90 pmol (Bahn 3). In Gegenwart von 0,25  $\mu\text{M}$  Substrat zeigt die IRKD-HIS eine im Vergleich zur Kontrollreaktion leicht erhöhte Phosphatinkorporation (5,7 mol/mol), im Substrat werden 16 pmol Phosphat inkorporiert. Die Analyse der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung beider Proteine ergibt eine detektierbare Serinphosphorylierung (Abb. 5.12 B). Dabei nimmt mit steigender Substratkonzentration der prozentuale Anteil der Serinphosphatinkorporation im Vergleich zur der Gesamtphosphorylierung in der Kinase und dem Substrat kontinuierlich ab. Demnach scheint sich hier eine Abhängigkeit der Serinphosphorylierung von der Substratkonzentration zu ergeben (5.12 C).

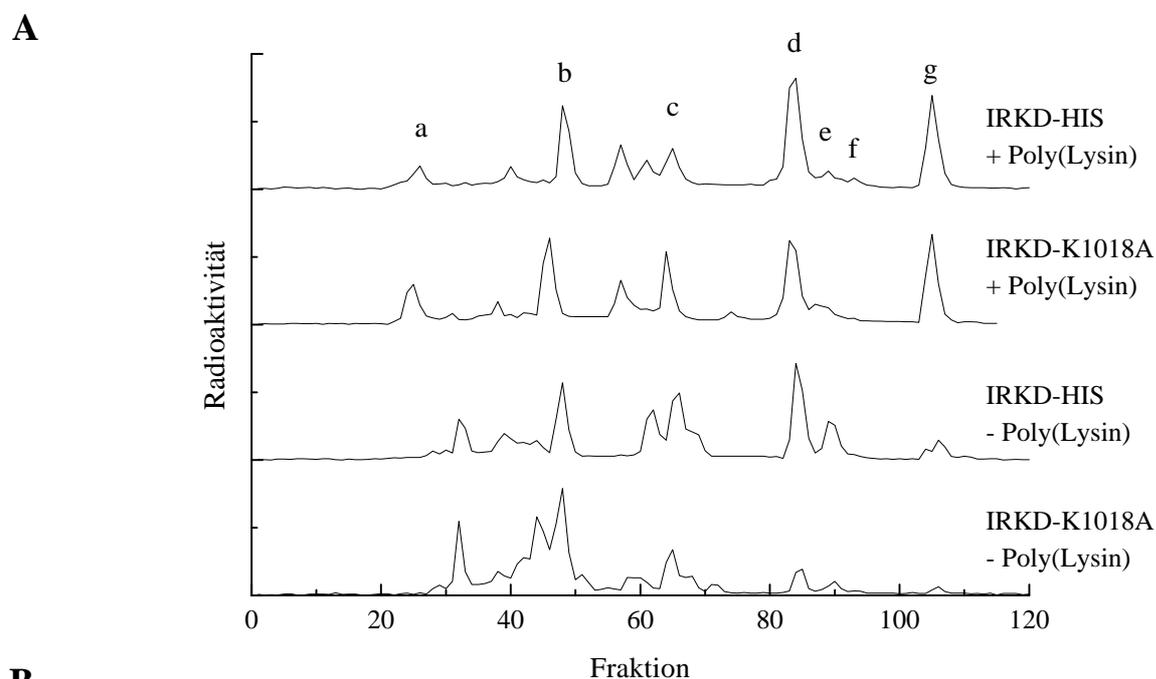


**Abb. 5.13: Zeitverlauf der IRKD-K1018A-Substratphosphorylierung durch die IRKD-HIS in An- oder Abwesenheit von Poly(Lysin).** Die Reaktionsansätze enthielten 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP, 2,5  $\mu\text{M}$  IRKD-K1018A und 1  $\mu\text{M}$  IRKD-HIS. Nach der Reaktion wurden die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt der Phosphateinbau und die Phosphoaminosäure-Zusammensetzung ermittelt. **A/C:** Phosphateinbau in die IRKD in An- bzw. Abwesenheit von Poly(Lysin). **B/D:** Phosphatinkorporation in die IRKD-K1018A in An- bzw. Abwesenheit von Poly(Lysin).

Im folgenden Experiment wurde unter Berücksichtigung des apparenten  $K_m$ -Wertes eine zeitabhängige Substratphosphorylierung der IRKD-K1018A mit der IRKD-HIS in einem Verhältnis von 2,5 : 1 durchgeführt. Dabei sollte auch der Einfluß der Poly(Lysin)-Stimulation auf diese Reaktion

analysiert werden. Die Reaktion wurde durch Zugabe der aktiven Kinase gestartet. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und die Reaktion durch Zufügen von SDS-Probenpuffer beendet. Nach SDS-PAGE und Lokalisation der Kinasebanden durch Autoradiographie wurde der jeweilige Phosphateinbau in die Moleküle durch Messung der Cerenkov-Strahlung ermittelt (Abb. 5.13). In der Poly(Lysin) stimulierten Reaktion beschreibt der Phosphateinbau in die IRKD-HIS einen Sättigungsverlauf (Abb. 5.13 A). Allerdings ist die Sättigung nach 20 Minuten noch nicht erreicht, der Phosphateinbau beträgt 4 mol/mol Enzym. Die Initialgeschwindigkeit der Autophosphorylierungsreaktion im Vergleich zu einer Autophosphorylierungsreaktion ohne Substrat deutlich verlangsamt (Kap. 4.3) und beträgt  $23 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ . Im Gegensatz dazu ist der Phosphotransfer auf das kinase-inaktive Molekül um den Faktor 3 schneller, die Initialgeschwindigkeit beträgt  $65 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  (Abb. 5.13 B). Andere Verhältnisse ergeben sich bei der nicht Poly(Lysin) stimulierten Reaktion. Hier ist die Autophosphorylierung der aktiven Kinase dem Phosphotransfer auf das Substrat bevorzugt. Die Initialgeschwindigkeit der Autophosphorylierungsreaktion beträgt  $9,3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , der spezifische Phosphateinbau nach der Reaktionszeit von 20 Minuten  $1,77 \text{ mol/mol Kinase}$  (Abb. 5.13 C). Auf die IRKD-K1018A werden nach 20 Minuten Reaktionszeit 2 pmol Phosphat übertragen, die Initialgeschwindigkeit der Reaktion beträgt  $1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  (Abb. 5.13 D). Zur Analyse der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung wurden die isolierten Gelbanden einer tryptischen Gelelektion unterworfen, die erhaltenen tryptische Phosphopeptide sauer hydrolysiert und eine dünnschichtchromatische Auftrennung der lyophilisierten Hydrolysate vorgenommen. Sowohl in der IRKD-HIS als auch im Substrat ist die Phosphorylierung von Serinresten nachweisbar. Der prozentuale Anteil der Serinphosphorylierung an der Gesamtphosphorylierung der IRKD-HIS nach Poly(Lysin)-Stimulation beträgt in diesem Versuch 26 % ( $1,04 \text{ mol/mol}$ ), die Initialgeschwindigkeit  $4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  und ist damit in den kinetischen Konstanten der Serinautophosphorylierung ohne Substrat identisch (Kap. 4.3). Im Gegensatz dazu sind die ermittelten Werte für die Serinphosphorylierung im Substrat verdoppelt. Der Anteil an phosphorylierten Serinresten an der Gesamtphosphorylierung beträgt 24 %, die Initialgeschwindigkeit kann mit  $8,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  angegeben werden. In der nicht Poly(Lysin) stimulierten Reaktion kann zu den frühen Zeitpunkten der Reaktion keine signifikante Serinphosphorylierung oberhalb der Nachweisgrenze der Dünnschichtchromatographie beschrieben werden, nach 20 Minuten Reaktionszeit lassen sich im Substrat und in der IRKD-HIS etwa 5 % Phosphoserin detektieren. Die vorherigen Experimente zeigten, daß die IRKD-HIS in der Lage ist eine Serinphosphorylierung in der IRKD-K1018A zu katalysieren. Ob dieser Serinphosphorylierung die Besetzung der Serinphosphorylierungsstellen Ser<sup>1275</sup> und Ser<sup>1309</sup> zu Grunde liegt, wurde durch die Methode der Phosphopeptidkartierung analysiert. Desweiterem wurde der Phosphorylierungsstatus der IRKD-K1018A in Abwesenheit von Poly(Lysin) untersucht. Dazu wurde das inaktive Protein ( $2,5 \mu\text{M}$ ) für 20 Minuten durch die IRKD-HIS ( $1 \mu\text{M}$ ) in An- oder Abwesenheit von  $1 \mu\text{M}$  Poly(Lysin) phosphoryliert, die Reaktion mittels Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet und die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach tryptischer Elution der erhaltenen Gelbanden wurden die Phosphopeptide durch Anionenaustausch-Chromatographie aufgetrennt (Abb. 5.14 A). Die korrespondierenden Elutionsprofile zeigen, daß es in der relativen Verteilung der Phosphate in die einzelnen Tyrosinphosphorylierungsstellen nach der Substratphosphorylierungsreaktion kaum Unterschiede zu dem Phosphorylierungsmuster der autophosphorylierten IRKD gibt (Kap. 4.4.2, Abb. 4.6). Die Phosphorylierung führt sowohl in der aktiven Kinase als auch in der IRKD-K1018A zur Besetzung der beiden C-terminalen Tyrosinreste Tyr<sup>1316</sup> und Tyr<sup>1322</sup> und der Tyrosinphosphorylierungsstellen der katalytischen Domäne. Desweiteren wird in beiden Proteinen die Phosphorylierung der Serinphosphorylierungsstellen Ser<sup>1275</sup> und Ser<sup>1309</sup> detektiert. Allerdings ergeben sich hier leichte Unterschiede in der Besetzung (Abb. 5.14 B). Während sich die Phosphate in der IRKD-HIS gleichmäßig auf beide Positionen zu verteilen scheinen, wird in der IRKD-K1018A bevorzugt das Ser<sup>1309</sup> phosphoryliert. Die Summe der Anteile ist aber in beiden Fällen identisch und beträgt etwa 10 %. Zusammengefaßt zeigt der Versuch, daß alle durch die Phosphopeptidkartierung analysierbaren Autophosphorylierungsstellen der IRKD-K1018A für die aktive Kinase zugänglich sind. Damit scheint ein *trans*-Phosphorylierungsmechanismus der Serinphosphorylierung möglich. In der Phosphorylierungsreaktion in Abwesenheit von Poly(Lysin) zeigt die IRKD-HIS ein ähnliches Phosphorylierungsmuster wie die IRKD. Die meisten Phosphate finden sich in den C-terminalen Phosphorylierungsstellen (Fraktion b) und in den mono-Formen der katalytischen Domäne (Fraktion c; vgl. Abb. 4.7). Die

Phosphorylierung der beiden Serinphosphorylierungsstellen ist dagegen nur schwach ausgeprägt. In der IRKD-K1018A finden sich die meisten Phosphate in den C-terminalen Phosphorylierungsstellen; die Phosphorylierung der Tyrosinreste in der katalytischen Domäne ist gering (Fraktion c, d, e, g). Dieser Umstand drückt sich auch in der sehr niedrigen Phosphateinbaurrate des Substrates aus.



**B**

		+ Poly(Lysin)		- Poly(Lysin)	
		IRKD-HIS	IRKD-K1018A	IRKD-HIS	IRKD-K1018A
Phosphateinbau [pmol]:		39	90	19	2
Fraktion	Phosphorylierungsstelle	Phosphatgehalt [%]			
a	Ser1309	4	8	1	-
b	Tyr1316/22	14	15	12	20
c	Tyr1146 oder Tyr1150 oder Tyr1151	9	11	15	10
d	Tyr1146/50 oder Tyr1146/51	-	16	-	4
e	Tyr 1150 und Tyr1151	-	5	-	3
f	Ser 1275	3	1	1	1
g	Tyr 1146, 1150, 1151	15	15	4	2

**Abb. 5.14: A: Anionenaustausch-Chromatographie tryptischer Peptide von IRKD-HIS und IRKD-K1018A.** Der Reaktionsansatz enthielt 1  $\mu\text{M}$  oder kein Poly(Lysin), 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP, 2,5  $\mu\text{M}$  IRKD-K1018A und 1  $\mu\text{M}$  IRKD. Die Reaktion wurde durch Zugabe der aktiven Kinase gestartet, nach 20 Minuten durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet und die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Im Anschluß erfolgte die tryptische Elution der Gelbanden und die Auftrennung der erhaltenen Peptide durch Anionenaustauschchromatographie. **B:** Relative Verteilung der Phosphate in den Phosphorylierungsstellen der IRKD-HIS und IRKD-K1018A. Eine Aussage über die Verteilung der Phosphate in die bis-phosphorylierten Formen der katalytischen Domäne in der IRKD-HIS ist nicht möglich, da in diesem Bereich phosphorylierte Peptide aus dem heterologen N-terminalen Fusionsanteil eluieren (Al-Hasani 1995).

## 6 Die Duale Kinaseaktivität der IRKD in der Substratphosphorylierung

### 6.1 Konstruktion, Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen

#### 6.1.1 Das Glutathion-S-Transferase-Expressionssystem in *E. coli*

Die Glutathion-S-Transferase (GST), ein 28 kDa Protein aus *Schistosoma japonicum*, bindet das Tripeptid Glutathion (GSH) mit sehr hoher Affinität. Dieser Umstand erlaubt es, das Protein an einer Säule mit immobilisiertem Glutathion zu binden und es anschließend mit freiem GSH zu eluieren. Damit ist es möglich, andere Proteine oder Proteindomänen, die als Fusionsproteine N- oder C-terminal mit GST exprimiert werden, durch Affinitätschromatographie zu reinigen. Für die Klonierung und Expression der GST-Fusionsproteine wurde in dieser Arbeit der Expressionsvektor pGEX-3X verwendet. In diesem Vektor steht das Gen für die GST unter der Kontrolle des induzierbaren *tac*-Promotors. Zusätzlich enthält der Vektor das *lacI<sup>q</sup>*-Gen, welches für den Repressor des Lac-Operons kodiert. In Abwesenheit von Lactose wird die Expression des GST-Proteins reprimiert. Durch die Zugabe des nicht hydrolysierbaren Lactose-Analogons IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid) zum Kulturmedium kann der Repressor in seine inaktive Form überführt und somit die Expression des GST-Fusionproteins induziert werden. Eine Klonierungsstelle am 3'-Ende der GST-cDNA-Sequenz erlaubt es, Proteine in das Leseraster der GST zu klonieren. Zusätzlich befindet sich zwischen der kodierenden Sequenz der GST und der MCS eine Region, die für die Erkennungssequenz einer Serinprotease (Blutgerinnungsfaktor Xa) kodiert, die eine spätere Abspaltung des GST-Anteils erlaubt.

#### 6.1.2 Konstruktion, Expression und Reinigung der GST-Fusionsproteine GST-JM, GST-Ex20, GST-CT, GST-CTphe und GST-CTthr

Für die Untersuchung der Substratphosphorylierungsreaktion der IRKD wurden die Fusionsproteine GST-JM, GST-Ex20, GST-CT, GST-CTphe und GST-CTthr verwendet. Die Substrate enthalten die Proteinsequenzen, welche sich aus den jeweiligen funktionellen Domänen des Rezeptors ableiten und beinhalten ein oder mehrere Autophosphorylierungsstellen. Interessanterweise korrelieren diese Domänen direkt mit der Exon-Struktur des Gens (Seino et al. 1990).

Das GST-JM Fusionsprotein enthält die Sequenz aus dem Juxtamembran-Bereich des IR (Gly<sup>947</sup>-Val<sup>1020</sup>, Exon 16) und wurde von Al-Hasani (1995) konstruiert. Das Peptid enthält die Tyrosinphosphorylierungsstelle Tyr<sup>960</sup> des IR. Das GST-Ex20 Fusionsprotein wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Lehr konstruiert (Lehr 1995) und entspricht der Aminosäuresequenz Phe<sup>1139</sup>-Asp<sup>1179</sup>. Es enthält die katalytische Domäne der Rezeptorkinase mit den drei Tyrosinautophosphorylierungsstellen Tyr<sup>1146</sup>, Tyr<sup>1150</sup> und Tyr<sup>1151</sup>. Der Expressionsvektor pGEX-CT kodiert für ein C-terminales Fusionsprotein des humanen IR und wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Goder 1995 dargestellt. Das resultierende Protein umfaßt die Aminosäuren Asp<sup>1249</sup>-Ser<sup>1343</sup>, enthält aber, im Gegensatz zur humanen IR-Sequenz, zusätzlich die Punktmutation Cys<sup>1296</sup> gegen Serin, die eine bessere Löslichkeit des Proteins bewirkt (Goder 1995). Neben den beiden Tyrosinphosphorylierungsstellen Tyr<sup>1316</sup> und Tyr<sup>1322</sup> beinhaltet das Protein auch die beiden Serinautophosphorylierungsstellen Ser<sup>1275</sup> und Ser<sup>1309</sup>.

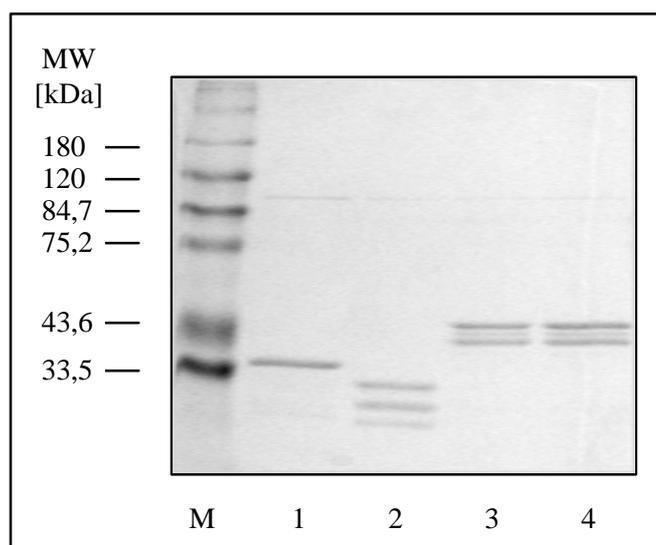
Für eine spezifische Charakterisierung der Serinphosphorylierung in Substratphosphorylierungsreaktionen wurden, ausgehend von dem pGEX-CT-Expressionsvektor, zwei weitere Vektoren konstruiert, in denen die beiden Tyrosinphosphorylierungsstellen gegen Phenylalanin bzw. Threonin substituiert wurden (Bezeichnung in dieser Arbeit: GST-CTphe und GST-CTthr). Die Mutationen wurden in Analogie zu den Mutationen in den löslichen Insulinrezeptorkinasen (IRKD-Y1316/33F und IRKD-Y1316/22T) unter Verwendung der entsprechenden Mutagenese-Primer nach dem Verfahren von Deng und Nickoloff eingeführt und durch Restriktionskartierung und Sequenzierung verifiziert. Abbildung 6.1 zeigt die resultierende Aminosäuresequenzen aller verwendeten Peptide nach Abspalten des GST-Anteils.

JM-Peptid					
↓ Gly <sup>947</sup>					
<i>gip</i> GLPGPLY	ASSNPEYLSA	SDVFPCSVYV	PDEWEVSREK	ITLLRELQGS	SFGMVYEGNA
RDIKGEAET	RVAVKTVgns	s			
	↑ Val <sup>1020</sup>				
Ex20-Peptid					
↓ Phe <sup>1139</sup>					
<i>gil</i> FGMTRDI	<b>YETDYYRKGG</b>	KGLLPVRWMA	PESLKDGVFT	TSS <i>Dm</i> nss	
				↑ Asp <sup>1179</sup>	
CT-Peptid					
↓ Asn <sup>1249</sup>					↓
<i>gip</i> NLLKDDL	HPSFPEVSFF	HSEENKAPES	EELEMEFEDM	ENVPLDRSSH	SQREEAGGRD
GGSSLGFKRS	<b>YEEHIPYTHM</b>	NGGKKNRIL	TLPRSNPS		
			↑ Ser <sup>1343</sup>		
CTphe-Peptid					
↓ Asn <sup>1249</sup>					
<i>gip</i> NLLKDDL	HPSFPEVSFF	HSEENKAPES	EELEMEFEDM	ENVPLDRSSH	SQREEAGGRD
GGSSLGFKRS	<b>FEEHIPFTHM</b>	NGGKKNRIL	TLPRSNPS		
	↑    ↑		↑ Ser <sup>1343</sup>		

**Abb. 6.1: Aminosäuresequenz der rekombinanten IR-Peptide nach proteolytischer Spaltung der Fusionsproteine.** Die Doppelpfeile geben die korrespondierenden Aminosäurepositionen im IR an (Sequenz nach Ullrich et al. 1985). Das JM-Peptid enthält 81 Aminosäuren (8,7 kDa), das Ex20-Peptid 48 Aminosäuren (5,3 kDa) und die C-terminalen Proteine 101 Aminosäuren (11,1 kDa). Heterologe Aminosäuren, die vom Expressionsvektor kodiert werden, sind durch Kleinbuchstaben und Kursivdruck hervorgehoben. Tyrosin- und Serinphosphorylierungsstellen sind jeweils durch Fettdruck, eingeführte Mutationen sind durch einen einfachen Pfeil gekennzeichnet.

### 6.1.3 Expression und Reinigung der Fusionsproteine

Für die Expression der Fusionsproteine wurde der *E. coli* Bakterienstamm DH5 $\alpha$  verwendet. Vier Stunden nach der Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von IPTG in das Kulturmedium wurden die Bakterien abzentrifugiert, das Pellet in Lysispuffer resuspendiert und die Zellen durch Sonifikation aufgeschlossen. Mit dem erhaltenen cytosolischen Überständen wurden Affinitätschromatographien mit Glutathion-Sepharose durchgeführt. Nach Elution mit Glutathion waren die jeweiligen Proteinpräparationen bereits nahezu homogen, so daß eine weitere Reinigung erspart blieb (Abb. 6.2). Allerdings zeigten sich in den Eluatzen einiger Expressionsprodukte weitere Proteinbanden, die durch Western-Blot-Analyse als Abruchfragmente identifiziert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Die durchschnittliche Ausbeute an den jeweiligen Fusionsproteinen betrug zwischen 8 und 12 mg/l Bakterienkultur. Für die Bestimmung der kinetischen Konstanten der Substratphosphorylierung wurden die IR-Peptide vom GST-Anteil durch die Protease Faktor Xa gespalten und jeweils über eine C8-Reversed-Phase-HPLC gereinigt (Lehr 1995, Goder 1995, Al-Hasani 1995, Müller 1997).



**Abb. 6.2: Reinigungsgel der Insulinrezeptorfusionsproteine.** Aufgetragen wurden jeweils 2  $\mu\text{g}$  Fusionsprotein. M: Molekulargewichtsmarker (Broad Range), 1: GST-JM, 2: GST-Ex20, 3: GST-CTphe, 4: GST-CT. SDS-PAGE, Peptidfärbung nach Blakesley und Boezi (1977).

## 6.2 Kinetische Konstanten der Substratphosphorylierung

Zur Charakterisierung der Kinaseaktivität der Insulinrezeptorkinase bezüglich exogener Substrate werden im allgemeinen natürlich vorkommende Proteine, wie z.B. Histon 2b und *Myelin Basic Protein* oder natürliche Substrate verwendet. Zur letzteren Gruppe zählen die vom Rezeptor abgeleiteten Proteine, d.h. Domänen oder Peptide, die Autophosphorylierungsstellen enthalten, oder Substrate, die von der Kinase in der Zelle erkannt und phosphoryliert werden. In dieser Arbeit wurden für die Untersuchung der kinetischen Konstanten der Substratphosphorylierungsreaktion Proteine aus allen genannten Klassen verwendet. Dazu wurden für diese Arbeit im Rahmen von Diplomarbeiten die initialen Reaktionsgeschwindigkeiten in Gegenwart der betreffenden Substrate untersucht (Lehr 1995, Müller 1997). Die Reaktionsansätze enthielten das entsprechende Substrat in variierenden Konzentrationen, 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP, 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin). Die Reaktionen wurden durch Zugabe der zuvor für 5 Minuten autophosphorylierten Kinase gestartet und nach einer Reaktionszeit von 0,5 bzw. 1 Minute mittels SDS-Probenpuffer beendet. Nach Auftrennen der Proteine durch SDS-PAGE wurde die inkorporierte Radioaktivität durch Messung der Cerenkov-Strahlung ermittelt. Die aus diesen Analysen abgeleiteten kinetischen Konstanten sind in Tabelle 6.1 zusammengefaßt.

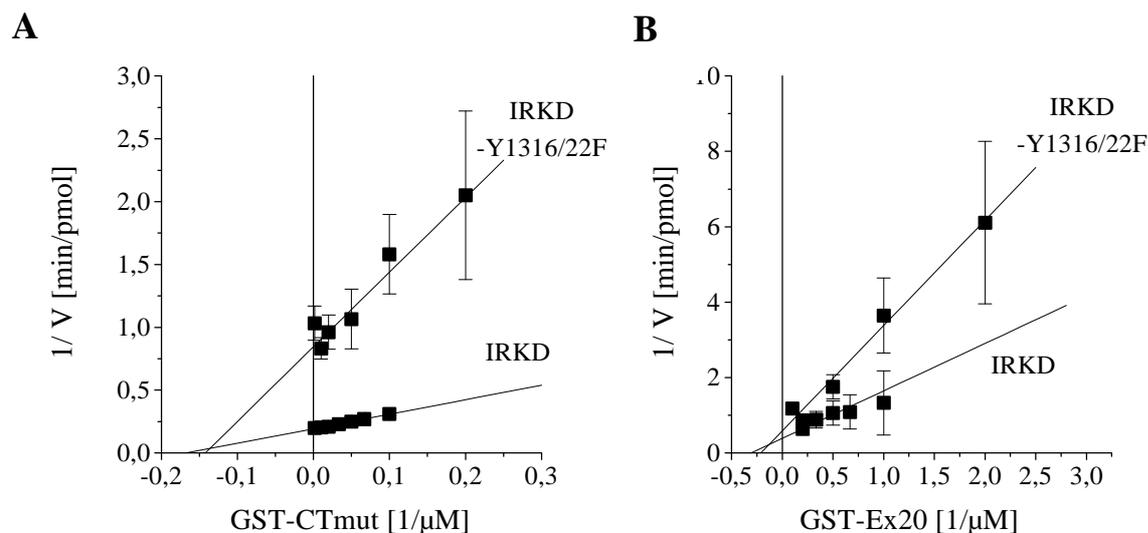
Die ermittelten apparenten Konstante für  $K_m$  und  $V_{\text{max}}$  sind für die untersuchten Substrate stark verschieden. Der Vergleich zeigt, daß die vom Insulinrezeptor abgeleiteten Substrate deutlich den künstlichen Substraten vorgezogen werden. Als ein sehr gutes Substrat erweist sich ferner ein rekombinantes Fragment, welches vom humanen IRS-1 abgeleitet ist. Das 30 kDa große Fragment hIRS-1 p30 enthält die zentrale Phosphorylierungsdomäne dieses Insulinrezeptor-Signalproteins (Asp<sup>516</sup> - Pro<sup>777</sup>) mit neun potentiellen Tyrosin- und neun potentiellen Serin-/ Threoninphosphorylierungsstellen. Das Protein wird durch Überexpression in *E. coli* und sequentielle Kationen- und Anionenaustausch-Chromatographie erhalten und wurde für diese Arbeit freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Müller-Wieland zur Verfügung gestellt (Siemeister et al. 1995). Als Maß für die katalytische Effizienz eines Enzyms gilt der Ausdruck  $k_{\text{cat}}/K_m$ , in den die Substratbindung und die Geschwindigkeit der Reaktion eingehen. Die katalytischen Effizienzen der natürlichen Substrate weisen eine, um bis zu zwei Zehnerpotenzen höhere, katalytische Effizienz auf, als die künstlichen Substrate Histon 2b und *Myelin Basic Protein*.

Substrat	app. $K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	app. $V_{\max}$ [ $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ]	$k_{\text{cat}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$k_{\text{cat}}/K_m$ [ $\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ ]
Histon 2b	$89 \pm 10$	$88 \pm 12$	3,9	$4,4 \times 10^4$
MBP	$322 \pm 36$	$51 \pm 11$	2,3	$7,1 \times 10^3$
GST-JM	$10,5 \pm 0,5$	$2,3 \pm 0,1$	0,1	$9,5 \times 10^3$
GST-Ex20	$28 \pm 6$	$53,9 \pm 2,1$	2,4	$8,6 \times 10^4$
GST-CT	$6,1 \pm 0,5$	$117,0 \pm 3,6$	5,2	$8,5 \times 10^5$
JM-Peptid	$4,2 \pm 0,2$	$81,7 \pm 7,6$	3,7	$8,8 \times 10^5$
Ex20-Peptid	$5,5 \pm 0,6$	$17,4 \pm 1,5$	0,8	$1,4 \times 10^5$
CT-Peptid	$4,8 \pm 0,5$	$13,2 \pm 1,3$	0,6	$1,3 \times 10^5$
hIRS-1 p30	$11,9 \pm 0,8$	$114,9 \pm 18,6$	5,2	$4,4 \times 10^5$

**Tab. 6.1: Apparente kinetische Konstanten der Substrate der IRKD.**

Unter den natürlichen Substraten heben das C-terminale Fusionsprotein und das aus der katalytischen Domäne des Rezeptors abgeleitete Substrat GST-Ex20 deutlich von den übrigen Proteinen hervor. Die GST-Fusionsproteine und die daraus durch Spaltung mit der Protease Faktor Xa erhaltenen Peptide zeigen Unterschiede in den einzelnen  $K_m$ - als auch in den  $V_{\max}$ -Werten. Es ist bemerkenswert, daß die Abspaltung der GST-Fusionsproteinanteils bei allen Fusionsproteinen zu einer Erniedrigung des  $K_m$ -Wertes führt. Im Gegensatz dazu erniedrigen sich die  $V_{\max}$ -Werte für das CT- und Ex20-Peptid, für das JM-Peptid wird eine Steigerung des  $V_{\max}$ -Wertes beobachtet. Insgesamt liegen aber alle erhaltenen  $K_m$ -Werte für die vom Rezeptor abgeleiteten und natürlichen Substrate im niederen mikromolaren Bereich. Diese niedrigen Werte sind insofern interessant, da sich für kurze synthetische Peptide, die die entsprechenden Phosphorylierungsstellen beinhalten,  $K_m$ -Werte ergeben, die millimolaren Konzentrationen entsprechen (Stadtmauer und Rosen 1986, Shoelson et al. 1992). Demnach ist für die Substraterkennung nicht nur die direkte Umgebung der Phosphorylierungsstelle entscheidend, vielmehr müssen auch Strukturen in weiter entfernten Regionen eine Rolle spielen. Ein Unterschied zu Serinkinasen sind die hier erhaltenen Wechselzahlen, die für alle Substrate sehr niedrige Werte ergeben; jedoch stimmen sie in den Größenordnungen mit gefundenen Werten für andere Tyrosinkinasen überein (Affüpper 1997, Al-Hasani 1995, Walker et al. 1987, Pike et al. 1984, Richert et al. 1982, Graziani et al. 1983). Demnach ist für die Signalweiterleitung der Rezeptorkinase nicht alleine die Quantität der Phosphorylierung und damit die Multiplikation des Signales entscheidend, vielmehr deutet dieser Befund auf eine hohe Qualität und Spezifität des Signals hin.

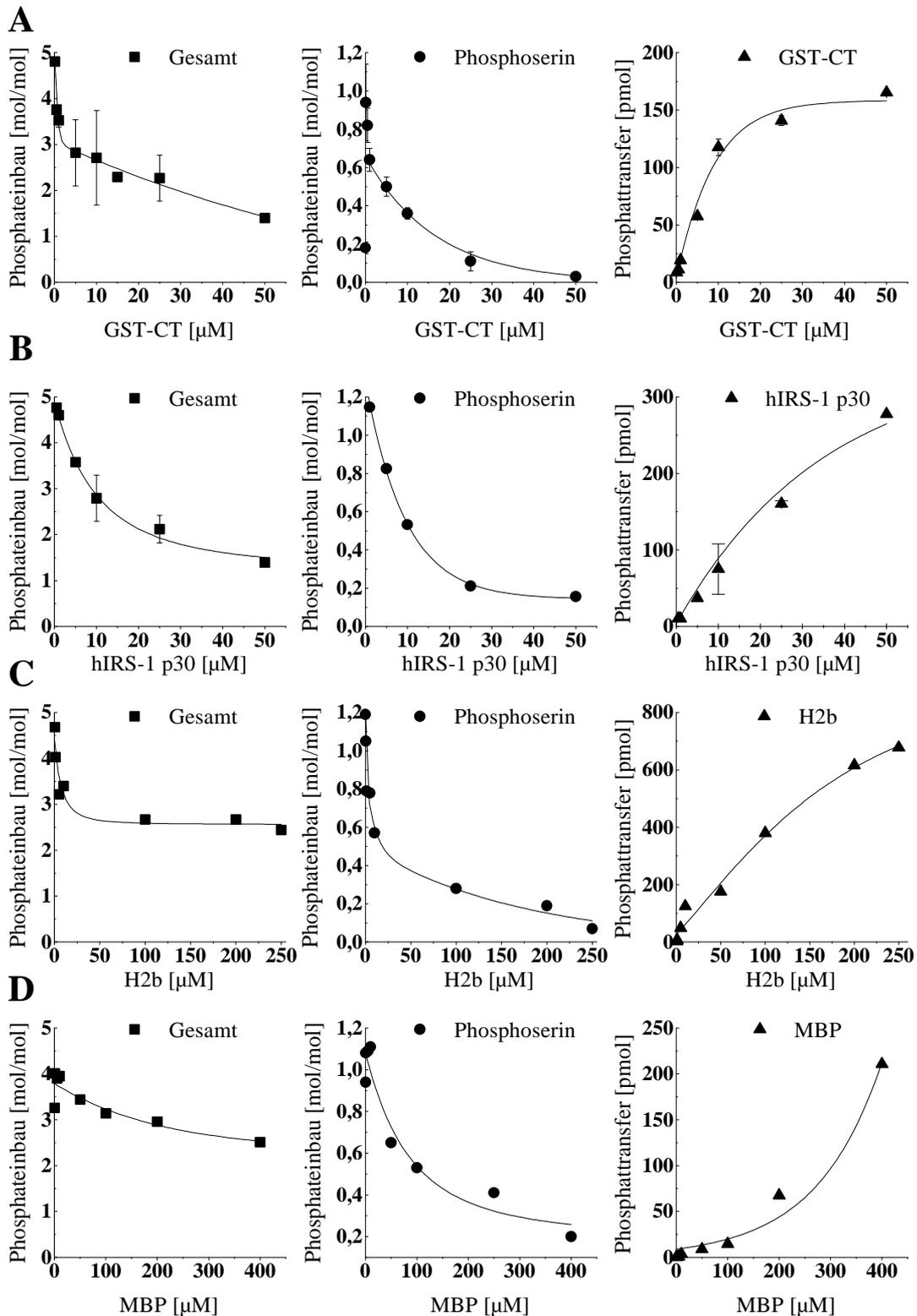
Im folgenden wurde der Einfluß der Substitution der C-terminalen Tyrosinphosphorylierungsstellen gegen Phenylalanin untersucht. Dazu wurden die IRKD-Y1316/22F und die IRKD in Bezug auf die Substratphosphorylierung der GST-Fusionsproteine GST-CT und GST-Ex20 analysiert. Die Versuche wurden in Anwesenheit von  $1 \mu\text{M}$  Poly(Lysin),  $250 \mu\text{M}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP unter Verwendung des für fünf Minuten vorphosphorylierten Enzyms durchgeführt. (Abb. 6.3). Die Substitution der beiden C-terminalen Tyrosinphosphorylierungsstellen in der IRKD-Y1316/22F führt zu einer Erniedrigung der jeweiligen  $V_{\max}$ -Werte für die Substrate, aber zu vergleichbaren apparenten  $K_m$ -Werten. Im Vergleich zur IRKD ( $V_{\max}$ :  $117,0 \pm 3,6 \text{ nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) ist der ermittelte apparente  $V_{\max}$ -Wert für das GST-CT-Fusionsprotein ( $V_{\max}$ :  $26,3 \pm 1,9 \text{ nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) um den Faktor vier niedriger. Für den  $K_m$ -Wert ergibt sich  $7,4 \pm 2,3 \mu\text{M}$  (IRKD:  $6,06 \pm 0,47 \mu\text{M}$ ). Der apparenten  $V_{\max}$ -Wert des GST-Ex20 Fusionsproteins beträgt  $37,7 \pm 7,95 \text{ nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  (IRKD:  $53,91 \pm 2,1 \text{ nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) und ist im Vergleich zur IRKD um den Faktor 1,5 niedriger. Für den apparenten  $K_m$ -Wert wurden  $4,75 \pm 0,9 \mu\text{M}$  (IRKD:  $2,78 \pm 0,6 \mu\text{M}$ ) ermittelt. Die Erniedrigung der  $V_{\max}$ -Werte deutet auf eine Konkurrenz der Substratphosphorylierung durch den C-Terminus hin, der durch eine Phosphorylierung der beiden C-terminalen Tyrosinphosphorylierungsstellen aufgehoben zu werden scheint.



**Abb. 6.3: Vergleich der Substratphosphorylierung von GST-CT und GST-Ex20 durch die IRKD und IRKD-Y1316/22F.** Die Versuche wurden in Anwesenheit von 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin), 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP und für 5 Minuten vorphosphorylierter IRKD-Y1316/22F durchgeführt. **A:** Lineweaver-Burk Diagramm der Phosphorylierung des GST-CT-Fusionsproteins **B:** Lineweaver-Burk-Diagramm der Phosphorylierung des GST-Ex20-Fusionsproteins

### 6.3 Einfluß von Substraten auf die Autophosphorylierung der IRKD

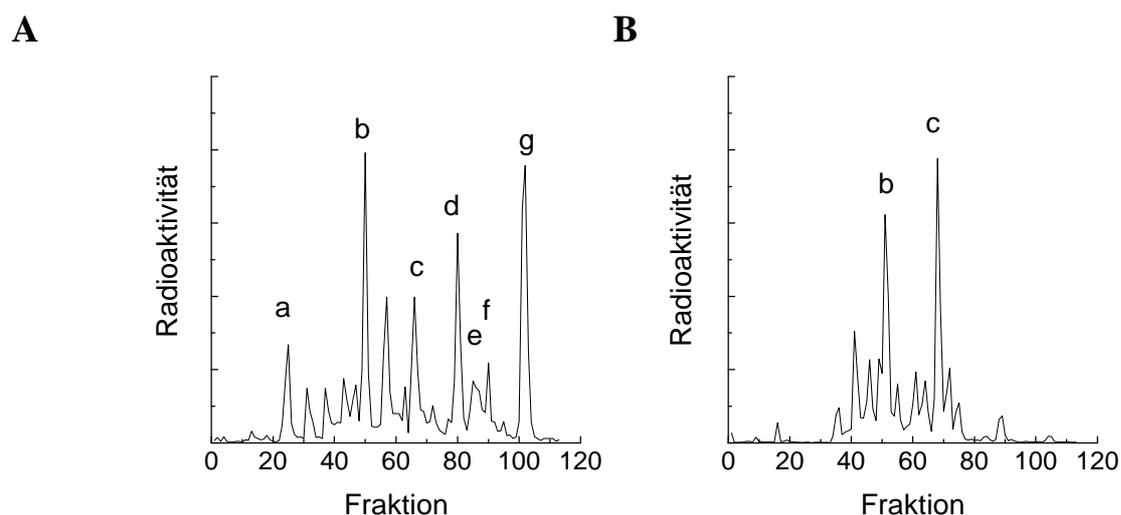
Die Autophosphorylierung des Insulinrezeptors und der löslichen Kinase gilt als der eigentliche Schritt für die Aktivierung der enzymatischen Aktivität. Dieser Vorgang führt beim Rezeptor zu einer Steigerung der Kinaseaktivität um den Faktor 10 - 20 durch Erhöhung des  $V_{\text{max}}$ -Wertes in der Phosphotransferasereaktion bezüglich exogener Substrate (White et al. 1984, Kwok et al. 1986). Für die lösliche Kinase wurden Steigerungen um einen Faktor von 30 - 50 berichtet (Cobb et al. 1989, Al-Hasani 1995, Lehr 1995, Goder 1995). Die Anwesenheit exogener Substrate führt dagegen zur Inhibition der Autophosphorylierung sowohl des Insulinrezeptors als auch seiner löslichen Kinase, wenn eine vorherige Phosphorylierung unterbleibt (Cobb et al. 1989, White et al. 1988, Al-Hasani 1995, Goder 1995, Kohanski und Lane 1986, Flores-Riveros et al. 1989). Im folgenden wurde untersucht, welchen Einfluß die Anwesenheit exogener Substrate auf die Autophosphorylierungsreaktion des Enzyms hat. Im Versuch wurden Phosphorylierungen mit variierenden Substratkonzentrationen für 20 Minuten durchgeführt. Als Substrate dienten das C-terminale GST-Fusionsprotein (GST-CT), das rekombinante Fragment des humanen IRS-1 (hIRS-1 p30), Histon 2b und *Myelin Basic Protein*. Die Reaktionsansätze enthielten 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin) und 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Kinase gestartet und nach 20 Minuten die Reaktion mittels Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Durch SDS-PAGE wurden Substrat und Kinase voneinander getrennt, die radioaktiv markierten Banden nach Autoradiographie des getrockneten Gels lokalisiert und der Phosphat einbau durch Messung der Cerenkov-Strahlung bestimmt. Anschließend wurde nach tryptischer Elution der erhaltenen Gelbanden eine Phosphoaminosäureanalyse durchgeführt (Abb. 6.4). In Anwesenheit der Substrate wird eine deutliche Inhibition der Autophosphorylierung der Kinase mit zunehmender Substratkonzentration erkennbar. Obwohl sich die verwendeten Substrate deutlich in ihren kinetischen Konstanten unterscheiden lassen (Tab. 6.1), wird die halbmaximale Inhibition dieser Reaktion ( $EC_{50}$ ) in allen Fällen bei Konzentrationen erreicht, die in etwa dem  $K_m$ -Wert des jeweiligen Substrates entspricht. Diese Inhibition bewirkt gleichzeitig eine deutliche Abnahme auch der Serin autophosphorylierung der Kinase. Die Hemmung der Serinphosphorylierung setzt, im Gegensatz zu der Hemmung der Gesamtposphorylierung, schon bei wesentlich geringeren Substratkonzentrationen ein. Die Anwesenheit hoher Substratkonzentrationen wirkt sich aber nicht auf die Phosphotransferaseaktivität des Enzyms aus.



**Abb. 6.4: Einfluß der Substratkonzentration auf die Autophosphorylierungsreaktion der IRKD.** Die Reaktionsansätze enthielten 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin), 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP und variierende Konzentrationen der jeweiligen Substrate. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der IRKD gestartet und nach 20 Minuten durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Nach SDS-PAGE und Bestimmung des Phosphateinbaus in das Enzym und das Substrat erfolgte die Analyse der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung. Anordnung der Diagramme: Links: Gesamtphosphateinbau in die IRKD, Mitte: Serinphosphatgehalt der IRKD, Rechts: Phosphatinkorporation in das Substrat. Konzentrationsabhängigkeit in Anwesenheit von: **A:** GST-CT, **B:** hIRS-p30, **C:** Histon 2b, **D:** Myelin Basic Protein.

Mit steigenden Substratkonzentrationen wird gleichzeitig eine Zunahme der inkorporierten Radioaktivität in die Substrate beobachtet. Demnach deutet die Substrathemmung der Autophosphorylierungsreaktion nicht auf eine Hemmung der Kinaseaktivität per se, sondern auf eine Konkurrenz der Autophosphorylierung und Substratphosphorylierung. Diese scheint sich spezifisch auf die Serinphosphorylierung im C-Terminus aber auch aufgrund der erniedrigten Phosphatinkorporation in das Enzym auf Tyrosinphosphorylierungsstellen auszuwirken (Abb. 6.4).

Im folgenden Experiment wurde untersucht, welche Unterschiede in der Besetzung der einzelnen Phosphorylierungsstellen im Enzym im Vergleich zur nicht gehemmten Reaktion zu beobachten sind. Dazu wurden Phosphorylierungsreaktionen in Anwesenheit hoher Substratkonzentrationen durchgeführt, Kinase und Substrat durch SDS-PAGE getrennt und das Enzym anschließend durch Phosphopeptidkartierung analysiert. Abbildung 6.5 zeigt die repräsentativen Chromatogramme der IRKD in Ab- bzw. Anwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  GST-CT. Deutlich ist zu erkennen, daß die Reduktion des Phosphateinbaus in das Enzym auf die Inhibition der Phosphorylierungsstellen der katalytischen Domäne zurückzuführen ist. Während in der ungehemmten Kinase mono- (c), bis- (d, e) und tris- (g) phosphorylierte Peptide der katalytischen Domäne nachweisbar sind, wird bei Anwesenheit des Substrates hauptsächlich Phosphatinkorporation in mono-phosphorylierten Peptiden detektierbar. Die Inhibition wirkt sich ebenfalls auf die Besetzung der Serinphosphorylierungsstellen aus, die im gehemmten Enzym nicht mehr nachweisbar sind (Fraktion a und f). Die Anwesenheit des C-terminalen Peptids führt aber nicht zu einer Inhibition der C-terminalen Phosphorylierungsstellen im Enzym (Fraktion b), wodurch eine kompetitive Hemmung speziell dieser Phosphatakzeptorstellen ausgeschlossen werden muß. Die Hemmung der Autophosphorylierungsreaktion der IRKD durch andere Substrate führt immer zu einer vergleichbaren Besetzung der Autophosphorylierungsstellen im Enzym (Daten nicht gezeigt). In jedem Fall sind die katalytische Domäne und die Serinphosphorylierungsstellen von der Inhibition betroffen, die C-terminalen Phosphatakzeptorstellen und die phosphorylierten mono-Formen der katalytischen Domäne sind die prominenten Peaks in den jeweiligen Chromatogrammen. Daher kann bei Anwesenheit exogener Substrate immer von einer gleichartigen Hemmung des Enzyms ausgegangen werden. Da die Phosphotransferaseaktivität auf die exogenen Substrate allerdings unbeeinflusst bleibt, ergibt sich, daß für diese Reaktion die volle Besetzung der Tyrosinphosphorylierungsstellen in der katalytischen Domäne keine notwendige Voraussetzung für die Substratphosphorylierung ist.



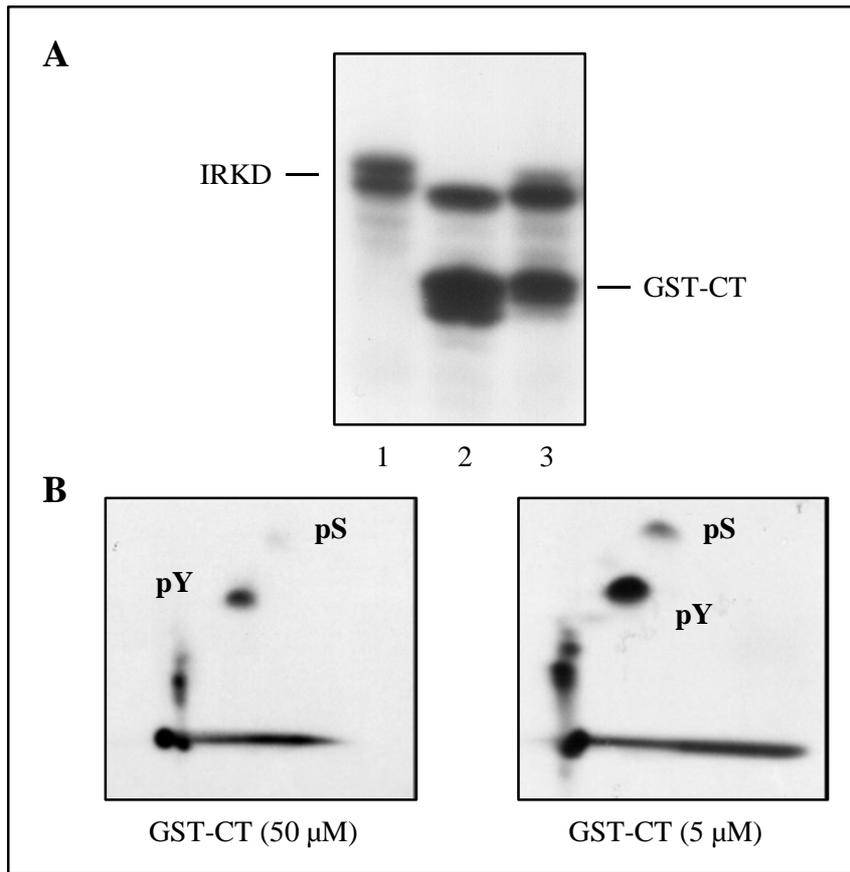
**Abb. 6.5: Einfluß hoher Substratkonzentrationen auf die Besetzung der Autophosphorylierungsstellen der IRKD.** Jeweils 1  $\mu\text{M}$  IRKD wurden in Ab- bzw. Anwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  GST-CT in Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin) und 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP für 20 Minuten phosphoryliert, die Proteine durch SDS-PAGE getrennt und die erhaltenen Gelbanden tryptisch eluiert. Im Anschluß erfolgte die Auftrennung der tryptischen Peptide durch Anionenaustausch-Chromatographie. **A:** In Abwesenheit von Substrat. **B:** In Anwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  GST-CT.

## 6.4 Die Serinphosphorylierung exogener Substrate

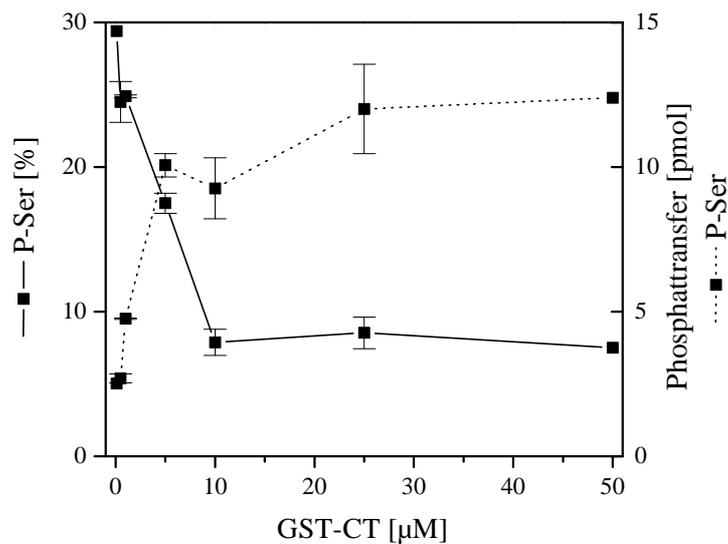
Die Fähigkeit zur Phosphotransferasereaktion der IRKD wird durch die Anwesenheit exogener Substrate nicht beeinflusst, während die Phosphatinkorporation in der Autophosphorylierungsreaktion stark gehemmt zu werden scheint. Aufgrund der Beobachtung, daß eine Vorphosphorylierung des Enzyms zu einer gesteigerten Phosphotransferaseaktivität gegenüber Substraten führt (White et al. 1984, Kwok et al. 1986, Al-Hasani 1995), scheint die beobachtete Hemmung auf eine generelle Kompetition der Kinaseautophosphorylierung hinzudeuten. Dabei ergeben sich Unterschiede in der Besetzung einzelner Autophosphorylierungsstellen im Enzym. Vor allem ist die Phosphorylierung der katalytischen Domäne und der Serinphosphorylierungsstellen betroffen. Die halbmaximale Hemmung dieser Reaktion wird bei Substratkonzentrationen erreicht, die in etwa den jeweiligen  $K_m$ -Werten entsprechen. Diese Beobachtungen führten zu der Fragestellung, ob sich in Abhängigkeit ihrer Konzentration auch Unterschiede in den Phosphorylierungsmustern der Substrate erkennen lassen. Im folgenden wurde zunächst die Phosphoaminosäure-Zusammensetzung der Modellsubstrate Histon 2b und *Myelin Basic Protein* aus dem Experiment aus Kapitel 6.3 untersucht. Dazu wurden die hier erhaltenen Proteinbanden tryptisch eluiert und die Phosphoaminosäure-Zusammensetzung der Substrate analysiert. In beiden Fällen kommt es bei der Phosphorylierung dieser Substrate unabhängig von der Substratkonzentration ausschließlich zur Tyrosinphosphorylierung (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu kann in dem C-terminalen Fusionsprotein und überraschenderweise auch in hIRS-1 p30 eine Serinphosphorylierung in Abhängigkeit von der eingesetzten Substratkonzentration detektiert werden. Die Beobachtung einer Serinphosphorylierung in einem Substrat durch die IRKD ist bislang ein nicht beschriebenes Ereignis und wird in den folgenden Abschnitten näher charakterisiert.

### 6.4.1 Die Serinphosphorylierung des C-terminalen Fusionsproteins GST-CT

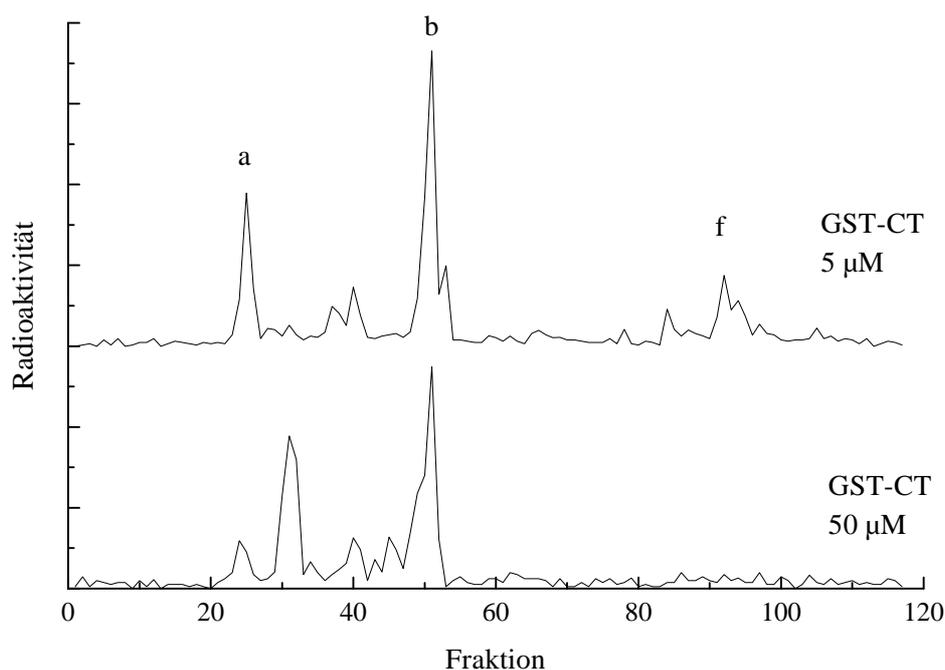
Das GST-CT-Fusionsprotein umfaßt die Aminosäuren Asn<sup>1249</sup> - Ser<sup>1343</sup> aus der IR-Sequenz und enthält somit die vier C-terminalen Autophosphorylierungsstellen des Rezeptors Tyr<sup>1316</sup>, Tyr<sup>1322</sup>, Ser<sup>1275</sup> und Ser<sup>1309</sup>. Abbildung 6.6 zeigt eine repräsentative Autoradiographie auf Grundlage der im Kapitel 6.3 beschriebenen Versuche. Die Zunahme der Substratkonzentrationen führt, wie erwartet, zu einer erhöhten Phosphatinkorporation in das Substrat. Die Inhibition der Autophosphorylierung des Enzyms wirkt sich in der Abnahme des apparenten Molekulargewichts aus. Die Auswertung der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung des Substrates zeigt, daß bei Verwendung einer hohen Substratkonzentration (~ 10facher  $K_m$ ) nur ein geringer Phosphoserinanteil detektiert wird (< 5 %), während bei einer niedrigen Konzentration ein Serinphosphatanteil von 30 % erhalten wird. Dieses Ergebnis wurde durch die Auswertung der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung des GST-CT-Fusionsproteins in Abhängigkeit von seiner Konzentration aus dem Versuch 6.3 bestätigt (Abb. 6.7). Mit zunehmender Substratkonzentration wird eine Abnahme in der prozentualen Verteilung der Serinphosphorylierung im Substrat beobachtet. Allerdings kehren sich die Verhältnisse um, wenn dieses auf den Phosphotransfer bezogen wird. Mit steigenden Substratkonzentrationen werden mehr Phosphate auf Serinreste des Substrates als der Kinase übertragen. Während in Anwesenheit von 50  $\mu$ M GST-CT nur etwa 1-2 pmol der Serinphosphate in der Kinase wiedergefunden werden (Kap. 6.3), sind im Substrat etwa 12 pmol enthalten. Dieses könnte auf eine Kompetition der Kinase-eigenen und der Serinphosphorylierungsstellen des Substrates hinweisen. Wird die Serintransferaseaktivität auf den molaren Einbau bezogen, ergibt sich, daß nur ca. 0,02 mol Serin pro mol Substrat erhalten werden, während die Kinase etwa 5 mal mehr phosphorylierte Serinreste enthält. Bei einer Substratkonzentrationen von 5  $\mu$ M, bei der es zu einer Inhibition der Autophosphorylierung der Kinase von etwa 50 % kommt, werden dagegen etwa 0,8 mol/mol Phosphoserin in der Kinase und 0,2 mol/mol im Substrat erhalten. Der unterschiedliche spezifische Einbau von Phosphaten in Serinresten des Substrates kann demzufolge nur durch Unterschiede in der Besetzung der einzelnen Phosphorylierungsstellen erklärt werden. Zur Analyse dieser Zusammenhänge wurde das bei 5 und 50  $\mu$ M phosphorylierte Substrat hinsichtlich der Identität seiner Phosphorylierungsstellen durch Phosphopeptidkartierung analysiert (Abb. 6.8).



**Abb. 6.6: Substratphosphorylierung des GST-CT-Fusionsproteins durch die IRKD.** Der Versuch wurde in Analogie zu den Experimenten aus Kap. 6.3 durchgeführt. **A:** Autoradiographie nach SDS-PAGE. 1: IRKD nach 20minütiger Autophosphorylierung in Abwesenheit eines Substrates. 2: IRKD + 5  $\mu\text{M}$  GST-CT-Fusionsprotein 3: IRKD + 50  $\mu\text{M}$  GST-CT-Fusionsprotein **B:** Phosphoaminosäure-Zusammensetzung der GST-CT-Fusionsproteine aus Abb. 6.6 A. Autoradiographie nach zweidimensionaler Phosphoaminosäureanalyse.



**Abb. 6.7: Einfluß der Substratkonzentration auf den Phosphoserengehalt des GST-CT-Fusionsproteins.** Die Auswertung der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung des GST-CT-Fusionsproteins bezieht sich auf die Analyse der in Kap. 6.3 durchgeführten Versuche.

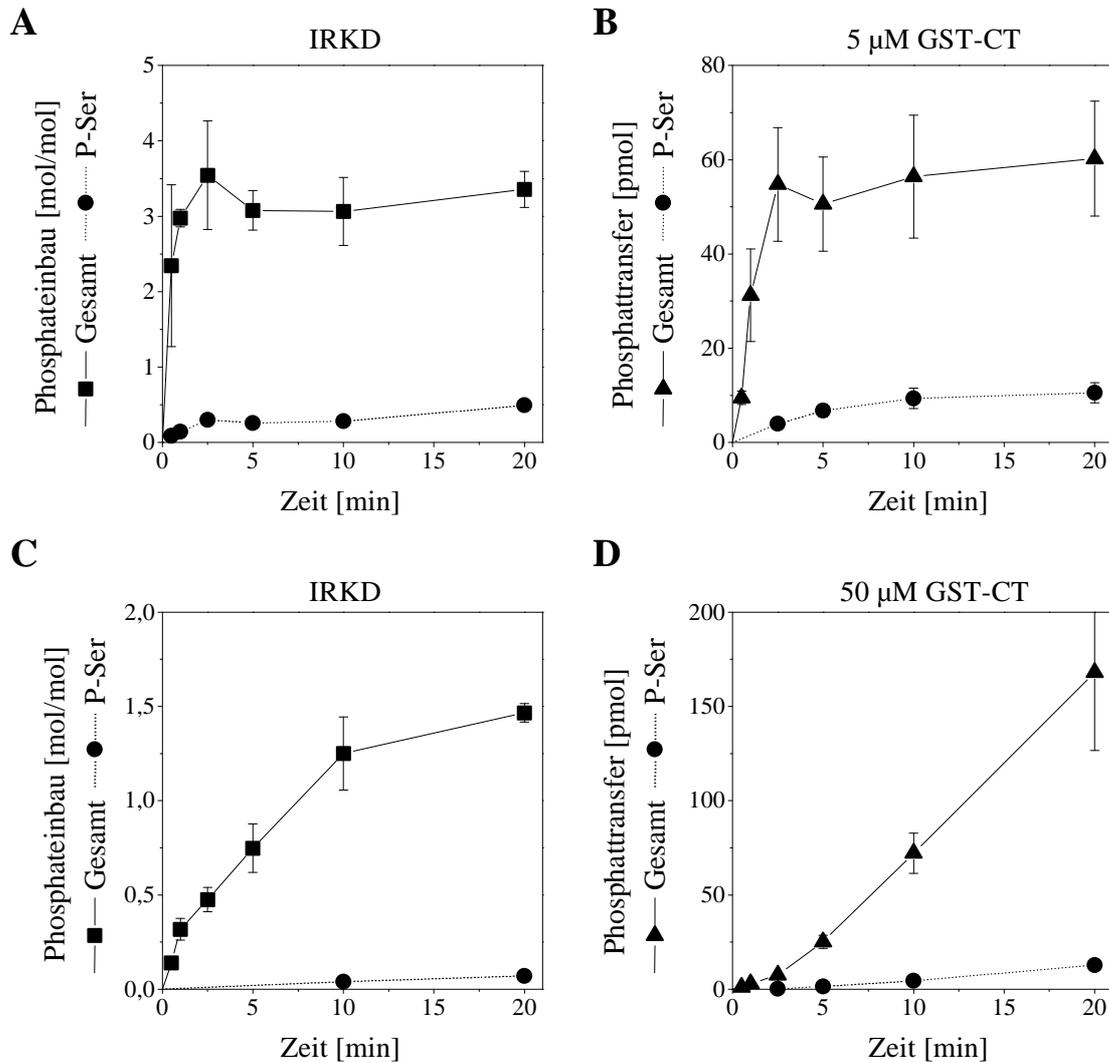


**Abb. 6.8: Phosphopeptidkartierung des GST-CT-Fusionsproteins.** 5  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  GST-CT wurden für 20 Minuten durch die IRKD phosphoryliert, die Proteine anschließend durch SDS-PAGE getrennt und die erhaltenen Gelbanden tryptisch eluiert. Im Anschluß erfolgte die Trennung der Phosphopeptide durch Anionenaustausch-Chromatographie. Nach Tabelle 4.2 ergibt sich die Zuordnung der Retentionszeiten zu den jeweiligen Phosphopeptiden.

Die Auswertung der Elutionsprofile zeigt, daß die Phosphopeptide vom GST-CT-Fusionsprotein in gleicher Weise wie die entsprechenden Phosphopeptide der IRKD von der Säule eluieren (Kap. 4.4.2, Abb. 4.6). In dem korrespondierenden Elutionsprofil des Substrates, welches in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  in die Reaktion eingesetzt wurde, werden zwei prominente Peaks erhalten, die der Sequenz SYEEHIPYTHMNGGK zugeordnet werden können. Dabei handelt es sich bei dem Peak der Fraktion 30-32 um eine Form dieses Peptids, in welchem der Tyrosinrest 1316 oder 1322 phosphoryliert vorliegen kann. Diese mono-Form kann im allgemeinen in der Phosphopeptidkartierung der IRKD nicht beobachtet werden. Der zweite Peak enthält die bis-phosphorylierte Form dieses Peptids (Fraktion b). Beide Formen liegen ungefähr in einem 1 : 2-Verhältnis vor. Eine geringe Menge an Radioaktivität enthält das Serinpeptid Ser<sup>1309</sup> (Fraktion a), während das Serinpeptid Ser<sup>1275</sup> (Fraktion b) nicht detektiert werden kann. Im Gegensatz dazu wird im Substrat, welches in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  in die Phosphorylierungsreaktion eingesetzt wurde, nur die bis-phosphorylierte Form des Peptids gefunden (Fraktion b), welches die beiden Tyrosinphosphorylierungsstellen enthält. Weiterhin können die beiden Serinpeptide entsprechend ihrer Retentionszeiten identifiziert werden (Fraktion a und f). Relativ zur eluierten Gesamtradioaktivität finden sich etwa 13 % und 11 % der inkorporierten Phosphate in den Phosphopeptiden mit den Serinphosphorylierungsstellen Ser<sup>1275</sup> und Ser<sup>1309</sup>.

Damit ergibt sich wie schon in der Analyse der Phosphoaminosäurezusammensetzung des Gesamtproteins ein ähnliches Ergebnis. Weiterhin zeigt das Experiment, daß tatsächlich qualitative Unterschiede in der Besetzung der einzelnen Phosphorylierungsstellen bestehen, wenn das Substrat unter niedrigen oder hohen Konzentrationen in die Phosphorylierungsreaktion eingesetzt wird. Eine niedrige Substratkonzentration führt zu der Besetzung aller Phosphorylierungsstellen, während bei der hohen Substratkonzentration die Besetzung der Tyrosinphosphorylierungsstellen bevorzugt werden. Die Möglichkeit, spezifisch die beiden Serinreste Ser<sup>1275</sup> und Ser<sup>1309</sup> in dem C-terminalen Fusionsprotein phosphorylieren zu können, sollte im folgenden hinsichtlich ihrer Kinetik untersucht werden. Dazu wurden zeitabhängige Substratphosphorylierungsreaktionen durchgeführt. Die Ansätze

enthielten 5 bzw. 50  $\mu\text{M}$  GST-CT-Fusionsprotein, 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin) und 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  Kinase gestartet, nach den jeweiligen Zeitpunkten Aliquots entnommen und die Reaktionen mittels Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Nach Autoradiographie und Bestimmung der inkorporierten Radioaktivität durch Messung der Cerenkov-Strahlung im  $\beta$ -Counter wurden die Gelbanden durch tryptischen Verdau eluiert und die Phosphoaminosäurezusammensetzung der Kinase und des Substrates analysiert. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 6.9 dargestellt.



**Abb. 6.9: Zeitabhängigkeit der Substratphosphorylierung des GST-CT-Fusionsproteins durch die IRKD.** Die Reaktionsansätze enthielten 5 bzw. 50  $\mu\text{M}$  Fusionsprotein, 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin), 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP und 1  $\mu\text{M}$  IRKD. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Kinase gestartet und zu den jeweiligen Zeitpunkten Aliquots entnommen. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet und die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Im Anschluß wurde der spezifische Phosphateinbau und die Phosphoaminosäure-Zusammensetzung der Kinase und des Substrates bestimmt. Phosphateinbau und Phosphoaminosäure-Zusammensetzung: **A:** der IRKD in Anwesenheit von 5  $\mu\text{M}$  GST-CT, **B:** des GST-CT (5  $\mu\text{M}$ ), **C:** der IRKD in Anwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  GST-CT, **D:** des GST-CT (50  $\mu\text{M}$ ).

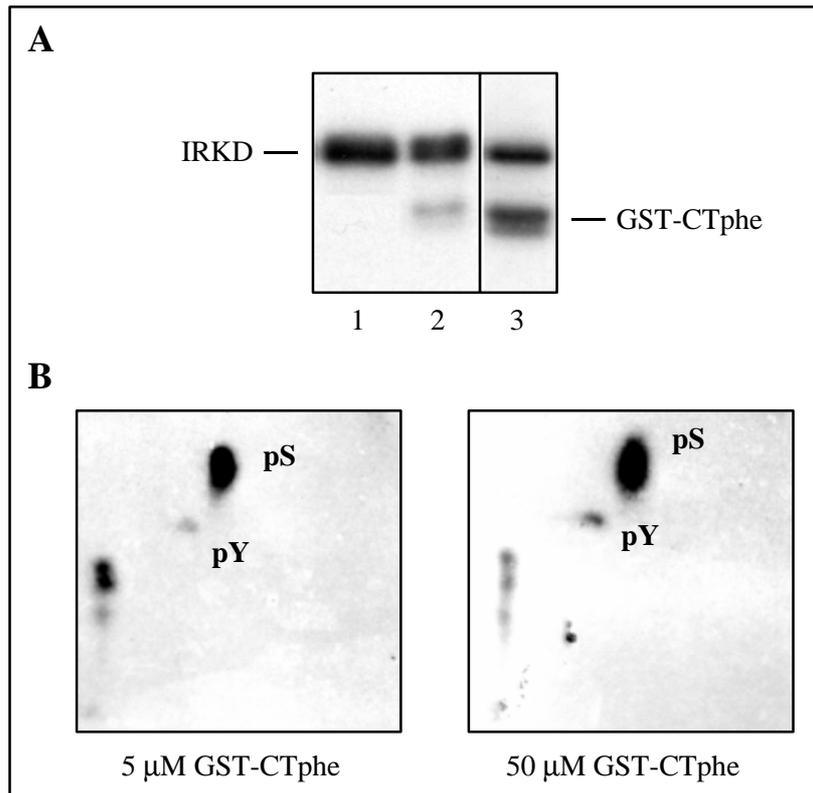
Sowohl die Autophosphorylierung der Kinase als auch der Phosphotransfer auf 5  $\mu\text{M}$  GST-CT beschreiben einen Sättigungsverlauf (Abb. 6.9 A, B). Die Kinase inkorporiert nach einer Reaktionszeit von 20 Minuten 3,4 mol Phosphat pro mol Molekül. Die Initialgeschwindigkeit der Reaktion beträgt in diesem Versuch  $104 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  und ist damit niedriger als in einer Autophosphorylierungsreaktion ohne Substrat (Kap. 4.3). Die Anwesenheit des Substrates führt zu einer Reduktion der maximalen Phosphatinkorporation in Serinreste um  $\sim 50 \%$ , beeinträchtigt aber die Initialgeschwindigkeit dieser Phosphorylierung nur unwesentlich. Der maximale Phosphateinbau in Serinreste beträgt  $0,5 \text{ mol/mol}$ , aus dem linearen Anteil der Kurve ergibt sich die Initialgeschwindigkeit mit  $4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ . Auf das Substrat werden nach 20 Minuten Reaktionszeit  $60 \text{ pmol}$  Phosphate übertragen, wovon  $12 \text{ pmol}$  in Serinresten enthalten sind. Für die Initialgeschwindigkeit des Phosphotransfers auf das Substrat ( $5 \mu\text{M}$ ) ergeben sich  $42 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , die Initialgeschwindigkeit der Serinphosphorylierung kann mit  $3,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  angegeben werden.

In Anwesenheit von  $50 \mu\text{M}$  Substrat ist die Autophosphorylierung der Kinase stark gehemmt (Abb. 6.9 C). Die Autophosphorylierungsreaktion des Enzyms wird durch eine Sättigungskurve beschrieben, jedoch ist im Vergleich zur Reaktion ohne bzw. mit  $5 \mu\text{M}$  Substrat die Reaktion auch nach 20 Minuten noch nicht abgeschlossen, der Phosphateinbau nach dieser Reaktionszeit beträgt  $1,4 \text{ mol/mol}$ . Die Initialgeschwindigkeit der Reaktion ergibt sich zu  $6 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  und ist damit um den Faktor 25 niedriger als die einer Autophosphorylierungsreaktion in Abwesenheit von Substrat. Im Enzym ist in der initialen Phase der Reaktion keine Serinphosphorylierung zu detektieren, nach einer Reaktionszeit von 20 Minuten beträgt der prozentuale Anteil etwa  $5 \%$  und damit  $0,1 \text{ mol/mol}$ . Der Phosphateinbau in das Substrat wird durch einen biphasischen Verlauf beschrieben, die Initialgeschwindigkeit der Reaktion beträgt  $4,8 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  (Abb. 6.9 D). Nach etwa 2,5 Minuten kommt es aber zu einem deutlichen Anstieg der Phosphotransferaseaktivität, nach 20 Minuten Reaktionszeit werden  $168 \text{ pmol}$  Phosphat auf das Substrat übertragen. Wie schon für die Kinase beschrieben, sind in den ersten Minuten der Reaktion keine phosphorylierten Serinreste nachweisbar, nach Beendigung der Reaktion ergibt sich ein Phosphoserengehalt von  $14 \text{ pmol}$ .

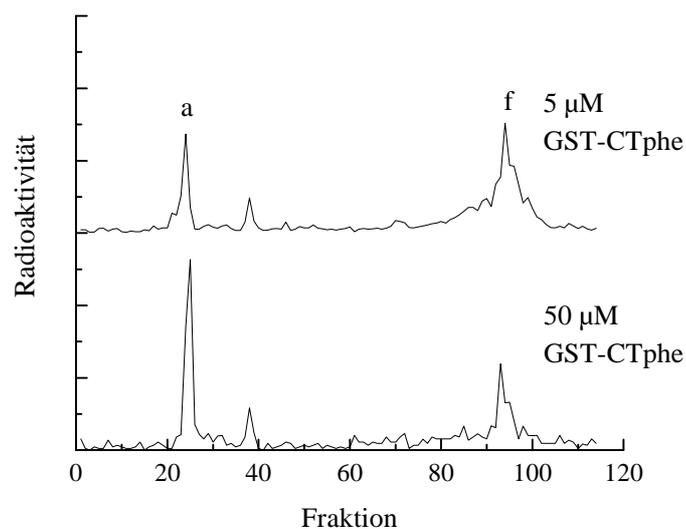
#### 6.4.2 Die Serinphosphorylierung des C-terminalen Fusionsproteins GST-CTphe

Um zu überprüfen, ob die Tyrosinphosphorylierung eine Voraussetzung für die Besetzung der beiden Serinphosphorylierungsstellen im Substrat GST-CT ist, wurde das GST-Fusionprotein GST-CTphe konstruiert. Das Protein umfaßt die identische Aminosäuresequenz wie GST-CT, allerdings sind die beiden Tyrosinphosphorylierungsstellen gegen Phenylalanin substituiert (Kap. 6.1.2). Das Substrat wurde in Analogie zu Kap. 6.4.1 in den Konzentrationen  $5$  und  $50 \mu\text{M}$  in einer Substratphosphorylierungsreaktion für 20 Minuten eingesetzt. Die Ansätze enthielten  $1 \mu\text{M}$  Poly(Lysin) und  $250 \mu\text{M}$   $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ . Die Reaktionen wurden durch Zugabe der IRKD gestartet und nach 20 Minuten mittels Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE wurden der Phosphateinbau in den Kinasen und den Substraten bestimmt (Abb. 6.10).

GST-CTphe wird wie GST-CT von der Kinase erkannt und phosphoryliert (Abb. 6.10 A). Nach einer Reaktionszeit von 20 Minuten werden bei einer Substratkonzentration von  $5 \mu\text{M}$   $22 \text{ pmol}$ , bei einer Konzentration von  $50 \mu\text{M}$   $10 \text{ pmol}$  Phosphat auf das Substrat übertragen. Dieser Befund ist insofern erstaunlich, da hier eine höhere Substratkonzentration nicht unweigerlich zu einer erhöhten Phosphatinkorporation im Substrat führt, wie es bei anderen Substraten gezeigt werden konnte (Kap. 6.3 und 6.4.1). Die Analyse der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung durch zweidimensionale Elektrophorese zeigt für beide Substratkonzentrationen einen hohen Phosphoserengehalt (Abb. 6.10 B). Das Auftreten von Phosphotyrosin ist insofern verwunderlich, da in der Sequenz des Fusionproteins keine Tyrosinphosphorylierungsstelle mehr existiert. Wahrscheinlich handelt es sich deshalb bei der beobachteten Tyrosinphosphorylierung um eine unspezifische Phosphorylierung eines Tyrosinrestes im GST-Fusionsanteil.



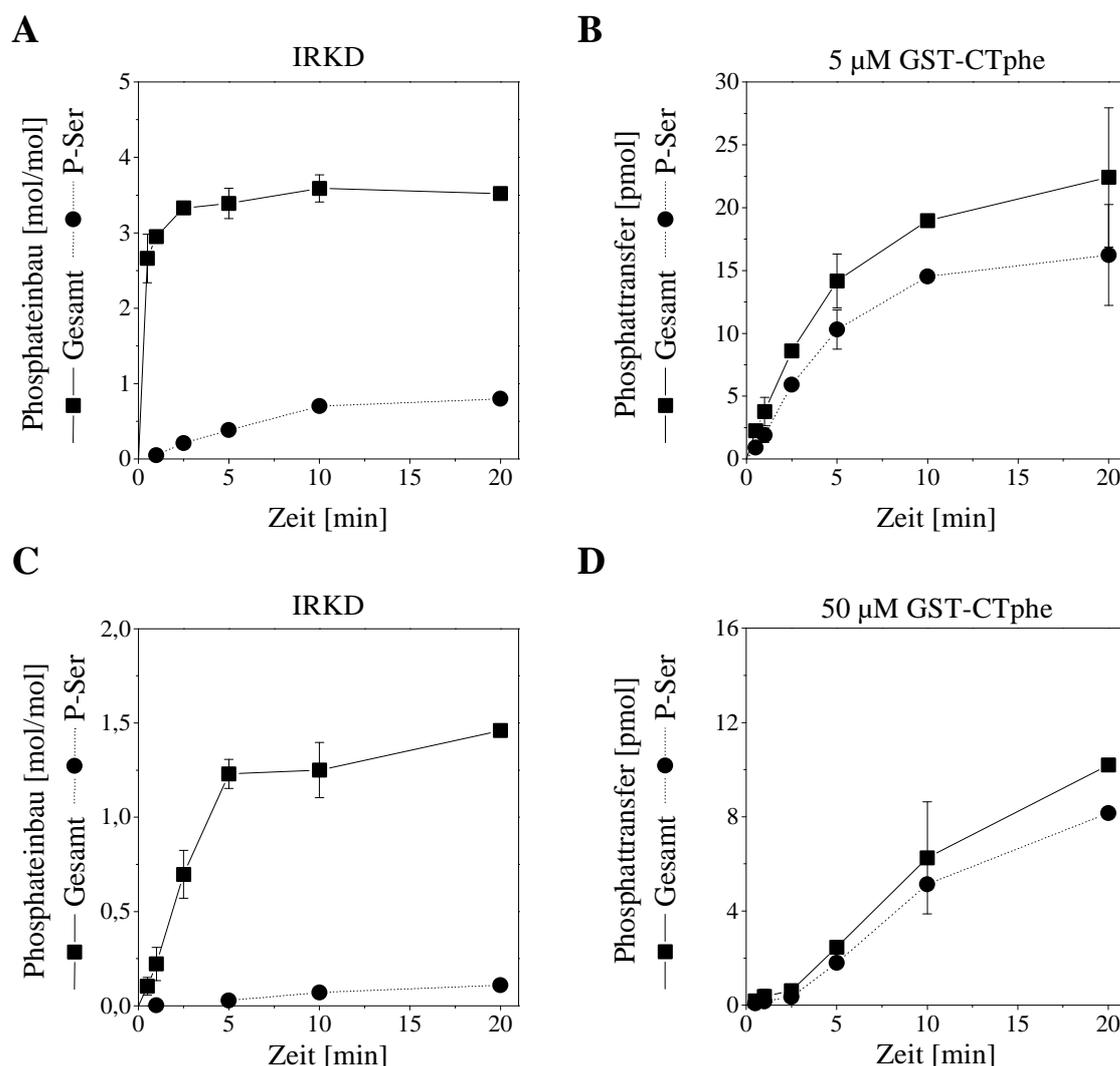
**Abb. 6.10: Substratphosphorylierung des GST-CTphe-Fusionsproteins durch die IRKD.** Die Ansätze enthielten 5 und 50  $\mu\text{M}$  GST-CTphe, 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin), 250  $\mu\text{M}$  ATP und 1  $\mu\text{M}$  IRKD. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Kinase gestartet. Nach Abstoppen der Reaktion nach 20 Minuten durch Zugabe von SDS-Probenpuffer und Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE erfolgte zur Lokalisation der Proteinbanden eine Autoradiographie und die Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteine. Nach tryptischer Elution der erhaltenen Gelbanden wurde eine Analyse der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung durch zweidimensionale Elektrophorese durchgeführt. **A:** Autoradiographie nach SDS-PAGE. 1: IRKD nach 20minütiger Autophosphorylierung in Abwesenheit eines Substrates. 2: IRKD + 5  $\mu\text{M}$  GST-CTphe-Fusionsprotein. 3: IRKD + 50  $\mu\text{M}$  GST-CTphe-Fusionsprotein. Das vermeintlich stärkere visuelle Signal in Bahn 3 ist aufgrund einer längeren Expositionszeit des Films bedingt. **B:** Phosphoaminosäureanalyse des GST-CTphe-Fusionsproteins. Autoradiographie nach zweidimensionaler Elektrophorese.



**Abb. 6.11: Phosphopeptidkartierung des GST-CTphe-Fusionsproteins.** Ein Teil der tryptischen Eluate der Fusionsproteine aus Abb. 6.10 wurde durch Phosphopeptidkartierung analysiert. Nach Tabelle 5.2 ergibt sich die Zuordnung der Retentionszeiten zu den Phosphopeptiden.

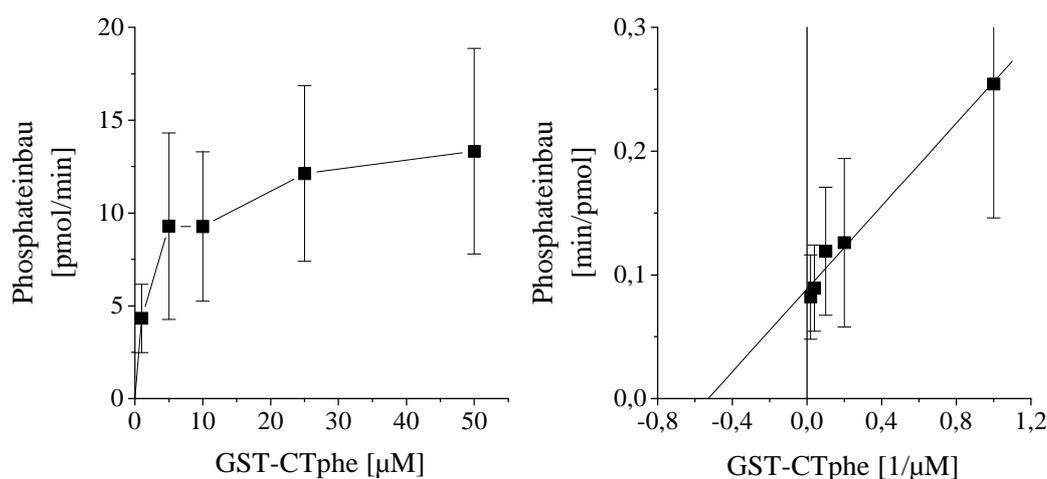
Im folgenden wurde die Besetzung der Phosphorylierungsstellen im Substrat durch die Methode der Phosphopeptidkartierung untersucht (Abb. 6.11). Die Analyse zeigt eindeutig, daß die beobachtete Serinphosphorylierung im GST-CTphe-Fusionsprotein auf die Phosphorylierung der beiden C-terminalen Serinphosphorylierungsstellen zurückzuführen ist. Allerdings ergeben sich Unterschiede in der relativen Verteilung der Phosphate in die einzelnen Positionen. Bei der niedrigen Substratkonzentration werden beide Serinreste gleichermaßen phosphoryliert, bei der hohen Substratkonzentration scheint die Phosphorylierung des Serinrestes Ser<sup>1309</sup> bevorzugt zu sein (Fraktion a), eine Auffälligkeit, die auch schon für das GST-CT Protein beobachtet werden konnte.

In Analogie zum GST-CT-Fusionsprotein wurde eine detaillierte Analyse der Zeitabhängigkeit einer Substratphosphorylierungsreaktion des GST-CTphe-Fusionsproteins durch die IRKD durchgeführt. Dabei wurde der Einfluß des Substrates sowohl auf die Autophosphorylierung und die Phosphoaminosäure-Zusammensetzung der IRKD, als auch der Phosphotransfer auf das Substrat untersucht (Abb. 6.12).



**Abb. 6.12: Zeitabhängigkeit der Substratphosphorylierung von GST-CTphe.** Die Reaktionsansätze enthielten 5 bzw. 50 µM Fusionsprotein, 1 µM Poly(Lysin), 250 µM [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP und 1 µM IRKD. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Kinase gestartet und zu den jeweiligen Zeitpunkten Aliquots entnommen. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet und die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Im Anschluß wurde der spezifische Phosphateinbau und die Phosphoaminosäure-Zusammensetzung der Kinase und des Substrates bestimmt. Phosphateinbau und Phosphoaminosäure-Zusammensetzung **A**: der IRKD in Anwesenheit von 5 µM GST-CTphe, **B**: des GST-CTphe (5 µM), **C**: der IRKD in Anwesenheit von 50 µM GST-CTphe, **D**: des GST-CTphe (50 µM).

Bei einer Substratkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  werden die Autophosphorylierung der Kinase und der Phosphotransfer auf das Substrat durch eine Sättigungskurve beschrieben (Abb. 6.12 A, B). Die Initialgeschwindigkeit der Autophosphorylierungsreaktion beträgt  $117 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , die des Phosphotransfers auf GST-CTphe  $10 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ . Nach einer Reaktionszeit von 20 Minuten werden in der Kinase 3,5 mol/mol in der Kinase und 22 pmol Phosphat im Substrat erhalten. Der spezifische Serinphosphatanteil in der IRKD ergibt sich zu 0,6 mol/mol, die Initialgeschwindigkeit dieser Reaktion beträgt  $1,7 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ . Unter Berücksichtigung der unspezifischen Tyrosinphosphorylierung werden nach 20 Minuten Reaktionszeit im Substrat 16 pmol Phosphoserin detektiert, für die Initialgeschwindigkeit der Reaktion ergeben sich  $4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ . Im Vergleich dazu ist die Autophosphorylierungsreaktion der Kinase in Anwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  Substrat stark inhibiert (Abb. 6.12 C). Nach 20 Minuten wird eine spezifische Phosphatinkorporation von 1,4 mol/mol erhalten, die Initialgeschwindigkeit der Autophosphorylierung beträgt  $4,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ . In der initialen Phase der Reaktion ist keine Serinphosphorylierung des Enzyms zu detektieren, nach 20 Minuten beträgt der Serinphosphatanteil 0,1 mol/mol. Wie schon für das GST-CT-Fusionsprotein beobachtet, beschreibt der Phosphotransfer auf das Substrat einen biphasischen Verlauf (Abb. 6.12 D). Die Initialgeschwindigkeit der Reaktion beträgt  $13 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , die Phosphatinkorporation nach 20 Minuten Reaktionszeit 10 pmol. Für die Serinphosphorylierung ergibt sich eine Initialgeschwindigkeit von  $0,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  und eine maximale Phosphatinkorporation von 8 pmol. Der Versuch zeigt, daß das Vorhandensein der Tyrosinphosphorylierungsstellen keine Voraussetzung für die Kinase katalysierte Phosphorylierung der Serinphosphorylierungsstellen im Substrat ist. Im Vergleich zum GST-CT-Fusionsprotein werden nahezu dieselben kinetische Konstanten für die Serinphosphorylierung erhalten. Interessanterweise findet sich auch dieselbe Beeinflussung der IRKD-Autophosphorylierung, welches zeigt, daß nicht alleine ein erhöhter Phosphotransfer auf die Tyrosinphosphorylierungsstellen des Substrates Ursache für die gefundene Hemmung der Phosphatinkorporation in die Kinase sein kann. Vielmehr scheint das Fusionsprotein eine Art Pseudosubstrat für die IRKD darzustellen. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit der gefundenen Michaelis-Konstante für dieses Substrat. In Analogie zu den Experimenten aus Kap. 6.2 wurde die initiale Geschwindigkeit des Phosphotransfers in Gegenwart variierender GST-CTphe Konzentrationen untersucht. Die Reaktionsansätze enthielten 250  $\mu\text{M}$   $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin) und 1  $\mu\text{M}$  IRKD. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der zuvor für 5 Minuten autophosphorylierten Kinase gestartet und nach einer Reaktionszeit von 0,5 bzw. 1 Minute durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Nach Auftrennen der Proteine durch SDS-PAGE wurde die inkorporierte Radioaktivität durch Messung der Cerenkov-Strahlung ermittelt (Abb. 6.13).



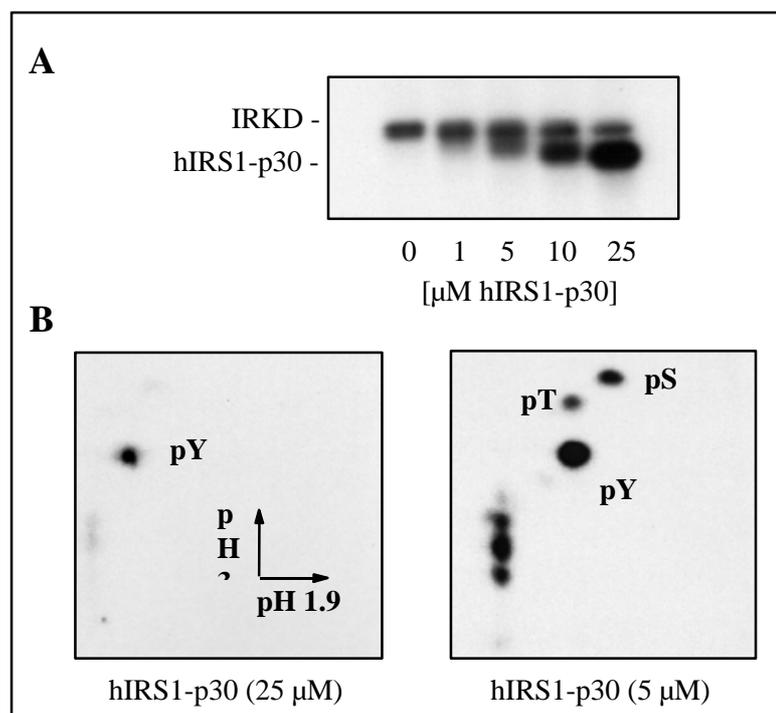
**Abb. 6.13: Substratphosphorylierung von GST-CTphe durch die IRKD.** Die Ansätze enthielten 250  $\mu\text{M}$   $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin) und 1  $\mu\text{M}$  IRKD. Die Reaktionen wurden durch Zugabe des für fünf Minuten vorphosphorylierten Enzyms gestartet und nach 0,5 min durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Nach SDS-PAGE erfolgte die Bestimmung des Phosphateinbaus durch Messung der Cerenkov-Strahlung. **A:** Initialgeschwindigkeiten des Phosphotransfers. **B:** Doppelt reziproke Lineweaver-Burk-Auftragung.

Die Analyse der Initialgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration ergibt einen apparenten  $K_m$ -Wert von 2  $\mu\text{M}$ . Aus den niedrigen Initialgeschwindigkeiten, die für die Serinphosphorylierung charakteristisch sind, resultiert eine größere Fehlerbreite, in der Größenordnung scheint er aber dem gefundenen apparenten  $K_m$ -Wert für das GST-CT-Fusionsprotein zu entsprechen (Kap 6.2). Demnach ergibt sich eine vergleichbare Affinität dieses Substrates zur Kinase. Im Vergleich zu dem ermittelten  $V_{\max}$ -Wert für das GST-CT-Fusionsprotein ist der apparente  $V_{\max}$  Wert erwartungsgemäß sehr gering, er beträgt 25  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein weiteres C-terminales Fusionsprotein konstruiert, in welchem die beiden Tyrosinphosphorylierungsstellen gegen Threonin substituiert wurden (Kap. 6.1). Dieses Fusionsprotein wird wie das GST-CTphe ausschließlich an den beiden Serinresten Ser<sup>1275</sup> und Ser<sup>1309</sup> phosphoryliert und besitzt vergleichbare kinetischen Konstanten in der Substratphosphorylierung (Daten nicht gezeigt).

### 6.4.3 Die Serinphosphorylierung des hIRS-1 p30

Eines der wichtigsten Zielproteine für die Signalweiterleitung des Insulinrezeptors ist das Insulinrezeptorsubstrat-1 (IRS-1). Das Protein wird durch die Insulinrezeptorkinase an mehreren Tyrosinphosphorylierungsstellen phosphoryliert. Daneben ist für dieses Protein auch die Phosphorylierung an Serinresten beschrieben. Als Folge dieser Phosphorylierungen ergibt sich eine Desensitivierung des Insulinsignales (s. Einleitung). Einige der Serinphosphorylierungsstellen konnten durch Mothe et al. identifiziert werden (1996). Es zeigte sich, daß diese Phosphorylierungsstellen alle im zentralen Bereich des Moleküls in direkter Nachbarschaft zu dem Insulinrezeptor zugänglichen Tyrosinphosphorylierungsstellen lokalisiert sind. Das rekombinante Fragment hIRS-1 p30 umfaßt 262 Aminosäuren (Asp<sup>516</sup> - Pro<sup>777</sup>, MW: 30,3 kDa) und enthält diese potentiellen Tyrosin- und Serinphosphorylierungsstellen. Bisher war für dieses Protein nur eine signifikante Tyrosinphosphorylierung durch die lösliche Insulinrezeptorkinase beschrieben (Siemeister et al. 1995). Das Substrat wurde mit dem 10fachen des  $K_m$ -Wertes für diese Untersuchung eingesetzt. Die aus der Untersuchung der Inhibition der IRKD-Autophosphorylierung gewonnene Erkenntnis, daß bei niedrigen Konzentrationen eine Serinphosphorylierung auch in einem Substrat erhalten werden kann, konnte von Parvaresh (persönliche Mitteilung) auf das hIRS-1 p30 übertragen werden. Die Konzentrationsabhängigkeit wurde im folgenden näher analysiert. Die Reaktionsansätze enthielten 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin), 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, 1  $\mu\text{M}$  IRKD und variierende Substratkonzentrationen. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Kinase gestartet, nach 20 Minuten durch SDS-Probenpuffer beendet und die Proteine durch SDS-PAGE getrennt (Abb. 6.14 A). Im Anschluß daran wurde der Phosphateinbau bestimmt und eine Analyse der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung durchgeführt (Abb. 6.14 B).

In Anwesenheit von 25  $\mu\text{M}$  IRS-1 p30 ist die Autophosphorylierung der Kinase deutlich inhibiert. Die Abnahme der Substratkonzentration im Reaktionsansatz führt zu einer verminderten elektrophoretischen Mobilität des Enzyms und des Substrates. Die beobachteten veränderten elektrophoretischen Mobilitäten sind wahrscheinlich auf eine Abnahme der spezifischen SDS-Bindung zurückzuführen und belegen damit indirekt eine zunehmende Besetzung von Phosphorylierungsstellen in den Proteinen. Die zweidimensionale Phosphoaminosäureanalyse des Proteins bei einer Substratkonzentration von 25  $\mu\text{M}$  zeigt einen prozentualen Anteil von  $\sim 5\%$  Phosphoserin an der Gesamtphosphorylierung (Abb. 6.14 B). Bei einer Substratkonzentrationen von 5  $\mu\text{M}$  ist eine starke Zunahme des Phosphoserinanteils zu erkennen (25 % der Gesamtphosphorylierung). Interessanterweise ist auch die Phosphorylierung an Threoninresten zu beobachten (10 % der Gesamtphosphorylierung). Die Möglichkeit der Kinase, auch Threoninreste als Phosphorylakzeptor zu tolerieren, konnte bisher nur für die Autophosphorylierung der IRKD-HIS beschrieben werden, die einen Threoninrest aus dem N-terminalen Histidin-Fusionsproteinanteil als Phosphorylierungsstelle erkennt (Al-Hasani 1995). Dieser Versuch bestätigt, daß eine effiziente Serinphosphorylierung in einem Substrat durch die lösliche Rezeptorkinase katalysiert werden kann, wenn geringe Substratkonzentrationen vorliegen. Weitaus wichtiger ist aber die Tatsache, daß diese Serinphosphorylierung in einem natürlichen Signalprotein der Kinase erhalten wird, wodurch sich möglicherweise neue Erkenntnisse in der Signalweiterleitung des Insulinrezeptors gewinnen lassen können.



**Abb. 6.14: Substratphosphorylierung von hIRS-1 p30 durch IRKD in Abhängigkeit von der Substratkonzentration.** Die Reaktionsansätze enthielten 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin), 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP (spez. Radioaktivität 1145 cpm/pmol ATP), 1  $\mu\text{M}$  IRKD und variierende Substratkonzentrationen hIRS-1 p30. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Kinase gestartet und nach 20 Minuten durch SDS-Probenpuffer beendet. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und der spezifische Phosphateinbau und die Phosphoaminosäure-Zusammensetzung bestimmt. **A:** Autoradiographie nach SDS-PAGE **B:** Phosphoaminosäure-Analyse. 5  $\mu\text{M}$  hIRS-1 p30 Phosphotyrosin: 65 %, Phosphoserin: 25 %, Phosphothreonin 10 %. 25  $\mu\text{M}$  hIRS-1 p30 Phosphotyrosin: 95 %, Phosphoserin: 5 %, Phosphothreonin 0 %. Autoradiographie nach zweidimensionaler Elektrophorese.

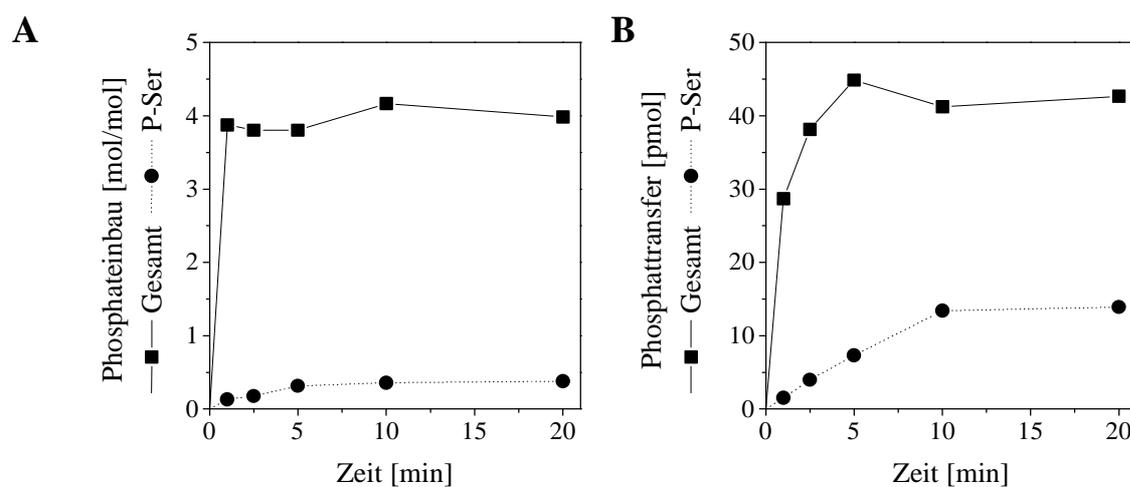
Probe	Phosphateinbau [cpm]	Phosphateinbau [pmol]	P-Ser/P-Thr [%]
IRKD	47543	49,8	24
IRKD + 1 $\mu\text{M}$ hIRS-1 p30	n.b	n.b	23
IRKD + 5 $\mu\text{M}$ hIRS-1 p30	37144	38,9	19
IRKD + 10 $\mu\text{M}$ hIRS-1 p30	27397	28,7	10
IRKD + 25 $\mu\text{M}$ hIRS-1 p30	25645	26,9	6
1 $\mu\text{M}$ hIRS-1 p30	n.b	n.b	n.b.
5 $\mu\text{M}$ hIRS-1 p30	29702	31,1	36
10 $\mu\text{M}$ hIRS-1 p30	81520	85,5	30
25 $\mu\text{M}$ hIRS-1 p30	206900	216,9	11

spezifische Radioaktivität: 954 cpm/pmol ATP

**Tab. 6.4: Zusammenfassung des Phosphateinbaus und der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung der Proteine aus Abb. 6.14.** Die Gelbanden aus Abb. 6.14 wurden ausgeschnitten der Phosphateinbau durch Messung der Cerenkov-Strahlung und die Phosphoaminosäure-Zusammensetzung nach Auftrennung der Phosphoaminosäuren durch Dünnschichtchromatographie quantifiziert (n.b.: nicht bestimmt).

Um einen Einblick in den Zeitverlauf der Substratphosphorylierung zu erhalten, wurde der Phosphateinbau und die Phosphoaminosäure Zusammensetzung der Kinase und des Substrates analysiert. Der Ansatz enthielt 5  $\mu\text{M}$  IRS-1 p30, 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin) und 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet, zu den entsprechenden Zeitpunkten Aliquots entnommen, die Reaktion durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet und die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Bestimmung des Phosphateinbaus durch Zählung der Cerenkov-Strahlung wurden die

erhaltenen Gelbanden tryptisch eluiert und nach saurer Partialhydrolyse die Phosphoamino säure-Zusammensetzung durch Dünnschichtchromatographie und Phosphoimager-Analyse quantifiziert (Abb. 6.15). Die Anwesenheit des Substrates führt zu einer leicht reduzierten Gesamtphosphatinkorporation im Enzym. Nach einer Reaktionszeit von 20 Minuten beträgt der spezifische Phosphat einbau 4 mol/mol, die Initialgeschwindigkeit der Autophosphorylierungsreaktion ergibt sich zu  $86 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ . Im Vergleich zu einer Autophosphorylierung ohne Substrat erreicht die Kinase nur etwa 50 % der möglichen Serinphosphorylierung (vgl. Abb. 4.3). Der spezifische Phosphateinbau in Serinreste beträgt in dieser Reaktion 0,4 mol/mol, die Initialgeschwindigkeit  $2,9 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ . Auf das Substrat werden 40 pmol Phosphat übertragen. Die Initialgeschwindigkeit der Reaktion ergibt sich zu  $64 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ . Nach 20 Minuten Reaktionszeit werden 13,9 pmol Phosphoserin/-threonin detektiert. Die Initialgeschwindigkeit dieser Reaktion ist mit  $3,3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  den Initialgeschwindigkeiten der Serinphosphorylierung der GST-CT-Fusionsproteine vergleichbar.



**Abb. 6.15: Zeitverlauf der Substratphosphorylierung von hIRS-1 p30 durch die IRKD.** Der Reaktionsansatz enthielt  $1 \mu\text{M}$  Poly(Lysin),  $250 \mu\text{M}$   $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ,  $5 \mu\text{M}$  hIRS-1 p30 und  $1 \mu\text{M}$  IRKD. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Kinase gestartet. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und die Reaktion durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Nach Auftrennen der Proteine durch SDS-PAGE erfolgte die Bestimmung des Phosphateinbaus und die Analyse der Phosphoamino säure-Zusammensetzung. **A:** IRKD **B:** hIRS-1 p30.

#### 6.4.4 Die Serinphosphorylierung von Gab-1.

In Zusammenarbeit mit Herrn S. Lehr aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Müller-Wieland (Klinik II und Poliklinik für Innere Medizin, Universität zu Köln) und Frau Dr. Affüpper wurden die kinetischen Konstanten für Teilbereiche und für das Gesamtprotein des 1996 entdeckten Gab1 (Grb2-associated binder-1, Holgado-Madruga et al. 1996) bezüglich der Phosphorylierung durch die EGF-Rezeptorkinase und der IRKD untersucht (Tab. 6.2). Das 77 kDa große Protein gilt als Adapterprotein in der Insulinrezeptor- und EGF-Rezeptor-Signalweiterleitung. Gab1 zeigt große Homologien in der Aminosäuresequenz und seinen strukturellen Motiven zu dem Signalprotein IRS-1. Das Gesamtprotein enthält 47 potentielle Serin- und Threoninphosphorylierungsstellen und 16 potentielle Tyrosinphosphorylierungsstellen. Die Untersuchung der Teilbereiche und des Gesamtproteins in der Substratphosphorylierung durch die lösliche EGF-Rezeptorkinase und die IRKD zeigte, daß sich deutliche Unterschiede in den apparenten  $K_m$ -Werten für die Proteine ergeben. In neueren Untersuchungen konnte Herr Lehr zeigen, daß diese Unterschiede in einem differenzierten Phosphorylierungsmuster der beiden Kinasen begründet sind, welche damit auch zu unterschiedlichen Signalweiterleitungen in der Zelle führen (Lehr et al. eingereicht zur Publikation).

Substrat	EGFRK	IRKD
GST-Gab-NT	4,0 ± 0,4 µM	3,0 ± 1,1 µM
GST-Gab-MT	4,9 ± 1,5 µM	6,3 ± 1,5 µM
GST-Gab-CT	2,4 ± 0,5 µM	12,8 ± 2,2 µM
Gab1	2,7 ± 0,5 µM	21,3 ± 5,6 µM

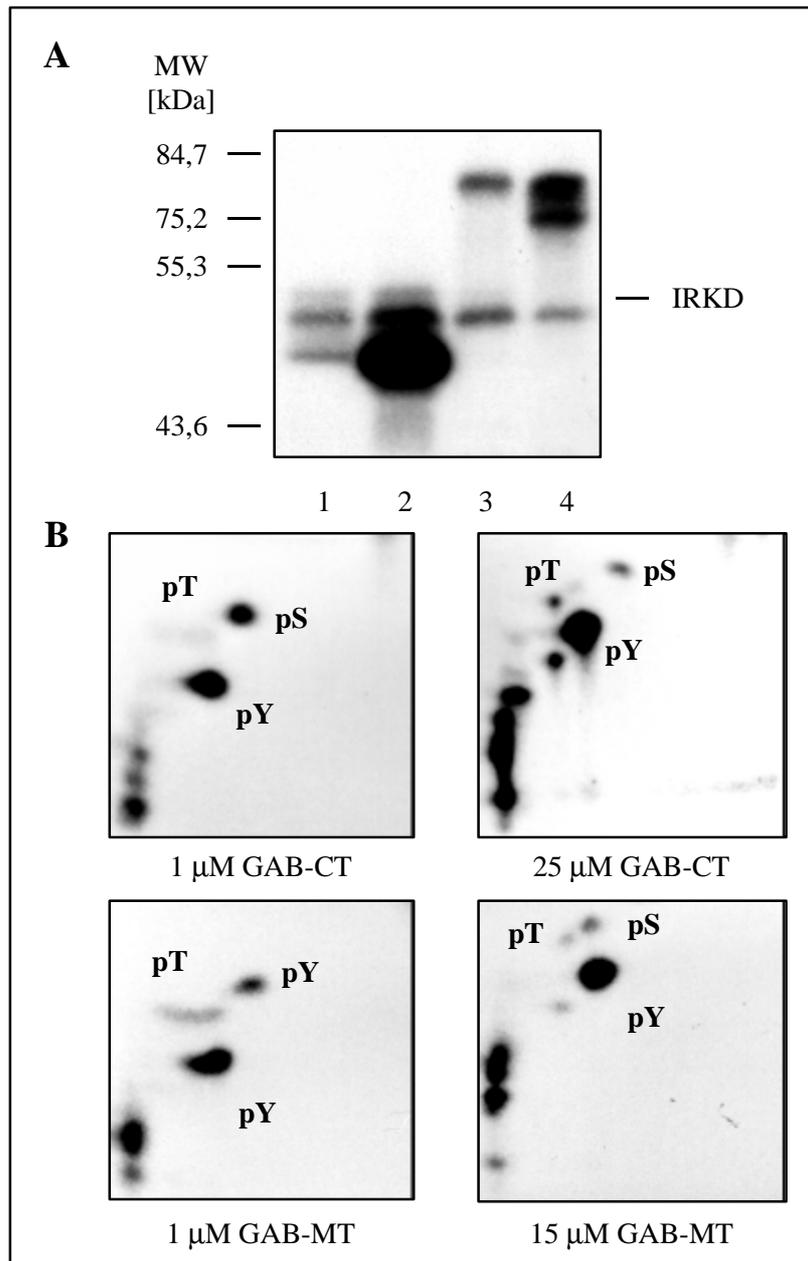
**Tab. 6.2:** Vergleich der apparenten  $K_m$ -Werte für Teilbereiche und für das Gesamtprotein des Signalproteins Gab1.

In den folgenden Untersuchungen wurden die rekombinanten Fragmente des humanen Gab-1 Proteins qualitativ hinsichtlich einer möglichen Serin- oder Threoninphosphorylierung durch die IRKD analysiert. Dabei sollte auch der Einfluß der Substrate auf die Serinautophosphorylierung der Kinase untersucht werden. Für den N-terminalen Anteil konnte von Herrn Lehr bereits gezeigt werden, daß das Substrat ausschließlich an Tyrosinresten phosphoryliert wird. Im folgenden wurde daher das mittlere und C-terminale Fragment in einer Substratphosphorylierungsreaktion eingesetzt. Die Reaktionsansätze enthielten die jeweiligen Substratkonzentrationen, 1 µM Poly(Lysin) und 250 µM [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Kinase gestartet und nach 20 Minuten Reaktionszeit durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE und Lokalisation der Proteinbanden durch Autoradiographie wurde die spezifische Phosphatinkorporation der Proteine ermittelt und die Phosphoaminosäure-Zusammensetzung durch zweidimensionale Elektrophorese analysiert (Abb. 6.16, Tab. 6.4). Beide Proteine werden durch das Enzym phosphoryliert (Abb. 6.16 A). Die Anwesenheit von 1 µM GAB-CT oder GAB-MT führt zu keiner Beeinträchtigung der molaren Einbauraten in die IRKD, sie erreicht in beiden Fällen etwa 4,5 mol/mol (Tab. 6.4). Der Serinphosphatanteil in der Kinase beträgt in beiden Fällen ca. 24 %. Der Phosphotransfer auf die beiden Substrate ist bei dieser Konzentration ungefähr gleich (GAB-CT: 43,3 pmol; GAB-MT: 36,1 pmol). Die Analyse der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung zeigt, daß in beiden Proteinen Serin- und Threoninphosphorylierung erhalten wird. In GAB-CT werden 26,9 % Phosphoserin und 1,6 % Phosphothreonin detektiert, während in GAB-MT der Anteil der Serin- bzw. Threoninphosphorylierung 15,7 % und 12,5 % beträgt. Die Anwesenheit der hohen Substratkonzentration führt in beiden Fällen zu einer Veränderung der elektrophoretischen Mobilität der Proteine, die mit einer Hemmung der Kinaseautophosphorylierung einhergeht.

spez. Radioaktivität [cpm/pmol ATP]	Probe	Phosphateinbau [cpm]	Phosphateinbau [pmol]	P-Ser [%]	P-Thr [%]
435	IRKD	20690	47,56	25,2	-
	1 µM GAB-CT	18841	43,31	26,9	1,55
1680	IRKD	45948	27,35	10,1	-
	25 µM Gab-CT	459280	273,38	2,77	0,08
704	IRKD	31107	44,19	23,4	-
	1 µM Gab-MT	25417	36,10	15,73	12,49
503	IRKD	17728	35,24	15,8	-
	15 µM GAB-MT	82100	163,22	2,88	2,54

**Tab. 6.4:** Quantifizierung des Phosphateinbaus und der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung der Proteine aus Abb. 6.16.

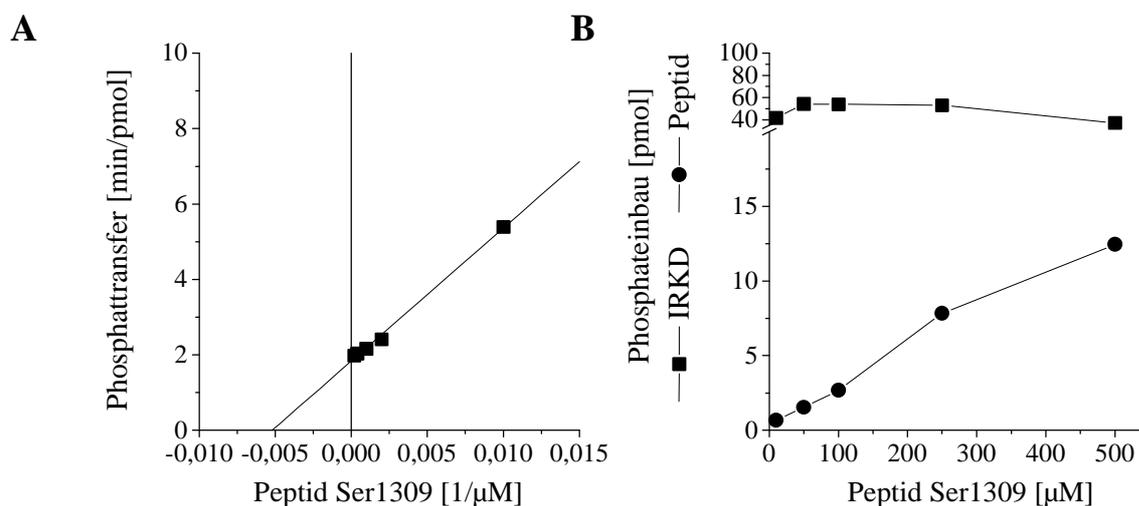
Allerdings ist der Einfluß auf die Kinase verschieden. Während GAB-CT zu einer Reduktion der Kinase-Autophosphorylierung von etwa 40 % führt, ist der Phosphateinbau bei Anwesenheit von 15 µM GAB-MT nur um etwa 20 % vermindert. Der Serinphosphatanteil in der Kinase beträgt im Fall von GAB-CT 0,3 mol/mol, im Fall von GAB-MT 0,6 mol/mol. Die höhere Substratkonzentration führt in beiden Fällen zu einem erhöhten Phosphateinbau in die Proteine (GAB-CT: 270 pmol; GAB-MT: 163 pmol). Dabei vermindert sich in beiden Fällen der prozentuale Anteil der Serin- und Threoninphosphorylierung.



**Abb. 6.16: Substratphosphorylierungen der rekombinanten Fragmente aus Gab-1 (GAB-CT und GAB-MT) durch die IRKD.** Die Ansätze enthielten 1  $\mu$ M Poly(Lysin), 250  $\mu$ M [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP und 1 bzw. 25  $\mu$ M Substrat. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Kinase gestartet und nach 20 Minuten durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. **A:** Autoradiographie nach SDS-PAGE. Molekulargewichtsmarker Broad Range 1: IRKD + 1  $\mu$ M Gab-CT, 2: IRKD + 25  $\mu$ M Gab-CT, 3: IRKD + 1  $\mu$ M Gab-MT, 4: IRKD + 15  $\mu$ M Gab-MT. **B:** Phosphoaminosäure-Analysen der phosphorylierten Substrate. Die Proteine aus den Gelbanden tryptisch eluiert, partiell hydrolysiert und durch zweidimensionale Elektrophorese aufgetrennt. Autoradiographie nach zweidimensionaler Elektrophorese.

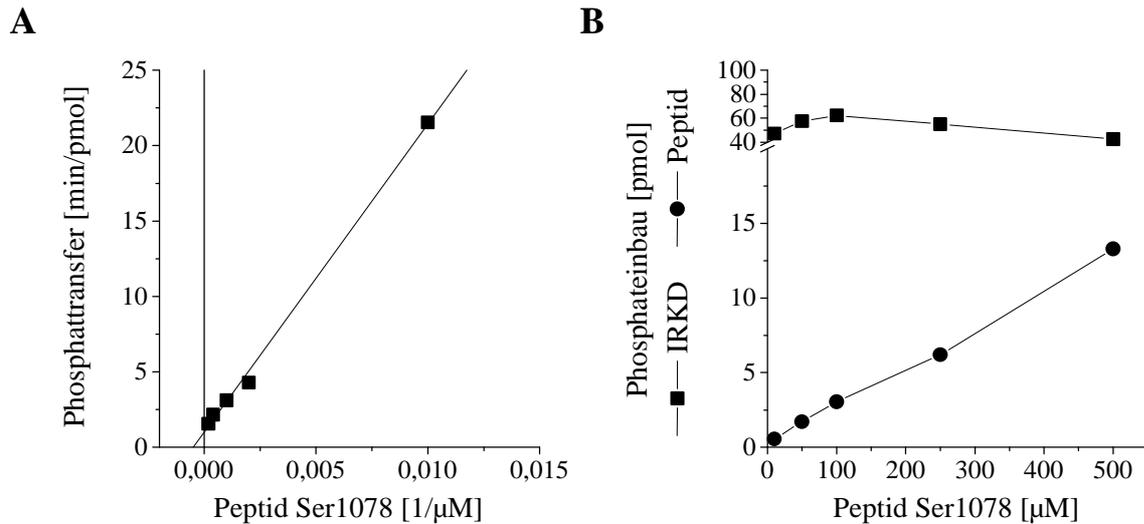
### 6.4.5 Die Substratphosphorylierung synthetischer Peptide

Eine weitere Möglichkeit die Phosphotransferaseaktivität der IRKD zu charakterisieren ist die Verwendung von synthetischen Peptiden, die die Autophosphorylierungsstellen des Enzyms beinhalten. In allen bisherigen Untersuchungen mit diesen Substraten wurden ausschließlich kurze Peptide gewählt (10-15 Aminosäuren), die die Tyrosinphosphorylierungsstellen der katalytischen Domäne und des C-Terminus des Insulinrezeptors beinhalten. Dabei zeigten sich immer  $K_m$ -Werte im millimolaren Bereich. Im Gegensatz dazu werden für die rekombinanten Fusionsproteine  $K_m$ -Werte im mikromolaren Bereich erhalten. Dies deutet darauf hin, daß für eine effektive Substraterkennung nicht nur die direkte Nachbarschaft der Phosphorylierungsstellen eine Rolle spielt, sondern auch weiter entfernte Bereiche im Substrat. Im folgenden sollte daher die Frage untersucht werden, ob es in einem synthetischen Peptid, welches die Serinphosphorylierungsstelle 1309 und die Tyrosinphosphorylierungsstelle 1316 enthält auch eine Serinphosphorylierung durch die IRKD katalysiert werden kann. Das Peptid umfaßt die Aminosäuren 1305-1319 des humanen Insulinrezeptors (Aminosäuresequenz: DGGSSLGFKRSYEEH). Das Substrat wurde in einem Konzentrationsbereich von 1-500  $\mu\text{M}$  zusammen mit der IRKD in einer Substratphosphorylierungsreaktion eingesetzt. Die Reaktionsansätze enthielten 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin), 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP und 1  $\mu\text{M}$  Enzym. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Kinase gestartet und nach 1 Minute zur Bestimmung der kinetischen Konstanten der Phosphorylierung und nach 20 Minuten für die Bestimmung des maximalen Phosphateinbaus durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Nach Auftrennen der Proteine in einer Tricine-SDS-PAGE wurde der Phosphateinbau und die Phosphoaminosäure-Zusammensetzung von Substrat und Kinase bestimmt (Abb. 6.17). Das Peptid erweist sich für die Kinase als ineffizientes Substrat. Unter Berücksichtigung der Werte für die Phosphatinkorporation nach einer Reaktionszeit von einer Minute kann ein apparter  $K_m$ -Wert von 192  $\mu\text{M}$  und ein  $V_{\text{max}}$ -Wert von 12  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  angegeben werden. Die Analyse nach einer Reaktionszeit von 20 Minuten zeigt mit steigender Substratkonzentration eine lineare Zunahme der Phosphatinkorporation in das Peptid. Im untersuchten Konzentrationsbereich kommt es aber dabei nicht zu einer signifikanten Beeinträchtigung der Kinase-Autophosphorylierung. Die Untersuchung der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung des Peptids zeigt eine ausschließliche Tyrosinphosphorylierung des Substrates (Daten nicht gezeigt). Demzufolge scheint die Kinase Serinphosphorylierung in diesem Peptid nicht katalysieren zu können.



**Abb. 6.17: Substratphosphorylierung des synthetischen Peptids Ser1309 durch die IRKD.** Die Ansätze enthielten jeweils 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin), 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP, variierende Substratkonzentrationen und 1  $\mu\text{M}$  IRKD. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Kinase gestartet und nach 1 und 20 Minuten durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Im Anschluß erfolgte die Bestimmung des Phosphateinbaus und die Analyse der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung. **A:** Lineweaver-Burk-Plot **B:** Phosphateinbau nach 20 Minuten Reaktionszeit.

In einem weiteren Experiment wurde ein synthetisches Peptid untersucht, für welches eine Serinphosphorylierung am Serinrest Ser<sup>1078</sup> durch eine exogene Serinkinase beschrieben werden konnte (Carter et al. 1995). Das Peptid umfaßt die Aminosäuren 1072-1084 (Aminosäuresequenz: AHDGLKSYLRSLR) des Insulinrezeptors. In Analogie zum obigen Experiment wurde dieses Substrat in einer Substratphosphorylierungsreaktion eingesetzt und die kinetischen Konstanten der Phosphorylierung und die Phosphoaminosäure-Zusammensetzung analysiert (Abb. 6.18). Interessanterweise wird dieses Peptid durch die Kinase erkannt und phosphoryliert. Die Untersuchung der kinetischen Konstanten ergab einen apparenten  $K_m$ -Wert von 209  $\mu\text{M}$  und einen  $V_{\text{max}}$ -Wert von 3  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . Die Analyse der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung zeigt jedoch, daß dieses Peptid ausschließlich an dem enthaltenen Tyrosinrest Tyr<sup>1075</sup> phosphoryliert zu werden scheint.

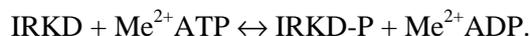


**Abb. 6.18: Substratphosphorylierung des synthetischen Peptids Ser1078 durch die IRKD.** Die Ansätze enthielten jeweils 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin), 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, variierende Substratkonzentrationen und 1  $\mu\text{M}$  IRKD. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Kinase gestartet und nach 1 und 20 Minuten durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Im Anschluß erfolgte die Bestimmung des Phosphateinbaus und die Analyse der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung. **A:** Lineweaver-Burk-Plot **B:** Phosphateinbau nach 20 Minuten Reaktionszeit.

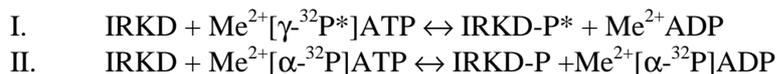
## 7 Die Transiente Phosphorylierung der IRKD

### 7.1 Untersuchungen zum ATP-Umsatz der Phosphotransferasereaktion

Die Phosphotransferasereaktion der IRKD folgt formal der Gleichung:

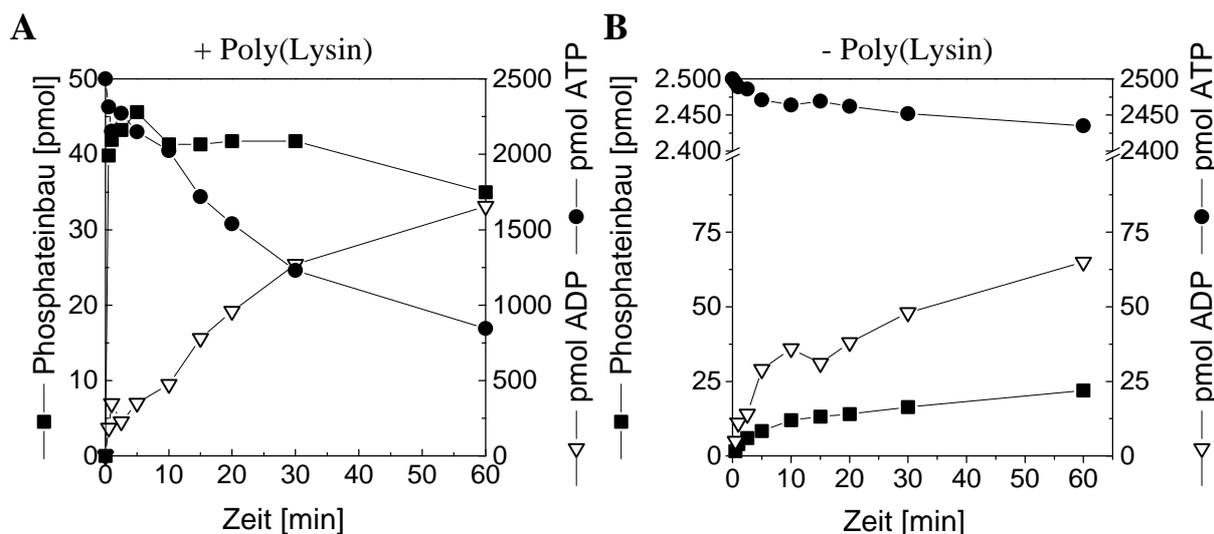


Als Akzeptor der Phosphorylgruppe kommt dabei das Enzym selbst oder ein Substrat in Frage. Gemäß dieser Gleichung sollte demnach für jedes übertragene Mol Phosphat ein Mol ADP entstehen. Für die lösliche Insulinrezeptorkinase IRKD-HIS und den Insulinrezeptor konnte aber gezeigt werden, daß während der Reaktion anorganisches Phosphat freigesetzt wird (Al-Hasani et al. 1994). Für eine detaillierte Analyse dieses Befundes wurde von Herrn Dr. Al-Hasani ein Doppelmarkierungsexperiment entwickelt. In diesem Experiment wird die Kinasereaktion in Gegenwart einer definierten Mischung aus  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  und  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  durchgeführt. Die Kinase wird durch das  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  markiert (Gl. I) und nach Abtrennen des freien ATP kann die Phosphatinkorporation in das Molekül ermittelt werden. Der ATP-Verbrauch während der Reaktion wird nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung der Nukleotide durch Quantifizierung des des entstandenen  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ADP}$  verfolgt (Gl. II).



Die Differenz von inkorporiertem Phosphat in das Enzym und verbrauchtem ATP entspricht dann der freigesetzten Phosphatmenge. Zur Untersuchung des ATP-Umsatzes der IRKD-Phosphotransferasereaktion in An- oder Abwesenheit von Poly(Lysin) wurden im Rahmen einer Diplomarbeit (Koch 1998) zeitabhängige Autophosphorylierungen durchgeführt. Die Ansätze enthielten 250  $\mu\text{M}$  ATP, die radioaktive Markierung bestand aus 45 %  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  und 55 %  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ . Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  Enzym gestartet und zu definierten Zeitpunkten zwei Aliquots entnommen. Zur Bestimmung des Phosphateinbaus wurde die Reaktion in dem einen Aliquot durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet und die Kinase durch SDS-PAGE getrennt. Das andere Aliquot wurde zur Bestimmung des ATP/ADP-Verhältnisses in 300  $\mu\text{M}$  EDTA überführt und nach einer Dünnschichtchromatographie der jeweilige Anteil durch Phosphoimageranalyse quantifiziert. Die Kinetiken der beiden Reaktionen sind in der Abbildung 7.1 dargestellt.

In der Poly(Lysin) stimulierten Reaktion werden in 60 Minuten 4-4,5 mol Phosphat pro mol Enzym inkorporiert (Abb. 7.1 A). Die Halbwertszeit dieser Reaktion beträgt 0,5-1 Minute. Während die Phosphatinkorporation im Verlauf der Zeit in die Sättigung geht, hält die ADP-Bildung weiter an. Nur in der initialen Phase der Reaktion ist die ADP-Bildung der Phosphatinkorporation äquimolar, nach 10 Minuten Reaktionszeit beträgt das Verhältnis von inkorporierter Radioaktivität und entstandenem ADP bereits 1:50. Nach bereits 30 Minuten ist die Hälfte des eingesetzten ATP zu ADP umgesetzt, nach 60 Minuten sind etwa 70 % zu ADP hydrolysiert. Im Vergleich dazu sind in der nicht Poly(Lysin) stimulierten Reaktion Phosphateinbau und ATP-Umsatz deutlich geringer (Abb. 7.1 B). Der maximale Phosphateinbau nach 60 Minuten beträgt 2,2 mol Phosphat pro mol Enzym, die Halbwertszeit dieser Reaktion ist 10 Minuten. In der initialen Phase der Reaktion ist der Phosphateinbau von einer Bildung äquimolarer Mengen ADP begleitet, nach 10 Minuten beträgt das Verhältnis 1:4. Nach 60 Minuten werden etwa 60 pmol ADP erhalten (2,5 % des eingesetzten ATP), im Vergleich zur stimulierten Reaktion ist dieser Endwert jedoch um den Faktor 15 niedriger. Der gesteigerte ATP-Umsatz könnte auf eine Fremdaktivität im Reaktionsansatz zurückzuführen sein. Bei dieser Fremdaktivität könnte es sich zum einen um eine Phosphatase oder eine ATPase handeln. Eine Phosphatase im Reaktionsansatz würde die Kinase permanent dephosphorylieren und dadurch eine Rephosphorylierung des Enzyms unter ATP-Verbrauch bewirken. Dagegen würde eine ATPase, parallel zur Autophosphorylierungsreaktion, ATP hydrolysieren und somit den erhöhten ATP-Umsatz hervorrufen.



**Abb. 7.1: Zeitverlauf des Phosphateinbaus und der Bildung von ADP während der IRKD-Autophosphorylierung in Abhängigkeit der Poly(Lysin)-Stimulation.** Die Ansätze enthielten 250  $\mu\text{M}$  [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP und [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP und 1  $\mu\text{M}$  Kinase. Die Reaktionen wurden in An- oder Abwesenheit von 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin) durch Zugabe des Enzyms gestartet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und der Phosphateinbau des Proteins nach SDS-PAGE und die Menge an ATP und ADP durch dünnschichtchromatographische Auftrennung der Nukleotide bestimmt. **A:** Zeitverlauf in Anwesenheit von 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin). **B:** Zeitverlauf in Abwesenheit von 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin).

Das der gesteigerte ATP-Umsatz eine intrinsische Eigenschaft der Rezeptorkinase ist, konnte durch mehrere Befunde gestützt werden. Die Zugabe von Inhibitoren der Kinaseaktivität (AMP-PNP oder Staurosporin) führt nach Vorphosphorylierung des Enzyms zu keinem Verlust der inkorporierten Radioaktivität (Al-Hasani 1995, Koch 1998). Somit ist keine Phosphataseaktivität im Reaktionsansatz vorhanden. Desweiteren zeigten die kinaseinaktiven Varianten der IRKD (IRKD-K1018A und IRKD-D1120A) keinerlei ATP-Umsatz während einer Reaktionszeit von 60 Minuten (Nölle 1998). Demnach ist der erhöhte ATP-Umsatz direkt an die enzymatische Aktivität des Enzyms gekoppelt. Die Aktivierung der Kinaseaktivität durch Poly(Lysin), die mit einer Erhöhung des ATP-Umsatzes einhergeht, spricht ebenfalls für diesen Befund.

## 7.2 Die transiente Phosphorylierung der IRKD

### 7.2.1 Die Chase-Reaktion mit der IRKD

Der erhöhte ATP-Umsatz in der Phosphotransferase-Reaktion der IRKD ist eine intrinsische Eigenschaft des Enzyms. Daher ergibt sich die Frage, ob es sich bei dieser intrinsischen Aktivität um eine „ATPase- oder eine Phosphatase-Aktivität“ handelt. Bei einer intrinsischen „ATPase-Aktivität“ würde ATP gespalten und die  $\gamma$ -Phosphorylgruppe auf das Enzym selbst, ein Substrat oder auf Wasser übertragen. In der initialen Phase der Reaktion würde demnach bei einer konstanten Wechselzahl des Enzyms nur die Übertragung auf Phosphorylierungsstellen des Enzyms oder des Substrates stattfinden, danach überwiegt die Übertragung auf Wasser, wobei anorganisches Phosphat entsteht. Eine intrinsische Phosphataseaktivität würde nach Phosphorylierung des Enzyms zu einer Dephosphorylierung führen, wobei anorganisches Phosphat entsteht. Anschließend käme es zu einer Rephosphorylierung der Kinase unter ATP-Verbrauch. Demnach müssten in der Kinase transiente Phosphorylierungsstellen nachweisbar sein. Denkbar wäre auch, daß das Phosphoenzym und das gebildete ADP zur Rückreaktion zu ATP und Dephosphoenzym führen könnte. Allerdings spricht gegen diese Annahme, daß in der Messung des ATP-Umsatzes keine Gleichgewichtseinstellung zwischen Phosphoenzym und ADP-Bildung beobachtet wird.

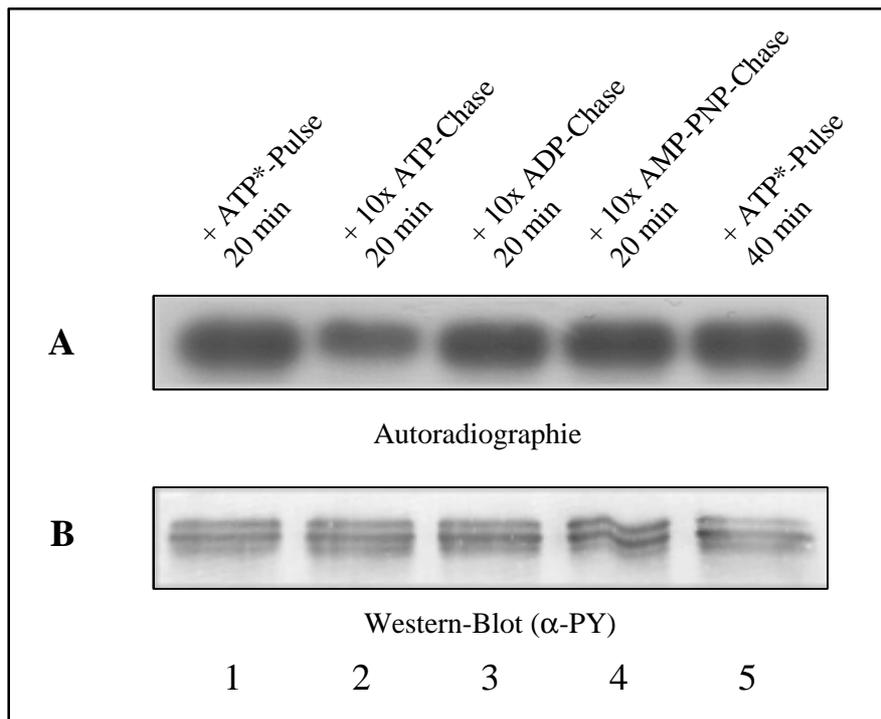
Um diese Aktivitäten der Kinase zu unterscheiden, eignen sich Pulse-Chase Experimente, die mit radioaktiv und nicht radioaktiv markiertem ATP durchgeführt werden. In der Pulse-Reaktion wird die  $\gamma$ -Phosphorylgruppe des ATP auf das Enzym übertragen. Dabei wird radioaktiv markiertes [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP (ATP\*) verwendet.



Der Pulse-Reaktion folgt eine Chase-Reaktion durch Zugabe eines 10-20fachen Überschusses an nicht radioaktiv markiertem ATP:



Danach sollten sich „ATPase-Aktivität“ oder „Phosphatase-Aktivität“ des Enzyms unterscheiden lassen. In der Chase-Reaktion steht mehr nicht radioaktiv markiertes ATP als markiertes ATP zur Verfügung. Besitzt das Enzym eine intrinsische „Phosphatase-Aktivität“ (Gleichung IIa), sollte dieses zur Dephosphorylierung des Enzyms führen. Eine erneute Rephosphorylierung würde dann aufgrund der Erniedrigung der spezifischen Aktivität mit unmarkiertem ATP stattfinden. Im Gegensatz dazu sollte eine „ATPase-Aktivität“ nicht zu einem Verlust der inkorporierten Radioaktivität führen (Gleichung IIb). Im Versuch wurde die Poly(Lysin) stimulierte Kinase in Gegenwart von radioaktiv markiertem ATP für 20 Minuten phosphoryliert und anschließend der Ansatz in vier Teile aufgetrennt. Ein Aliquot wurde für weitere 20 Minuten inkubiert, zum zweiten Aliquot wurde ein 10facher Überschuss an nicht radioaktiv markiertem ATP zugefügt und für weitere 20 Minuten inkubiert (Chase-Reaktion). Dem dritten bzw. vierten Aliquot wurden 2,5 mM ADP bzw. AMP-PNP hinzugesetzt und die Ansätze ebenfalls für weitere 20 Minuten inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet und die erhaltenen Proben geteilt. Die Proteine des einen Teils wurden durch SDS-PAGE getrennt und der Phosphateinbau der IRKD durch Messung der Radioaktivität der entsprechenden Gelbanden bestimmt (Abb. 7.2 A). Die Proteine der anderen Probe wurden ebenfalls durch SDS-PAGE getrennt und anschließend eine Western-Blot-Analyse mit  $\alpha$ -Phosphotyrosin-Antikörper zur Bestimmung des Phosphorylierungsstatus durchgeführt (Abb. 7.2B). Die Kinase inkorporiert nach einer Reaktionszeit von 20 Minuten 4 mol/mol, dabei blieb der Phosphateinbau bis zu 40 Minuten konstant. In der Chase-Reaktion verliert das Enzym nahezu 50 % der inkorporierten Radioaktivität, dagegen ist in der Reaktion mit ADP oder AMP-PNP ein 10 %iger bzw. gar kein Verlust an inkorporierter Radioaktivität erkennbar (Tab. 7.1). In der Western-Blot-Analyse des Versuches zeigt sich, daß, obwohl es zu einem Verlust der Phosphate in der Chase-Reaktion kommt, dieses nicht auf einen Verlust des Phosphorylierungsgrades bzw. Proteinverlust zurückgeführt werden kann. Das Antikörpersignal scheint in allen Fällen identisch. Dieser Befund deutet auf eine intrinsische Phosphatase-Aktivität des Enzyms. Die Anwesenheit einer exogenen Phosphatase-Aktivität im Reaktionsansatz muß ausgeschlossen werden, da die Inkubation mit AMP-PNP nicht zu einem Verlust an Radioaktivität im Enzym zu führen scheint. In Anwesenheit einer exogenen Phosphatase sollte es zu einer Dephosphorylierung des inhibierten Enzyms kommen. Im Gegensatz dazu führt die Anwesenheit von Vanadat, einem potenten Inhibitor von PTPasen, in der Chase-Reaktion ebenfalls zu einem Verlust der inkorporierten Radioaktivität (Daten nicht gezeigt). Die Möglichkeit einer Rückreaktion von ADP und Phosphoenzym zu ATP und Dephosphoenzym kann nicht mit endgültiger Sicherheit verneint werden, da ein, wenn auch geringer, Verlust an inkorporierter Radioaktivität beobachtet wird. Allerdings ist das Ausmaß dieser Rückreaktion unter diesen Bedingungen sehr gering.



**Abb. 7.2: Die Autophosphorylierung der IRKD unter Pulse-Chase-Bedingungen.** Der Ansatz enthielt 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP, 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin) und 1  $\mu\text{M}$  Kinase. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Kinase gestartet und nach 20 Minuten geteilt. Zwei Teile des Ausgangsansatzes wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer nach 20 und 40 Minuten beendet. Zu weiteren jeweils gleich großen Teilen wurden ADP, ATP und AMP-PNP zu einer Endkonzentration von 2,5 mM gegeben und die Reaktion für weitere 20 Minuten fortgesetzt. Nach 20 Minuten wurden diese Reaktionen durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet und die Proteine durch SDS-PAGE getrennt. Im Anschluß erfolgte der immunologische Nachweis der Tyrosinphosphorylierung durch Western-Blot-Analyse mit  $\alpha$ -Phosphotyrosin-Antikörper und die Bestimmung des Phosphateinbaus in die Kinase. **A:** Autoradiographie nach SDS-PAGE. **B:** Immunologischer Nachweis durch  $\alpha$ -Phosphotyrosin-Antikörper.

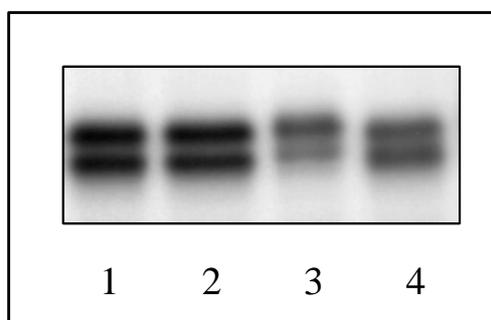
	Pulse 20 Minuten	20 Minuten			Pulse 40 Minuten
		Chase 2,5 mM ATP	+ 2,5 mM ADP	+ 2,5 mM AMP-PNP	
Phosphateinbau [cpm]	101290	58540	92920	102380	102700
Phosphateinbau [pmol]	39,75	22,97	36,47	40,18	40,31
Phosphateinbau [mol/mol]	3,97	2,29	3,65	4,02	4,03

spez. Radioaktivität: 2548 cpm/pmol ATP

**Tab. 7.1. Zusammenfassung der Autophosphorylierung der IRKD unter Pulse-Chase-Bedingungen.** Quantitative Analyse nach Bestimmung der Radioaktivität durch Messung der Cerenkov-Strahlung der Proteinbanden aus Abb. 7.2.

Das folgende Experiment zeigt, daß die transiente Phosphorylierung des Enzyms unmittelbar an seine katalytische Aktivität gekoppelt ist (Abb. 7.3). Das Enzym wurde für 20 Minuten in Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin) und 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP inkubiert und der Reaktionsansatz anschließend geteilt. Die Reaktion in einem Teil wurde durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Den anderen Teilen wurde 2,5 mM nichtradioaktiv markiertes ATP, 2,5 mM ATP und 100 mM EDTA und 2,5 mM ATP und 1 mM AMP-PNP zugefügt. Die Reaktionen wurden nach 20 Minuten durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet und anschließend die Proteine durch SDS-PAGE getrennt.

In Anwesenheit der Inhibitoren wird das Ausmaß der transienten Phosphorylierung deutlich reduziert. Während in der nicht inhibierten Reaktion ein Austausch von 50 % der inkorporierten Radioaktivität beobachtet wird, zeigt die durch EDTA inhibierte Kinase keinen Verlust. Die Anwesenheit von AMP-PNP führt dagegen zu einer geringeren Abnahme der inkorporierten Radioaktivität, die in einer Konkurrenz von ATP und AMP-PNP begründet ist ( $EC_{50}$ : 0,5 mM bei 100  $\mu$ M ATP).



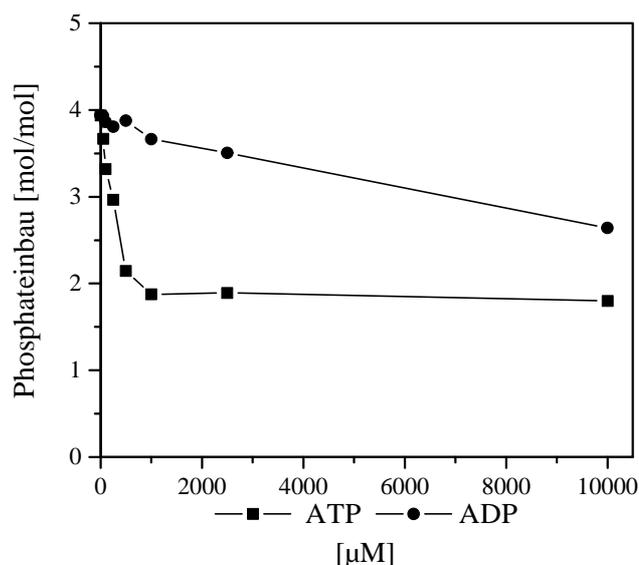
**Abb. 7.3: Autophosphorylierung unter Pulse-Chase-Bedingungen in Abhängigkeit von der Kinaseaktivität.** Der Reaktionsansatz enthielt 1  $\mu$ M Poly(Lysin), 250  $\mu$ M [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP und 1  $\mu$ M IRKD. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Kinase gestartet und nach 20 Minuten geteilt. Zwei Teile des Ansatzes wurden nach 20 und 40 Minuten durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Zu den weiteren Teilen wurde ATP, ATP/EDTA und ATP/AMP-PNP in den angegebenen Konzentrationen zugefügt und diese für weitere 20 Minuten inkubiert. Nach dieser Reaktionszeit wurden die Reaktionen durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet und der spezifische Phosphateinbau bestimmt. 1: Pulse, 2: Chase ATP + EDTA, 3: Chase, 4: Chase ATP + AMP-PNP. Autoradiographie nach SDS-PAGE.

	Pulse 20 Minuten	20 Minuten		
		Chase 1 mM ATP	Chase 1 mM ATP 100 mM EDTA	Chase 1 mM ATP 1 mM AMP-PNP
Phosphateinbau [cpm]	74728	34995	73942	46318
Phosphateinbau [pmol]	42,87	20,08	42,42	26,57
Phosphateinbau [mol/mol]	4,29	2,01	4,24	2,66

spez. Radioaktivität: 1743 cpm/pmol ATP

**Tab. 7.2: Autophosphorylierung unter Pulse-Chase-Bedingungen in Abhängigkeit von der Kinaseaktivität.** Quantitative Analyse nach Bestimmung der Radioaktivität durch Messung der Cerenkov-Strahlung der Proteinbanden aus Abb. 7.3.

Im folgenden wurde die Chase-Reaktion der Kinase in Abhängigkeit von der ATP- und ADP-Konzentration untersucht. Das Enzym wurde für 20 Minuten in Gegenwart von 250  $\mu$ M [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP vorphosphoryliert und anschließend der Reaktionsansatz in gleiche Aliquots aufgeteilt, denen jeweils variierende Konzentrationen an ATP und ADP zugefügt wurden. Die Reaktionen wurden für weitere 20 Minuten fortgesetzt, nach diesem Zeitpunkt durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet und die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Zugabe an ADP in verschiedenen Konzentrationen führt in dem Konzentrationsbereich von 50 - 10000  $\mu$ M zu einer linearen Abnahme der inkorporierter Radioaktivität im Enzym. Die Zugabe von 10 mM ADP zum Reaktionsansatz vermindern den Phosphateinbau um 33 %. Im Gegensatz dazu führen schon geringe ATP-Konzentrationen zu einer starken Reduktion der inkorporierten Radioaktivität. Dieser Verlust ist in einem Konzentrationsbereich von 50 - 500  $\mu$ M kontinuierlich, höhere Konzentrationen bewirken aber keine weitere Verminderung. Der Verlust an inkorporierter Radioaktivität beträgt dabei 50 %.



**Abb. 7.4: Pulse-Chase-Reaktion der IRKD in Abhängigkeit der ATP und ADP-Konzentration.** Der Reaktionsansatz enthielt 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin), 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP und 1  $\mu\text{M}$  IRKD. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Kinase gestartet und nach 20 Minuten geteilt. Die Reaktion in zwei Teilen des Ausgangsansatzes wurden nach 20 und 40 Minuten durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Zu den weiteren Teilen wurde ADP und ATP zu den angegebenen Endkonzentrationen zugefügt und die Reaktion für weitere 20 Minuten fortgesetzt. Nach dieser Zeit wurden die Reaktionen durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet und nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE der Phosphateinbau ermittelt.

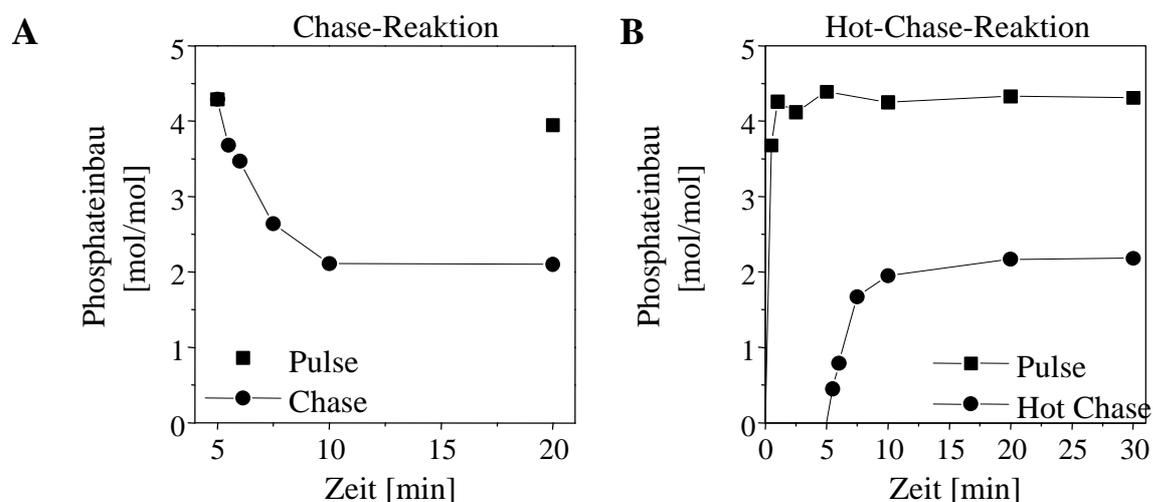
### 7.2.2 Zeitverlauf der transienten Phosphorylierung der IRKD

Um einen Einblick in den Zeitverlauf der transienten Phosphorylierung der Kinase zu erhalten, wurde eine zeitabhängige Chase-Reaktion mit der Kinase durchgeführt. Das Enzym wurde in Anwesenheit von 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin) und 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP für 20 Minuten zur Sättigung phosphoryliert und anschließend für weitere 20 Minuten nach Zugabe von 2,5 mM nicht radioaktiv markiertem ATP inkubiert. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen, die Reaktion durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet, die Proteine durch SDS-PAGE getrennt und der Phosphateinbau bestimmt (Abb. 7.5 A). Die Zugabe des nicht radioaktiv markierten ATP führt zu einem apparenten Verlust der inkorporierten Radioaktivität. Nach 5 Minuten Reaktionszeit inkubiert das Enzym in diesem Versuch 4,3 mol/mol. Die Initialgeschwindigkeit der Abnahme der radioaktiven Phosphatinkorporation beträgt 13,6  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . Nach einer Reaktionszeit von 20 Minuten wird ein spezifischer Phosphateinbau von 2,1 mol/mol Enzym erhalten, in der Kontrollreaktion ergibt sich ein Phosphateinbau von 3,95 mol/mol. In Analogie zu einer Chase-Reaktion wurde die transiente Phosphorylierung unter Hot-Chase-Bedingungen untersucht (Abb. 7.5 B). In diesem Ansatz wird das Enzym in der Pulse-Reaktion mit nicht radioaktiv markiertem ATP bis zur Sättigung phosphoryliert und im Anschluß daran radioaktiv markiertes ATP zugefügt. Die intrinsische Phosphatase-Aktivität sollte in der Nettoreaktion demnach zu einem Austausch der nichtradioaktiv markierten Phosphorylgruppen im Enzym gegen radioaktiv markierte Phosphatreste führen.



Im Versuch wurde die Poly(Lysin) stimulierte Kinase für 5 Minuten in Gegenwart von nicht radioaktiv markiertem ATP zur Sättigung phosphoryliert (Pulse). Als Kontrolle diente ein Ansatz, der 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP enthielt. Der Phosphateinbau betrug nach 5 Minuten 4,4 mol Phosphat pro Molekül Enzym. Nach 5 Minuten wurde dem Reaktionsansatz radioaktiv markiertes [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP zugefügt und zu den jeweiligen Zeitpunkten Aliquots entnommen. Nach Abstoppen der Reaktion in

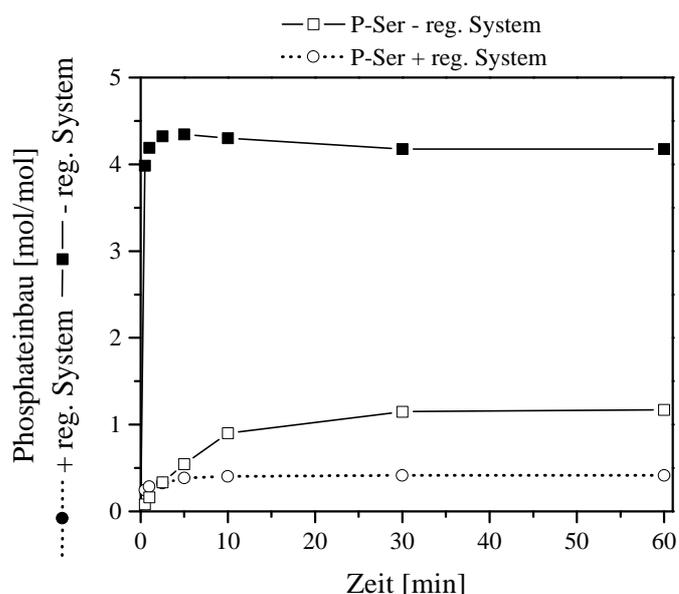
SDS-Probenpuffer und SDS-PAGE wurde der Phosphateinbau in das Enzym bestimmt. Der Versuch zeigt, daß die bereits zur Sättigung phosphorylierte Kinase noch zusätzlich radioaktives Phosphat inkorporiert. Die Inkorporation radioaktiv markierter Phosphate erreicht nach 5 Minuten eine Sättigung, nach 25 Minuten Reaktionszeit ergeben sich 2,3 mol Phosphat pro mol Enzym. Die Initialgeschwindigkeit der Reaktion ergibt sich aus dem linearen Anteil der Kurve mit  $16,6 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  und ist im Vergleich zur Autophosphorylierungsreaktion um den Faktor 10 geringer ( $153 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ). Der Vergleich der kinetischen Konstanten der Pulse-Chase und Pulse-Hot-Chase-Reaktion zeigt, daß die Initialgeschwindigkeiten der Reaktion, die zur De- und Rephosphorylierung der Kinase führen, sich um ca. 20 % unterscheiden. Der Anteil der transienten Phosphorylierung ergibt sich zu etwa 50 %. Die höhere Initialgeschwindigkeit der Hot-Chase-Reaktion führt aber zu einem schnelleren Erreichen der Sättigungsphase. Die Zugabe einer hohen ATP-Konzentration in der Chase-Reaktion kann zu ungünstigen Verhältnissen der Ionenkonzentrationen führen, die damit die Katalysegeschwindigkeit dieser Reaktion beeinträchtigen.



**Abb. 7.5: Zeitverlauf der transienten Phosphorylierung der IRKD.** **A:** Zeitverlauf unter Pulse-Chase-Bedingungen. Der Reaktionsansatz enthielt  $1 \mu\text{M}$  Poly(Lysin),  $250 \mu\text{M}$   $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  und  $1 \mu\text{M}$  IRKD. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet und der Ansatz nach 20 Minuten geteilt. Zwei Teile des Ausgangsansatzes wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer nach 20 und 40 Minuten beendet. Einem weiteren Teil wurde nicht radioaktiv markiertes ATP zu einer Endkonzentration von  $2,5 \text{ mM}$  zugefügt und zu den jeweiligen Zeitpunkten Aliquots entnommen und die Reaktion durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Nach SDS-PAGE erfolgte die Bestimmung des Phosphateinbaus. **B:** Zeitverlauf unter Pulse-Hot Chase-Bedingungen. Der Reaktionsansatz enthielt  $250 \mu\text{M}$  nicht radioaktiv markiertes ATP,  $1 \mu\text{M}$  Poly(Lysin) und  $1 \mu\text{M}$  IRKD. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Kinase gestartet und nach 5 Minuten dem Reaktionsansatz radioaktiv markiertes ATP zugefügt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und der Phosphateinbau bestimmt. Als Kontrolle diente ein Ansatz, der radioaktiv markiertes ATP enthielt.

Während der Autophosphorylierungsreaktion kommt es zur Bildung von ADP. Daher wäre es denkbar, daß ADP und Phosphoenzym in der Rückreaktion zu ATP und Dephosphoenzym führen können. Allerdings sprechen die beobachteten kinetischen Daten in der Untersuchung des ATP-Umsatzes dagegen, die belegen, daß es zu keiner Gleichgewichtseinstellung zwischen ADP und Phosphoenzym zu kommen scheint. Der Phosphateinbau in die Kinase bleibt über den gesamten Reaktionsablauf konstant, die Formation von ADP und der Abbau des ATP erfolgen kontinuierlich. Gegen diese Hypothese spricht auch die Beobachtung, daß in einer Chase-Reaktion mit  $2,5 \text{ mM}$  ADP nur ein geringer Phosphatverlust in der Kinase erhalten wird. Dennoch besteht die Möglichkeit, daß geringe Mengen an ADP ausreichend sind, um diese Rückreaktion zu katalysieren. In Gegenwart eines ATP-regenerierenden Systems wird deutlich, daß die transiente Phosphorylierung der Kinase in der Tat ein ATP-getriebenes Ereignis ist. Hierbei wird das entstandene ADP kontinuierlich mit Hilfe von Phosphoenolpyruvat und Pyruvatkinase wieder zu ATP regeneriert. Die Pyruvatkinase, ein Stoffwechsellenzym aus der Glykolyse, katalysiert spezifisch den Umsatz von Phosphoenolpyruvat und

ADP zu Pyruvat und ATP. Da kein radioaktiv markiertes Phosphoenolpyruvat für die Neusynthese des ATP verwendet wird, sollte diese konstitutive Regenerierungsaktivität in einer permanenten Verdünnung der spezifischen Radioaktivität des eingesetzten  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -Pools resultieren. Ein weiterer Vorteil dieses Systems ist, daß die Kinase-Reaktion, ähnlich den Hot-Chase-Bedingungen, unter optimalen Bedingungen verläuft, da die Ionen- und die ATP-Konzentration erhalten bleiben. Unter diesen Voraussetzungen wurden zeitabhängige Autophosphorylierungsreaktionen in An- oder Abwesenheit des ATP-regenerierenden Systems durchgeführt (in der Kontrollreaktion war kein Phosphoenolpyruvat enthalten). Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Kinase gestartet und zu den jeweiligen Zeitpunkten Aliquots entnommen. Nach Abstoppen der Reaktionen in SDS-Probenpuffer wurden die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt und der Phosphateinbau in die Kinase bestimmt (Abb. 7.6).



**Abb. 7.6: Zeitverlauf der IRKD-Autophosphorylierung in Anwesenheit eines ATP-regenerierenden Systems.** Die Ansätze enthielten 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin), 250  $\mu\text{M}$   $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Pyruvatkinase (10 U/ $\mu\text{g}$ ), 4 mM Phosphoenolpyruvat und 1  $\mu\text{M}$  IRKD. Der Kontrollreaktion wurde kein Phosphoenolpyruvat zugefügt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Kinase gestartet und zu den jeweiligen Zeitpunkten Aliquots entnommen, in denen die Reaktion durch Zugabe von SDS-Probenpuffer die Reaktion beendet wurde. Nach Auftrennen der Proteine durch SDS-PAGE wurde der Phosphateinbau und die Phosphoaminosäure-Zusammensetzung bestimmt.

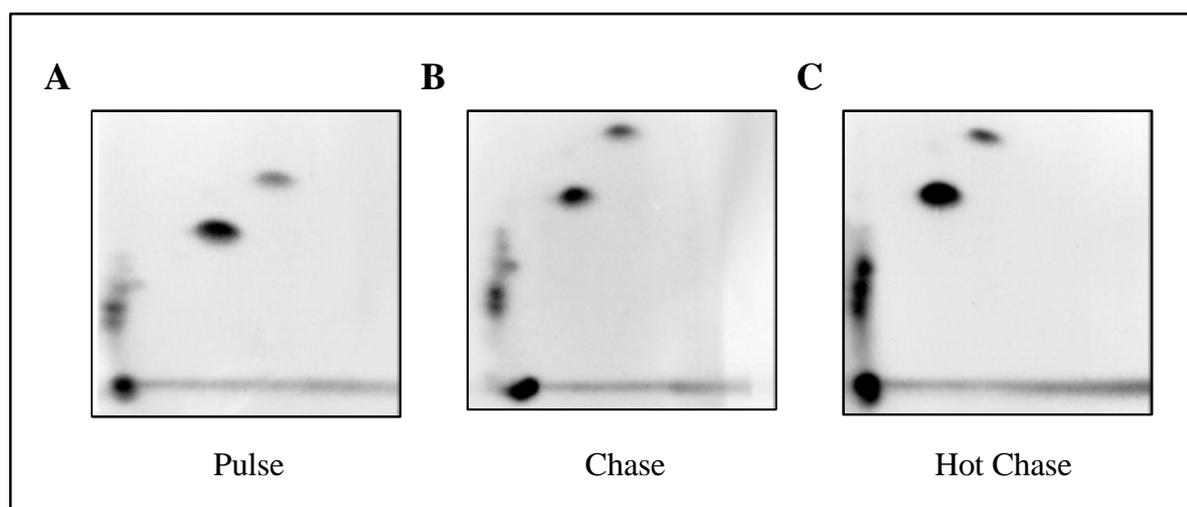
In Abwesenheit des ATP-regenerierenden Systems erreicht die Kinase nach 5 Minuten einen Phosphateinbau von ca. 4,3 mol/mol, der über den weiteren Zeitraum von 55 Minuten konstant bleibt. In Gegenwart des ATP-regenerierenden Systems ist die Initialgeschwindigkeit und der Phosphateinbau nach 5 Minuten in etwa der Kontrollreaktion vergleichbar, danach wird eine kontinuierliche Abnahme der inkorporierten Radioaktivität beobachtbar. Als Ursache hierfür muß die Neusynthese von nicht radioaktiv markiertem ATP verantwortlich gemacht werden, welche zu einer Verdünnung der spezifischen Radioaktivität und damit zu einer Chase-Reaktion während des Reaktionsverlaufes führt. Im Vergleich zur Kontrollreaktion ergeben sich nach 30 Minuten Reaktionszeit eine Abnahme der inkorporierten Radioaktivität um ca. 20 %, nach 60 Minuten um 55 %. Die Inkorporation in Serinreste wird in beiden Reaktionen durch einen Sättigungsverlauf beschrieben, die Initialgeschwindigkeiten sind identisch. In der Kontrollreaktion erreicht sie ihr Maximum nach 10 Minuten und bleibt über den weiteren Reaktionsverlauf konstant. In Anwesenheit des ATP-regenerierenden Systems ist das Maximum der Serinphosphorylierung bereits nach 5 Minuten erreicht. Die Tatsache, daß in der folgenden Reaktionszeit keine weitere Zunahme der Phosphatinkorporation in Serinreste beobachtbar wird, ist in der Verdünnung des ATP-Pools durch nicht radioaktives ATP begründet. Während der Reaktion steht weniger  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  zur Verfügung, welches für die Inkorporation in Serinreste ver-

wendet werden kann. Weiterhin zeigt das Experiment, daß die Phosphatinkorporation in Serinreste stabil ist, d.h. eine Hydrolyse der Serinphosphoesterbindung scheint nicht möglich. Dieser Umstand zeigt sich auch in der herkömmlichen Chase-Reaktionen, in der keine relative Abnahme der Serinphosphorylierung erhalten wird (Kap 7.2.2.1).

### 7.2.2.1 Identifizierung der transienten Phosphorylierungsstellen in der IRKD

Die Inkubation der radioaktiv markierten Kinase mit nicht radioaktiv markiertem ATP führt zu einem apparenten Verlust der inkorporierten Radioaktivität in dem Enzym (Chase-Reaktion). Im Umkehr-Experiment werden im zur Sättigung phosphorylierten Enzyms weiterhin Phosphorylgruppen auf das Enzym übertragen, wenn nachträglich [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP dem Reaktionsansatz zugefügt wird (Hot-Chase-Reaktion). Dieser beobachtete Austausch verläuft in beiden Fällen mit nahezu der gleichen Geschwindigkeit, der Anteil beträgt in etwa 50 % der maximal erreichbaren Gesamtphosphorylierung. Aus diesen Beobachtungen ergibt sich die Frage, ob Unterschiede zwischen den einzelnen Phosphorylierungsstellen existieren oder alle Phosphorylierungsstellen gleichermaßen von der transienten Phosphorylierung betroffen sind. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden mit der IRKD Pulse-Chase und Pulse-Hot-Chase-Experimente durchgeführt und im Anschluß die jeweiligen Phosphorylierungsmuster der Kinase durch die Methode der Phosphopeptidkartierung analysiert. Im Fall der Chase-Reaktion sollte der Verlust der Radioaktivität einzelnen Phosphorylierungsstellen in einem Verlust bestimmter Peaks in dem korrespondierenden Chromatogramm resultieren, während in der Hot-Chase-Reaktion diese Peaks verstärkt auftreten müßten. Im Fall einer gleichartigen Beeinflussung aller Phosphorylierungsstellen sollten sich nur Unterschiede in den relativen Peakhöhen ergeben, nicht aber in der relativen Verteilung der Phosphate in die einzelnen Phosphorylierungsstellen. Im Versuch wurden jeweils 1  $\mu\text{M}$  Kinase in Gegenwart von radioaktiv markiertem oder nicht radioaktiv markiertem ATP für 10 Minuten zur Sättigung phosphoryliert (Pulse-Reaktion). Im Anschluß daran erfolgte im Fall der radioaktiv vorphosphorylierten Kinase eine 20minütige Chase-Reaktion mit 2,5 mM ATP, im Fall der nicht radioaktiv markierten Kinase eine 20minütige Hot-Chase-Reaktion. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet, die Proteine im SDS-PAGE aufgetrennt und der Phosphateinbau in das Enzym bestimmt. Im Anschluß daran erfolgte eine tryptische Elution der Proteine aus dem Gel. Von einem Teil der tryptischen Eluate wurde eine Analyse der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung durchgeführt, der andere Teil wurde für die Anionenaustausch-Chromatographie verwendet.

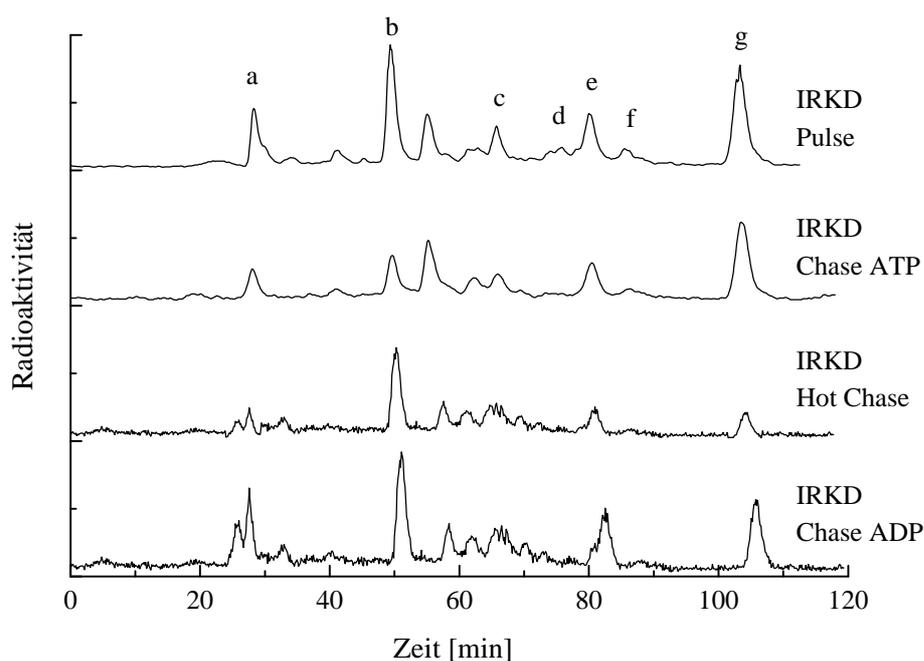
Die Kinase inkorporierte in der Pulse-Reaktion nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten 4,1 mol Phosphat pro Molekül, davon entfallen etwa 24 % auf Serinreste (0,9 mol/mol, Abb. 7.7 A). Nach der Chase-Reaktion enthält das Enzym nur noch 50 % der zuvor inkorporierten Radioaktivität (2,2 mol/mol). Der relative Anteil der Serinphosphorylierung nimmt dagegen auf 35 % zu, daraus errechnet sich ein absoluter Wert von 0,7 mol Phosphoserin pro mol Enzym (Abb. 7.7 B). In der Hot-Chase-Reaktion werden noch etwa 15 % Phosphoserin detektiert. Mit einer Phosphatinkorporation von 2,1 mol/mol wird damit ein spezifischer Phosphateinbau in Serinreste von 0,3 mol/mol erhalten (Abb. 7.7 C). Demnach ergibt sich, daß der Verlust an radioaktiven Phosphaten maßgeblich Tyrosinphosphorylierungsstellen betrifft.



**Abb. 7.7: Phosphoaminosäure-Analyse der IRKD nach Autophosphorylierung unter Pulse-Chase und Pulse-Hot-Chase-Bedingungen.** Die Ansätze enthielten 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin), 250  $\mu\text{M}$  ATP (radioaktiv oder nicht radioaktiv markiert) und 1  $\mu\text{M}$  IRKD. **A:** Pulse-Hot-Chase: Das mit nicht radioaktiv markiertem ATP vorphosphorylierte Enzym (5 Minuten) wurde nach Zugabe von  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  für weitere 15 Minuten inkubiert. **B:** Pulse-Reaktion mit radioaktiv markiertem ATP. **C:** Chase-Reaktion mit 2,5 mM nicht radioaktiv markiertem ATP.

Der Vergleich des Elutionsprofil der Kinase aus der Chase-Reaktion mit dem Chromatogramm aus der Pulse-Reaktion zeigt, daß das Enzym hauptsächlich Phosphate in dem Peptid verliert, welches die beiden C-terminalen Tyrosinphosphorylierungsstellen enthält (Fraktion b, Abb. 7.8). Dagegen sind alle übrigen Phosphorylierungsstellen präsent. Der Verlust des radioaktiven Signals des C-terminalen Peptids wird auch in dem korrespondierenden Elutionsprofil der Kinase beobachtet, wenn sie in Anwesenheit des ATP-regenerierenden Systems phosphoryliert wird (Daten nicht gezeigt). Im Profil der Hot-Chase-Reaktion ist dieses Peptid dagegen sehr stark vertreten, alle weiteren Phosphorylierungsstellen treten nur schwach hervor. Der Versuch zeigt, daß die beobachtete transiente Phosphorylierung der IRKD zum größten Teil auf eine permanente De- und Rephosphorylierung der C-terminalen Tyrosinphosphorylierungsstellen zurückzuführen ist.

Die Beobachtung, daß es in Gegenwart von 2,5 mM ADP auch zu einem Verlust an inkorporierter Radioaktivität kommt, deutet auf eine Rückreaktion von Phosphenzym zu Dephosphoenzym. Diese Dephosphorylierung sollte sich demnach auch in der Phosphopeptidkartierung bemerkbar machen. Die Reaktion erfolgte in Analogie zu den Experimenten aus Kapitel 7.2.1. Nach Auftrennung der Kinase durch SDS-PAGE wurde die erhaltene Gelbande tryptisch eluiert und das Phosphopeptidgemisch durch HPLC-Anionenaustausch-Chromatographie aufgetrennt. Im Gegensatz zu dem schon beschriebenen apparenten Verlust des Signals für das C-terminale Peptid in der ATP-Chase-Reaktion, wird im korrespondierenden Elutionsprofil nach Inkubation mit ADP nur eine geringfügige Abnahme dieses radioaktiven Signals beobachtet. Vielmehr scheinen sich unter diesen Reaktionsbedingungen die Signalstärke des tris-phosphorylierten Peptids der katalytischen Domäne zu reduzieren (Fraktion g), während gleichzeitig eine Erhöhung der bisphosphorylierten Peptide (Fraktion e) beobachtet wird. Demzufolge handelt es sich bei dem beobachteten Phosphatverlust durch Inkubation mit ADP um eine qualitativ andere Reaktion als bei dem beobachteten Austausch der Phosphate im C-Terminus der Kinase und basiert wahrscheinlich auf einer Rückreaktion von Phosphoenzym und ADP zu Dephosphoenzym.

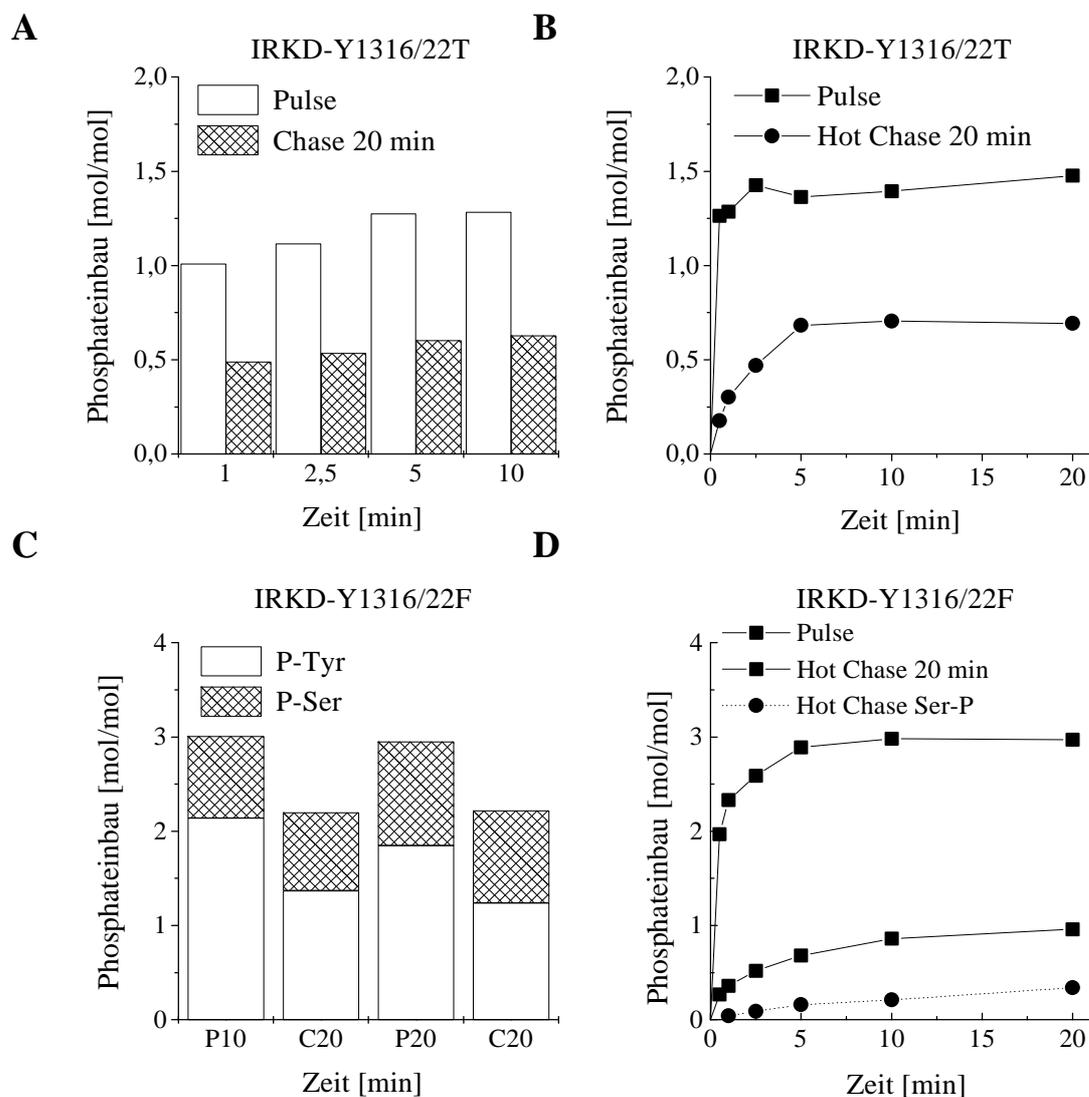


**Abb. 7.8: HPLC-Anionenaustauschchromatographie tryptischer IRKD-Peptide nach Autophosphorylierung unter Pulse-Chase-Bedingungen.** Nach Tabelle 5.2 ergibt sich die Zuordnung der Retentionszeiten zu den Phosphopeptiden.

### 7.2.3 Die transiente Phosphorylierung der IRKD-Y1316/22F und IRKD-Y1316/22T

Die Autophosphorylierungsreaktionen der IRKD unter Pulse-Chase bzw. Pulse-Hot-Chase-Bedingungen sind in Einklang mit einer intrinsische Phosphataseaktivität des Enzyms, die spezifisch auf die C-terminalen Tyrosinphosphorylierungsstellen einwirkt. Allerdings ergibt sich eine Diskrepanz zwischen dem „Verlust“ an Radioaktivität im Gesamtprotein verglichen mit der im C-Terminus inkorporierten Radioaktivität im Enzym. Demzufolge werden in den jeweiligen Reaktionen bis zu 50 % der inkorporierten Radioaktivität verloren, der Anteil der Phosphatinkorporation in die C-terminalen Tyrosinstellen beträgt aber nur 25-30 %. Zwar sollte die ermittelte Verteilung der Phosphate in der IRKD nur als eine apparente Größe betrachtet werden, da die einzelnen Peptide unterschiedliche Wiederfindungsraten besitzen, es ist jedoch nicht auszuschließen, daß auch andere Phosphorylierungsstellen in der Kinase einer, wenn auch geringeren transienten Phosphorylierung unterliegen. In der IRKD-Y1316/22F und IRKD-Y1316/22T sind die beiden C-terminalen Tyrosinphosphorylierungsstellen substituiert, eine Analyse ihrer Autophosphorylierungsreaktionen unter Pulse-Chase oder Pulse-Hot-Chase-Bedingungen sollte daher zur Beantwortung der Frage nach der Spezifität der transienten Phosphorylierung führen. Mit den beiden Kinasekonstrukten wurden, in Analogie zu den Experimenten aus Kap. 7.2.1 und 7.2.2, zeitabhängige Autophosphorylierungsreaktionen unter Pulse-Chase- und Pulse-Hot-Chase-Bedingungen durchgeführt. Die Ausgangsansätze enthielten 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin), 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP und 1  $\mu\text{M}$  der jeweiligen Kinase. Die Chase-Reaktionen wurden durch Zugabe der Enzyme gestartet und zu den angegebenen Zeitpunkten geteilt. Die Reaktionen des einen Teiles wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Den anderen Teilen wurde nicht radioaktiv markiertes ATP zu einer Endkonzentration von 2,5 mM zugefügt und für weitere 20 Minuten inkubiert. Für die Hot-Chase-Reaktionen wurden die beiden Enzyme für 20 Minuten mit nicht radioaktiv markiertem ATP zur Sättigung phosphoryliert, im Anschluß [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP zugefügt und die Reaktion zeitabhängig verfolgt. Als Kontrolle diente ein Reaktionsansatz, der radioaktiv markiertes ATP enthielt.

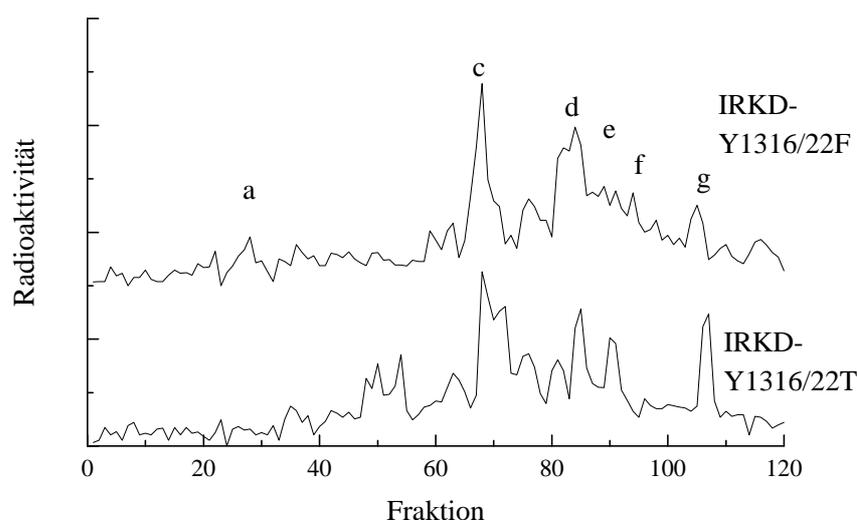
Die Reaktionen wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet, die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und der Phosphateinbau und die Phosphoamino­säure-Zusammensetzung bestimmt (Abb. 7.9). In der Chase-Reaktion der Kinase IRKD-Y1316/22T wird unabhängig vom Vorphosphorylierungsgrad des Enzyms ein etwa 50-60 %iger Verlust der Phosphatinkorporation beobachtet. Nach 20 Minuten ergibt sich im Vergleich zur Pulse-Reaktion ein apparenter Verlust an inkorporierter Radioaktivität von etwa 0,5-0,6 mol Phosphat pro mol Kinase. Nach 20minütiger Pulse-Reaktion und anschließender Hot-Chase-Reaktion inkorporiert das Enzym ebenfalls 0,5 mol Phosphat pro Molekül. In beiden Reaktionen wurde keine Serinphosphorylierung der Kinase detektiert.



**Abb. 7.9: Zeitverlauf der Autophosphorylierung der IRKD-Y1316/22T und IRKD-Y1316/22F unter Pulse-Chase und Pulse-Hotchase Bedingungen.** **A, B:** Zeitverlauf der Autophosphorylierung der IRKD-Y1316/22T unter Pulse-Chase-Bedingungen (A) und Pulse-Hot-Chase-Bedingungen (B). Die Ausgangsansätze enthielt 1  $\mu$ M Poly(Lysin), 250  $\mu$ M [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP und 1  $\mu$ M IRKD-Y1316/22T. Die Reaktionen wurden durch Zugabe des Enzyms gestartet und der Ansatz zu den angegebenen Zeitpunkten geteilt. Ein Teil wurde durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Dem anderen Teil wurde nicht radioaktiv markiertes ATP zu einer Endkonzentration von 2,5 mM zugefügt und nach 20 Minuten durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Der Reaktionsansatz der Pulse-Hot-Chase-Reaktion enthielt 250  $\mu$ M nicht radioaktiv markiertes ATP, 1  $\mu$ M Poly(Lysin) und 1  $\mu$ M Enzym. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Kinase gestartet und nach 20 Minuten der Reaktionsansatz durch radioaktiv markiertes ATP ergänzt. Als Kontrolle diente ein Ansatz, der radioaktiv markiertes ATP enthielt. **C, D:** Zeitverlauf der Autophosphorylierung der IRKD-Y1316/22F unter Pulse-Chase-Bedingungen (C) und Pulse-Hot-Chase-Bedingungen (D). Die Reaktionen wurden wie unter A und B beschrieben durchgeführt.

In der Chase-Reaktion der IRKD-Y1316/22F wird ähnliches beobachtet. Nach 10 bzw. 20minütiger Vorphosphorylierungsdauer und anschließender Inkubation mit nicht radioaktiv markiertem ATP kommt es zu einer Reduktion der inkorporierten Radioaktivität um etwa 30 %. Der Phosphateinbau beträgt 2 mol/mol Kinase. Unter Berücksichtigung der Serinphosphorylierung in diesem Enzym, welche von der Chase-Reaktion nicht beeinflußt zu werden scheint, verbleiben damit etwa 1 mol/mol radioaktiv markierter Tyrosinreste im Molekül, während ca. 0,7 mol der Tyrosinphosphate durch nicht radioaktiv markiertes ATP ersetzt werden. In der Hot-Chase-Reaktion nach 20minütiger Vorphosphorylierung werden 0,65 mol Tyrosinphosphorylierungsstellen markiert, gleichzeitig findet noch Phosphorylierung der Serinphosphorylierungsstellen statt. Dieser Anteil nach 30 Minuten Reaktionszeit beträgt ca. 10 %.

Im folgenden wurden die beiden Kinasen nach 20 Minuten der Hot-Chase-Reaktionen durch die Methode der Phosphopeptidkartierung analysiert (Abb. 7.10). Bei beiden Enzymen zeigt sich, daß die weitere Phosphatinkorporation in den Peptiden der katalytischen Domäne erfolgt, wobei monophosphorylierte Peptide einen Vorrang einnehmen (Fraktion c). Entsprechend könnte daher argumentiert werden, daß die beobachtete transiente Phosphorylierung in der Hot-Chase-Reaktion eher als eine Besetzung noch unphosphorylierter Tyrosinphosphorylierungsstellen angesehen werden kann. Allerdings spricht dagegen der beobachtete Phosphatverlust in der Chase-Reaktion der Kinasen und der Umstand, daß die Enzyme bereits nach einer Reaktionszeit von etwa 5 Minuten zu Sättigung phosphoryliert vorliegen. Daher muß von einer De- und Rephosphorylierung in dieser Domäne ausgegangen werden.

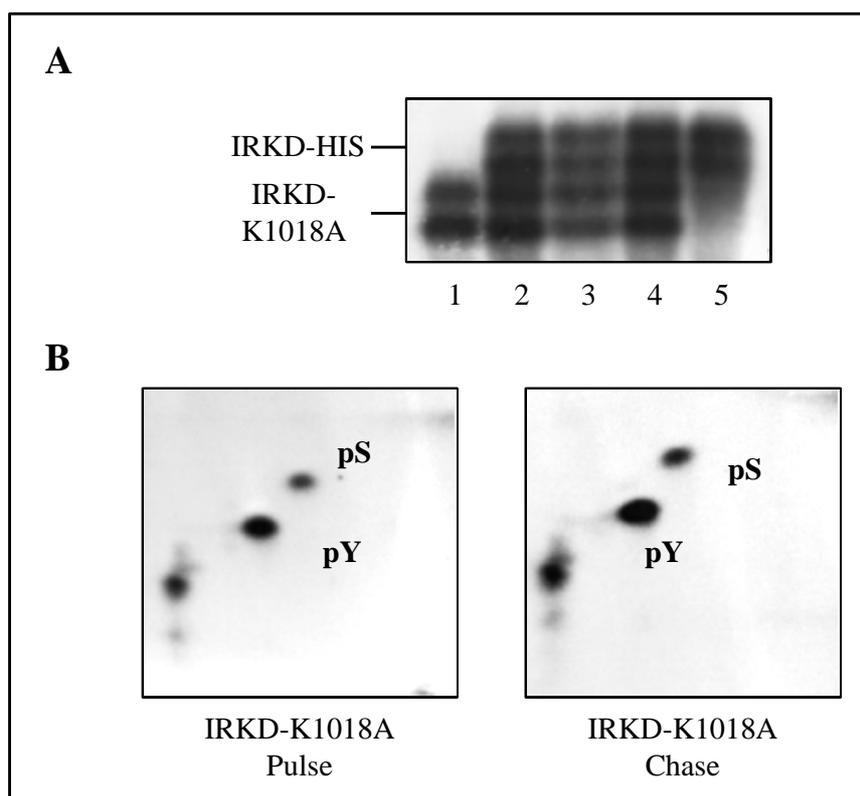


**Abb. 7.10: HPLC-Anionenaustauschchromatographie tryptischer Phosphopeptide der IRKD-Y1316/22T und IRKD-Y1316/22F.** Nach Tabelle 4.2 ergibt sich die Zuordnung der Retentionszeiten zu den Phosphopeptiden.

#### 7.2.4 Die transiente Phosphorylierung der IRKD-K1018A

Bei der Möglichkeit einer transienten Phosphorylierung, die vor allem die C-terminalen Tyrosine der Kinase betrifft, ergibt sich die Frage, ob diese einem intermolekularem Mechanismus, d.h. zwischen zwei Kinasemolekülen, oder einem intramolekularen Mechanismus unterliegt. Zur Analyse dieser Fragestellung wurden Pulse-Chase und Pulse-Hot-Chase-Reaktionen der IRKD-HIS und der IRKD-K1018A untersucht. Die Analyse des Phosphorylierungsmusters der IRKD-K1018A zeigte, daß dieses Molekül effizient an allen Tyrosinphosphorylierungsstellen durch die aktive Kinase phosphoryliert werden kann (Abb. 5.13). Für die Chase-Reaktion wurden die aktive Kinase und die kinaseinaktive Variante in Gegenwart von 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP für 10 Minuten phosphoryliert (Verhältnis

1:2,5) und nach Entnahme eines Aliquots anschließend der Ansatz getrennt. Ein Aliquot wurde für weitere 10 Minuten inkubiert, dem anderen wurde 2,5 mM nicht radioaktiv markiertes ATP zu gefügt und die Reaktion ebenfalls für 10 Minuten fortgesetzt. Für die Hot-Chase-Reaktion wurden die beiden Proteine in Gegenwart von nicht radioaktiv markiertem ATP für 20 Minuten vorphosphoryliert und anschließend  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  zugefügt und die Reaktion für weitere 20 Minuten fortgesetzt. Nach Abstoppen der Reaktionen durch Zugabe von SDS-Probenpuffer wurden die Proteine durch SDS-PAGE getrennt, der Phosphateinbau bestimmt und die jeweiligen Gelbanden durch tryptischen Verdau eluiert. Danach wurde von einem Teil der erhaltenen Peptide die Phosphoaminosäure-Zusammensetzung nach saurer Hydrolyse und zweidimensionaler Elektrophorese ermittelt, der andere Anteil wurde für eine Phosphopeptidkartierung verwendet.



**Abb. 7.11: Substratphosphorylierung der IRKD-K1018A durch die IRKD-HIS unter Pulse-Chase-Bedingungen.** Der Reaktionsansatz enthielt 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin), 250  $\mu\text{M}$   $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  1  $\mu\text{M}$  IRKD-HIS und 2,5  $\mu\text{M}$  IRKD-K1018A. Die Reaktion wurde durch Zugabe der aktiven Kinase gestartet und nach 10 Minuten geteilt. Zwei Teile des Ansatzes wurden nach 10 und 20 Minuten durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet, einem weiteren Teil wurde nicht radioaktiv markiertes ATP zu einer Endkonzentration von 2,5 mM zugefügt und die Reaktion für 10 Minuten fortgesetzt. Nach Abstoppen durch Zugabe von SDS-Probenpuffer wurden die Proteine durch SDS-PAGE getrennt und der Phosphateinbau und die Phosphoaminosäure-Zusammensetzung bestimmt. **A:** Autoradiographie nach SDS-PAGE. 1: 1  $\mu\text{M}$  IRKD nach Autophosphorylierung ohne Substrat. 2: Pulse-Reaktion 10 Minuten. 3: Chase-Reaktion 10 Minuten. 4: Pulse-Reaktion 20 Minuten. 5: 1  $\mu\text{M}$  IRKD-HIS nach Autophosphorylierung ohne Substrat. **B:** Phosphoaminosäure-Analyse der IRKD-K1018A nach Pulse- bzw. Chase-Reaktion. Autoradiographie nach zweidimensionaler Elektrophorese.

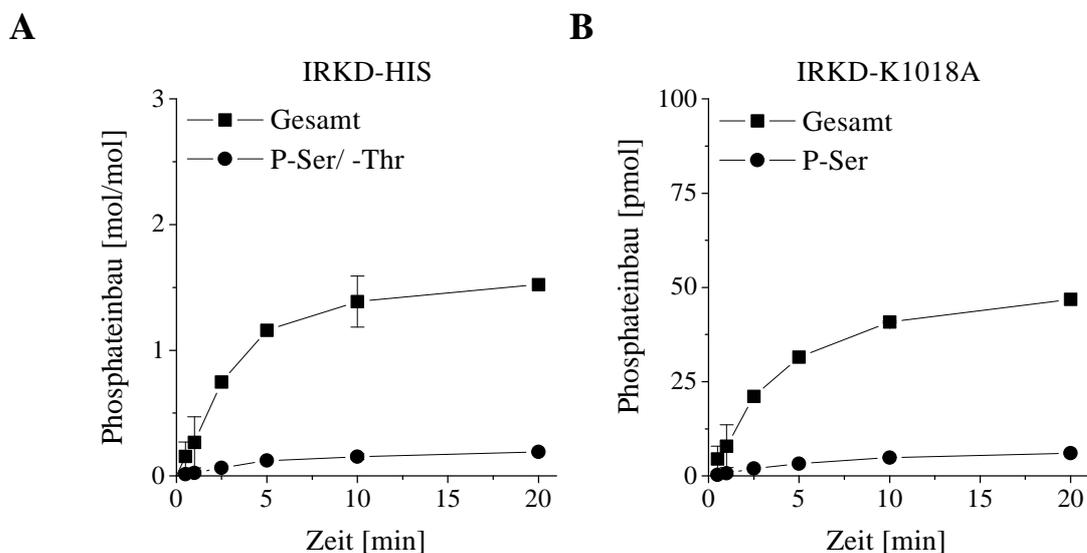
Nach 10minütiger Autophosphorylierung inkorporiert die aktive Kinase etwa 3 mol Phosphat pro mol Enzym, auf das Substrat werden 70 pmol übertragen, entsprechend einem molaren Einbau von 3 mol/mol. Nach der Chase-Reaktion beträgt der radioaktive Phosphatgehalt der aktiven Kinase nur noch 2 mol/mol, der der kinaseinaktive Variante 34 pmol  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-Phosphat}$ . Damit ist der apparente Verlust an inkorporierter Radioaktivität im Enzym etwa 30 %, im Substrat ca. 50 %.

Zeit [min]	Phosphat-einbau [cpm]	Einbau [pmol]	Einbau [mol/mol]	Ser-P [%]	Thr-P [%]	Ser-P [pmol]	Thr-P [pmol]
IRKD-HIS							
P10	29050	30,8	3,1	16,9	2,3	5,2	0,7
C10	19104	20,3	2,0	23,2	2,96	4,7	0,6
P20	31975	33,9	3,4	20,4	3,2	6,9	1,1
IRKD-K1018A							
P10	66154	70,2	-	14,99	-	10,5	-
C10	32138	34,1	-	25,0	-	8,5	-
P20	72650	77,0	-	21,4	-	16,5	-

spez. Radioaktivität: 943 cpm/pmol ATP

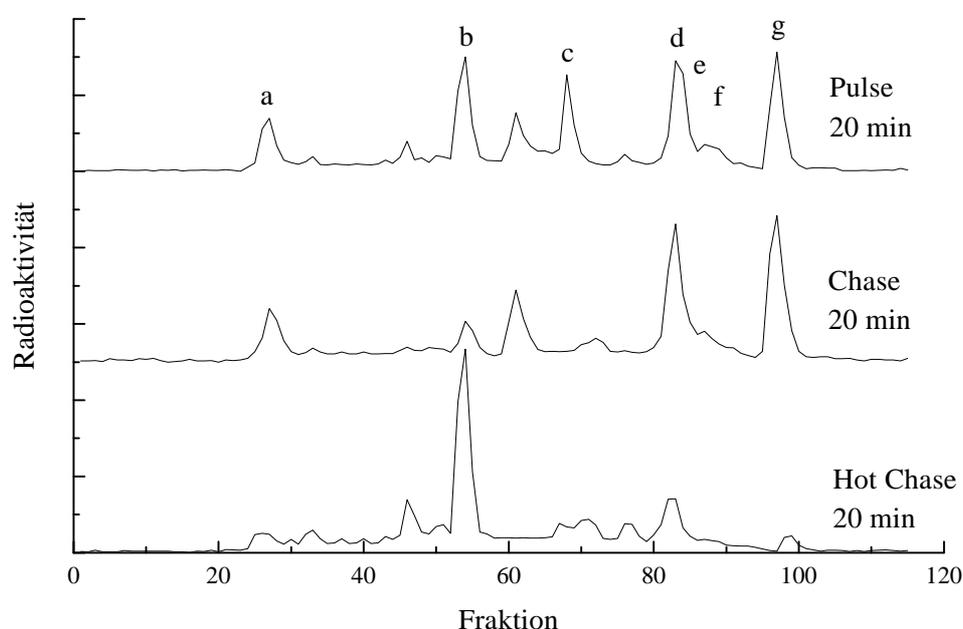
**Tab. 7.3. Zusammenfassung des Phosphateinbaus und der Phosphoaminosäure-Analyse der Proteine aus Abb. 7.11.**

Die Analyse des Phosphoserinanteils in den jeweiligen Proteinen zeigt, daß die molaren Verhältnisse Phosphotyrosin zu Phosphoserin bzw. Phosphothreonin in den korrespondierenden Pulse-Chase-Reaktionen in etwa konstant bleiben. In der Pulse-Reaktion der IRKD-HIS entfallen 0,5 mol/mol auf Phosphoserin bzw. 0,07 mol/mol auf Phosphothreonin, in der Chase-Reaktion werden 0,47 mol/mol und 0,06 mol/mol erhalten. Im Substrat ergeben sich 11 pmol Phosphoserin, in der Chase-Reaktion entfallen 8,5 pmol auf phosphorylierte Serinreste. Demnach scheint, wie schon in der transienten Phosphorylierung der IRKD beobachtet, der Austausch im Substrat ausschließlich Phosphotyrosine zu betreffen. Die Auswertung der Hot-Chase-Reaktion zeigt, daß trotz Vorphosphorylierung beider Moleküle noch Radioaktivität inkorporiert wird (Abb. 7.12).



**Abb. 7.12: Zeitverlauf der Substratphosphorylierung der IRKD-K1018A durch die IRKD-HIS unter Pulse-Hot-Chase-Bedingungen.** Der Reaktionsansatz enthielt 250  $\mu$ M nicht radioaktiv markiertes ATP, 1  $\mu$ M Poly(Lysin), 1  $\mu$ M IRKD-HIS und 2,5  $\mu$ M IRKD-K1018A. Die Reaktion wurde durch Zugabe der aktiven Kinase gestartet und nach 5 Minuten der Reaktionsansatz durch radioaktiv markiertes ATP ergänzt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE der Phosphateinbau und die Phosphoaminosäure-Zusammensetzung bestimmt. A: IRKD-HIS B: IRKD-K1018A

Der spezifische Phosphateinbau in die IRKD-HIS erreicht nach 20 Minuten Reaktionszeit etwa 1,5 mol/mol Enzym, im Substrat werden 45 pmol inkorporiert. Demnach ergeben sich ähnliche Verhältnisse wie in der Chase-Reaktion beider Moleküle, wonach ca. 30 % bzw. 50 % der inkorporierten Phosphate in der Kinase bzw. in der IRKD-K1018A ausgetauscht werden können. Die Initialgeschwindigkeit der Hot-Chase-Reaktion für die aktive Kinase errechnet sich aus dem linearen Anteil der Kurve zu  $7 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ . Im Vergleich zu der Initialgeschwindigkeit einer Hot-Chase-Reaktion der IRKD-HIS ohne Substrat, welche  $11 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  beträgt (Al-Hasani 1995), ist diese damit erniedrigt. Für die IRKD-K1018A kann eine Initialgeschwindigkeit angegeben werden, welche mit  $19 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  der Initialgeschwindigkeit der IRKD in der Hot-Chase-Reaktion entspricht (Kap. 7.2.2). Demnach scheint die Reaktion ein gerichteter Prozeß zu sein, die Initialgeschwindigkeit und der maximale Phosphateinbau sind im Vergleich zum Katalysator für das kinaseinaktive Protein deutlich erhöht. Durch die Methode der Phosphopeptidkartierung können die Phosphatreste, die einer permanenten De- und Rephosphorylierung unterliegen, lokalisiert werden. Für die IRKD wurde bereits gezeigt, daß hiervon hauptsächlich die C-terminalen Tyrosinphosphorylierungsstellen 1316 und 1322 betroffen sind. Von den Endwerten der Pulse-Chase- und Pulse-Hot-Chase-Reaktionen wurde daher in Analogie zu diesen Experimenten eine Phosphopeptidkartierung der kinaseinaktiven Mutante durchgeführt (Abb. 7.13). Die Auswertung der entsprechenden Chromatogramme zeigt, daß auch im Substrat diese Tyrosinphosphorylierungsstellen durch die Katalyse der aktiven Kinase der transienten Phosphorylierung unterliegen (Fraktion b). Demnach kann von einem gerichteten *trans*-Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsprozeß ausgegangen werden. Die korrespondierenden Chromatogramme der IRKD-HIS sind ähnlich, allerdings ergeben sich aufgrund des nur 30%igen Ausmaß der transienten Phosphorylierung in der Substratreaktion gegenüber den Reaktionen in Abwesenheit der IRKD-K1018A andere relative Verteilungen der Phosphopeptide, d.h. die De- und Rephosphorylierung der C-terminalen Tyrosinphosphorylierungsstellen ist nicht so stark ausgeprägt (Daten nicht gezeigt).

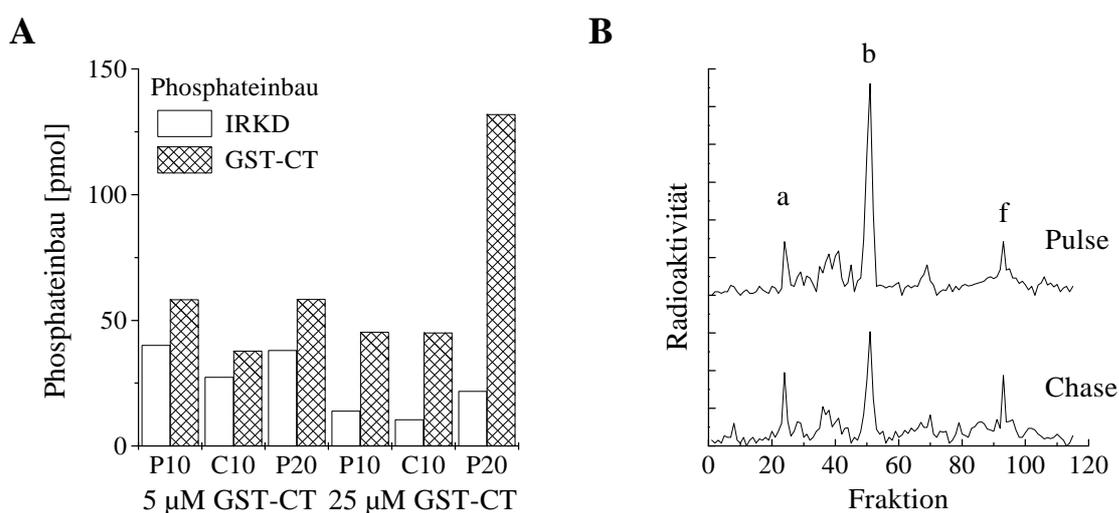


**Abb. 7.13: HPLC-Anionenaustauschchromatographie tryptischer IRKD-K1018A-Peptide nach Auto-phosphorylierung unter Pulse-Chase-Bedingungen.** Nach Tabelle 5.2 ergibt sich die Zuordnung der Retentionszeiten zu den Phosphopeptiden.

### 7.3 Substratphosphorylierungen unter Pulse-Chase-Bedingungen

#### 7.3.1 Phosphorylierung der GST-Fusionsproteine GST-CT, GST-Ex20 und GST-JM unter Pulse-Chase-Bedingungen

Die Möglichkeit einer transienten Phosphorylierung in der IRKD-K1018A führte zu der Frage, inwieweit die Kinase auch in der Lage ist, den Austausch von phosphorylierten Aminosäureresten in anderen Substraten zu katalysieren. Im folgenden Versuch wurden Phosphorylierungen unter Pulse-Chase-Bedingungen in Anwesenheit der GST-Fusionsproteine des C-Terminus (GST-CT und GST-CTphe), der katalytischen Domäne (GST-Ex20) und des Juxtamembranbereiches (GST-JM) durchgeführt. Die Reaktionsansätze enthielten 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin), 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP und Substratkonzentrationen, die in etwa den jeweiligen einfachen und 5fachen  $K_m$ -Werten entsprachen. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Kinase gestartet. Nach zwanzig Minuten wurden jeweils ein Drittel der Ansätze mit SDS-Probenpuffer beendet, einem weiteren Drittel 2,5 mM nicht radioaktiv markiertes ATP zugefügt und mit dem dritten Anteil für weitere 20 Minuten inkubiert. Nach SDS-PAGE und Autoradiographie der getrockneten Gele wurden die Proteinbanden ausgeschnitten und die Radioaktivität durch Messung der Cerenkov-Strahlung bestimmt. Im Anschluß daran erfolgte die tryptische Elution der Gelstücke und die Analyse der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung der Proteine (Abb. 7.14, Abb. 7.15).



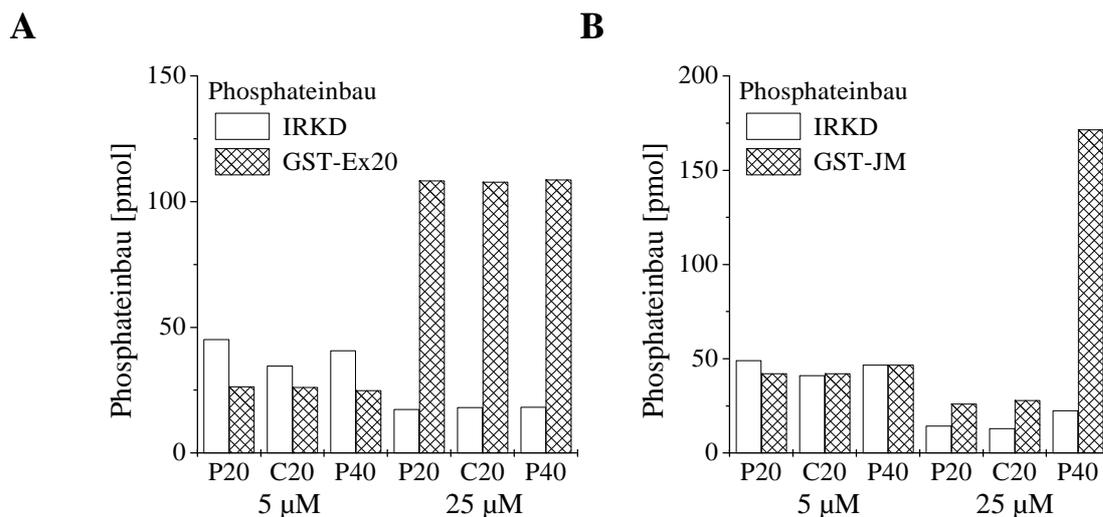
**Abb. 7.14: Substratphosphorylierung des GST-CT-Fusionsproteins durch die IRKD unter Pulse-Chase-Bedingungen.** **A:** Konzentrationsabhängigkeit der Substratphosphorylierung unter Pulse-Chase-Bedingungen. Der Reaktionsansatz enthielt 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin), 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP 1  $\mu\text{M}$  IRKD und die angegebenen Konzentrationen des GST-Fusionsproteins. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Kinase gestartet und nach 20 Minuten geteilt. Zwei Teile des Ansatzes wurden nach 20 und 40 Minuten durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet, einem weiteren Teil wurde nicht radioaktiv markiertes ATP zu einer Endkonzentration von 2,5 mM zugefügt und die Reaktion für 20 Minuten fortgesetzt. Nach Abstoppen durch Zugabe von SDS-Probenpuffer wurden die Proteine durch SDS-PAGE getrennt und der Phosphateinbau und die Phosphoaminosäure-Zusammensetzung bestimmt. **B:** HPLC-Anionenaustausch-Chromatographie tryptischer GST-CT-Peptide nach 20minütiger Pulse- und Chase-Reaktion. Ein Teil der tryptischen Phosphopeptide aus Versuch A (5  $\mu\text{M}$  GST-CT) wurde durch HPLC-Anionenaustausch-Chromatographie getrennt. Nach Tabelle 5.2 ergibt sich die Zuordnung der Retentionszeiten zu den Phosphopeptiden.

In der Pulse-Reaktion in Gegenwart des GST-CT-Fusionsproteins wird bei der Substrat-Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  eine Inhibition der Autophosphorylierung von etwa 50 % beobachtet (vgl. Kap. 5.3). Die Anwesenheit des Substrates beeinträchtigt auch das Ausmaß der transienten Phosphorylierung, die Kinase verliert etwa 30 % ihrer inkorporierten Radioaktivität (1,3 mol/mol). Im Gegensatz dazu ist sowohl die Autophosphorylierung als auch die Chase-Reaktion in Anwesenheit von 25  $\mu\text{M}$  Substrat gehemmt. Der Phosphateinbau beträgt nach 20 Minuten etwa 1,4 mol/mol, der Anteil der transienten Phosphorylierung in der Chase-Reaktion sinkt auf 23 % (0,4 mol/mol). Allerdings scheint die Phosphorylierungsreaktion der Kinase nach diesem Zeitraum nicht abgeschlossen. Sowohl im Enzym als auch im Substrat wird der weitere Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat beobachtet. Der molare Einbau in das Enzym beträgt nach 40 Minuten Reaktionszeit 2,2 mol/mol, im Substrat werden 131 pmol Phosphat erhalten. In der Chase-Reaktion wird im Substrat ein apparenter Verlust der inkorporierten Radioaktivität beobachtet. Der Anteil beträgt in der Reaktion mit 5  $\mu\text{M}$  Substrat 34 %, mit 25  $\mu\text{M}$  1 % gegenüber der Phosphatinkorporation in der Pulse-Reaktion (Abb. 7.14 A).

Die Analyse der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung ergibt, daß sowohl in der Kinase als auch im Substrat der Anteil der Serinphosphorylierung in der Chase-Reaktion gegenüber der Pulsreaktion bei einer Substratkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  und 25  $\mu\text{M}$  konstant bleibt (s. Tabelle Anhang). Demnach scheint der Phosphatverlust im Substrat auf eine transiente Phosphorylierung von Tyrosinresten zurückzugehen. Durch Pulse-Chase Experimente mit dem Fusionsprotein GST-Ctphe konnte diese Beobachtung bestätigt werden. Der Anteil phosphorylierter Serinreste war sowohl in der Pulse als auch in der Chase-Reaktion vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Zur Identifizierung der transienten Phosphate im Substrat wurden das Substrat durch Phosphopeptidkartierung nach der Pulse-Reaktion und der Chase-Reaktion hinsichtlich seiner Verteilung der einzelnen Phosphate in die Phosphorylierungsstellen untersucht (Abb. 7.14 B). Das Chromatogramm zeigt, daß nach der Chase-Reaktion ein relativer Verlust der inkorporierten Radioaktivität in dem Peptid beobachtet wird, welches die beiden C-terminalen Tyrosinphosphorylierungsstellen enthält. Allerdings erfolgt der Austausch im Vergleich zu der De- und Rephosphorylierung einer intakten Kinase nicht vollständig. Die Beobachtung, daß keine mono-phosphorylierte Form dieses Peptids im Chromatogramm erhalten wird, deutet darauf hin, daß einer Dephosphorylierung direkt eine Rephosphorylierung folgt.

In Anwesenheit von 5  $\mu\text{M}$  GST-Ex20 Fusionsprotein inkorporiert die Kinase nach einer Reaktionszeit von 20 Minuten 4,5 mol Phosphat pro mol Enzym (Abb. 7.15 A). Sowohl der spezifische Einbau als auch der Phosphoserinanteil bleiben über den Zeitraum von 40 Minuten relativ konstant. In der Chase-Reaktion verliert das Enzym etwa 25 % seiner inkorporierten Radioaktivität. Der Phosphotransfer auf das GST-Fusionsprotein beträgt im Mittel 25 pmol, während der Chase-Reaktion ist keine Abnahme der inkorporierten Radioaktivität ersichtlich. Bei einer Substratkonzentration von 25  $\mu\text{M}$  GST-Ex20 werden in die Kinase nach 20 Minuten 1,7 mol Phosphat pro mol Enzym inkorporiert. Im Gegensatz zu der weiteren Zunahme der Phosphatinkorporation in Anwesenheit von 25  $\mu\text{M}$  GST-CT Fusionsprotein scheint aber die Reaktion abgeschlossen, sowohl der Phosphateinbau in das Enzym als auch der Phosphotransfer auf das Substrat (108 pmol) erreichen nach dieser Zeit konstante Werte. In der Chase-Reaktion kann weder im Enzym noch im Substrat eine Abnahme der inkorporierten Radioaktivität festgestellt werden.

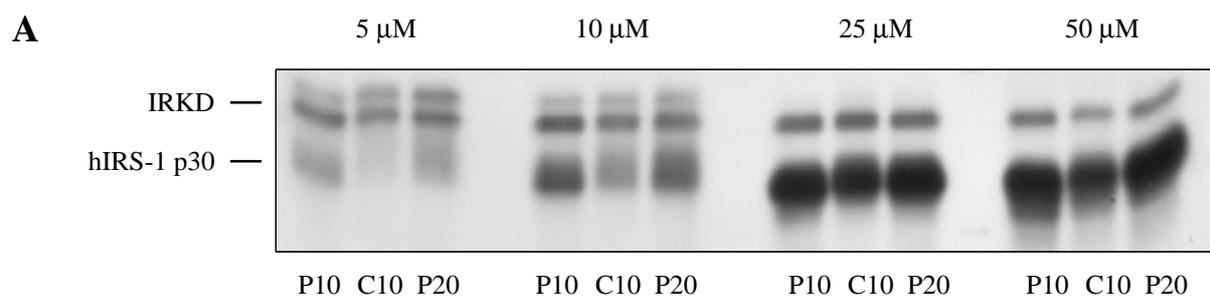
Der Einfluß des GST-JM Fusionsprotein in der Chase-Reaktion zeigt ähnliche Charakteristika wie das C-terminale Fusionsprotein (Abb. 7.15 B). In Anwesenheit von 5  $\mu\text{M}$  Substrat inkorporiert die Kinase in diesem Versuch über den Reaktionszeitraum im Mittel 4,7 mol/mol. In der Chase-Reaktion kommt es zu einem apparenten Verlust von ca. 17 % der inkorporierten Radioaktivität, der spezifische Einbau in Serinphosphat bleibt aber unverändert. Im Gegensatz dazu zeigt das Substrat in der Pulse- und der Chase-Reaktion keine meßbare Änderung seiner spezifischen Phosphatinkorporation. Sie beträgt im Mittel 43 pmol. Bei einer Substratkonzentration von 25  $\mu\text{M}$  GST-JM beträgt der spezifische Phosphateinbau in das Enzym 1,44 mol/mol. Allerdings scheint die Reaktion, wie schon beim GST-CT-Fusionsprotein beobachtet, noch nicht abgeschlossen, nach 40 Minuten erreicht der molare Einbau 2,2 mol/mol. Auf das Substrat werden nach 20 Minuten 26 pmol Phosphat, nach 40 Minuten 171 pmol übertragen. In der Chase-Reaktion kommt es weder im Enzym, noch im Substrat zu einem signifikanten Verlust der zuvor inkorporierten Radioaktivität.



**Abb. 7.15: Substratphosphorylierung der GST-Ex20 und GST-JM Fusionsproteine durch die IRKD unter Pulse-Chase-Bedingungen.** Der Ansatz enthielt 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin), 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP 1  $\mu\text{M}$  IRKD und die angegebenen Konzentrationen der GST-Fusionsproteine. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Kinase gestartet und nach 20 Minuten geteilt. Zwei Teile des Reaktionsansatzes wurden nach 20 und 40 Minuten durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet, einem weiteren Teil wurde nicht radioaktiv markiertes ATP zu einer Endkonzentration von 2,5 mM zugefügt und die Reaktion für 20 Minuten fortgesetzt. Nach Abstoppen durch Zugabe von SDS-Probenpuffer wurden die Proteine durch SDS-PAGE getrennt und der Phosphateinbau und die Phosphoaminosäure-Zusammensetzung bestimmt. **A:** Pulse-Chase-Reaktion mit GST-Ex20 **B:** Pulse-Chase-Reaktion mit GST-JM.

### 7.3.2 Phosphorylierung des hIRS-1 p30 unter Pulse-Chase-Bedingungen

Die Analyse der Pulse-Chase-Reaktionen der GST-Fusionsproteine zeigte, daß ihre Anwesenheit unterschiedlichen Einfluß auf die Kinase ausüben. Während bei niedrigen Konzentrationen noch ein Phosphataustausch im Enzym detektierbar ist, unterliegt er in Gegenwart hoher Konzentrationen einer Inhibition. Das Prinzip der transienten Phosphorylierung kann auch auf das C-terminalen Fusionsprotein und die IRKD-K1018A übertragen werden, während in den übrigen Substraten der Austausch radioaktiv markierter Tyrosinreste nicht nachweisbar ist. Im folgenden sollte die Fragestellung untersucht werden, ob eine De- und Rephosphorylierung auch in dem Substrat hIRS-1 p30 beobachtet werden kann. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden Pulse-Chase-Experimente in Anwesenheit variierender hIRS-1 p30 Konzentrationen durchgeführt. Die Reaktionen wurde durch Zugabe der Kinase gestartet und für 20 Minuten mit 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP inkubiert. Nach dieser Zeit wurde ein Drittel des Ansatzes durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet, ein Drittel mit 2,5 mM nicht radioaktiv markiertem ATP versetzt für weitere 20 Minuten inkubiert. Nach Auftrennen der Proteine im SDS-PAGE und Lokalisation der Proteinbanden durch Autoradiographie wurde der spezifische Phosphateinbau in die Kinase und das Substrat bestimmt. Anschließend erfolgte eine tryptische Elution der Gelbanden und die Analyse der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung von Kinase und Substrat (Abb. 7.16). Die Autophosphorylierung der Kinase wird mit steigender Substratkonzentration gehemmt (vergl. Kap 5.3). Während in Gegenwart von 5  $\mu\text{M}$  IRS-1 p30 3,9 mol/mol Phosphat in der Pulse-Reaktion inkorporiert werden, beträgt die spezifische Phosphatinkorporation der Kinase in Anwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  nur noch 1,5 mol/mol. Das Ausmaß der transienten Phosphorylierung im Enzym wird ebenfalls beeinflusst. Bei geringen Substratkonzentrationen ergibt sich in der nachfolgenden Chase-Reaktion ein apparenter Verlust der Phosphatinkorporation von 15 %, bei hohen Substratkonzentrationen ist keine signifikante Reduktion der inkorporierten Radioaktivität mehr feststellbar. Steigende Substratkonzentrationen führen zu einem gesteigerten Phosphotransfer in das IRS-1 p30 Fragment, der bei hohen Konzentrationen sein Maximum erreicht. Auch in dem Substrat wird ein apparenter Verlust der inkorporierten Radioaktivität meßbar, welcher bis zu 50 % beträgt.

**B**

Probe	Zeit [min]	Phosphat-einbau [cpm]	Einbau [pmol]	Einbau [mol/mol]	Ser-P [%]	Ser-P [pmol]
5 µM hIRS-1 p30						
	P20	25961	39,34	3,93	23,2	9,11
IRKD	C20	22696	34,39	3,44	26,7	9,18
	P40	28703	43,49	4,35	21,1	9,18
	P20	21210	32,14	-	30,6	9,83
IRS-1p30	C20	9436	14,30	-	64,8	9,26
	P40	19696	29,84	-	31,1	9,28
10 µM hIRS-1 p30						
	P20	18522	28,06	2,81	19,3	5,42
IRKD	C20	14939	22,63	2,26	22,1	4,9
	P40	17682	26,79	2,68	19,9	5,3
	P20	30802	46,67	-	31,2	14,5
IRS-1p30	C20	17320	26,24	-	53,4	14,0
	P40	28486	43,16	-	27,8	11,9
25 µM hIRS-1 p30						
	P20	14626	22,16	2,22	1,9	0,42
IRKD	C20	14832	22,47	2,25	2,6	0,58
	P40	14730	22,32	2,23	1,6	0,36
	P20	109209	165,47	-	14,3	23,7
IRS-1p30	C20	69615	105,48	-	22,1	23,3
	P40	107355	162,66	-	13,8	22,4
50 µM hIRS-1 p30						
	P20	9612	14,56	1,46	5,1	0,74
IRKD	C20	9708	14,71	1,47	5,5	0,81
	P40	10234	15,51	1,55	5,9	0,92
	P20	168486	255,28	-	9,1	23,2
IRS-1p30	C20	142718	216,24	-	11,5	24,9
	P40	202957	307,51	-	10,8	33,2

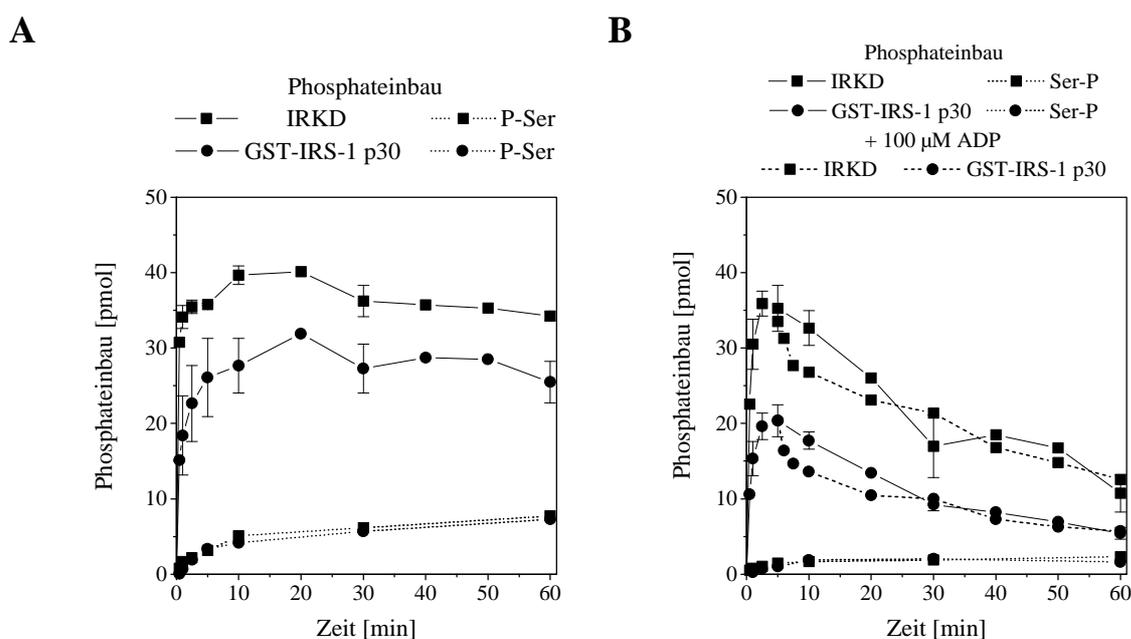
spezifische Radioaktivität: 660 cpm/pmol ATP

**Abb. 7.16: Substratphosphorylierung von hIRS-1 p30 durch die IRKD unter Pulse-Chase-Bedingungen.**

Die Ausgangsansätze enthielten 1 µM Poly(Lysin), 250 µM [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP 1 µM IRKD und die angegebenen Konzentrationen an hIRS-1 p30. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Kinase gestartet und nach 20 Minuten geteilt. Zwei Teile des Ausgangsansatzes wurden nach 20 und 40 Minuten durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet, einem weiteren Teil wurde nicht radioaktiv markiertes ATP zu einer Endkonzentration von 2,5 mM zugefügt und die Reaktion für 20 Minuten fortgesetzt. Nach Abstoppen durch Zugabe von SDS-Probenpuffer wurden die Proteine durch SDS-PAGE getrennt und der Phosphateinbau und die Phosphoaminosäure-Zusammensetzung bestimmt. **A:** Autoradiographie nach SDS-PAGE. **B:** Phosphateinbau und Phosphoaminosäure-Zusammensetzung der IRKD und des hIRS1 p30 aus Abb. 7.16 A.

Der prozentuale Serinphosphatanteil der Kinase und des Substrates nimmt mit steigenden Konzentrationen in den Pulse-Reaktionen ab, in den jeweiligen Chase-Reaktionen wird dabei keine Zunahme der Serinphosphorylierung meßbar. Demnach müssen maßgeblich Tyrosinreste einer De- und Rephosphorylierung unterliegen. Der Austausch radioaktiv markierter Phosphate in der Chase-Reaktion ist dabei unbedingt abhängig von der Kinaseaktivität. Das gleichzeitige Zufügen von EDTA und nicht radioaktiv markiertem ATP in der Chase-Reaktion führt weder im Substrat noch in der

Kinase zu einem apparenter Phosphatverlust (Nölle 1998). Auch eine mögliche Dephosphorylierung des Substrates nach der Chase-Reaktion kann ausgeschlossen werden, da eine Western-Blot-Analyse mit  $\alpha$ -Phosphotyrosin-Antikörper keine Abnahme des Phosphorylierungsstatus des hIRS-1 p30 zeigt (Daten nicht gezeigt). Im folgenden Experiment wurde eine zeitabhängige Substratphosphorylierung in Anwesenheit von 5  $\mu$ M GST-IRS-1 p30 in Gegenwart des ATP-regenerierenden Systems durchgeführt. GST-IRS-1 p30 ist ein rekombinantes Protein, welches die identische Aminosäure-Sequenz wie IRS-1 p30 besitzt, zusätzlich aber noch über einen GST-Fusionsproteinanteil verfügt, der eine einfache und effiziente Reinigung des Proteins durch Gluthathionsepharose-Affinitätschromatographie ermöglicht. Durch den GST-Anteil erhöht sich das apparente Molekulargewicht des Proteins auf 52,4 kDa, welches eine bessere Trennung von der Kinase in der SDS-PAGE ermöglicht. Das Protein wird in der Substratphosphorylierung durch die IRKD an Serin und Threoninresten phosphoryliert und unterliegt ebenfalls der transienten Phosphorylierung in der Pulse-Chase-Reaktion (S. Parvaresch, persönliche Mitteilung). Das Substrat wurde freundlicherweise von Frau S. Parvaresch zur Verfügung gestellt. Die Reaktionsansätze enthielten 1  $\mu$ M Poly(Lysin), 250  $\mu$ M [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP, 5  $\mu$ M GST-hIRS-1 p30 und die Komponenten des regenerierenden Systems (Kap. 7.2.2), in der Kontrollreaktion wurde kein Phosphoenolpyruvat zugefügt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Kinase gestartet und zu den jeweiligen Zeitpunkten Aliquots entnommen, die nach Abstoppen der Reaktion in SDS-Probenpuffer durch SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Nach Bestimmung des spezifischen Phosphateinbaus in die Kinase und das Substrat wurden die Gelbanden tryptisch eluiert und die Phosphoaminosäure-Zusammensetzung analysiert.



**Abb. 7.17: Zeitverlauf der Substratphosphorylierung des GST-hIRS-1 p30 durch die IRKD in Anwesenheit eines ATP-regenerierenden Systems.** Die Ansätze enthielten 1  $\mu$ M Poly(Lysin), 250  $\mu$ M [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP, 10  $\mu$ g/ $\mu$ l Pyruvatkinase (10 U/ $\mu$ g), 4 mM Phosphoenolpyruvat, 5  $\mu$ M GST-hIRS-1 p30 und 1  $\mu$ M IRKD. Der Kontrollreaktion wurde kein Phosphoenolpyruvat zugefügt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Kinase gestartet und zu den jeweiligen Zeitpunkten Aliquots entnommen, in denen die Reaktion durch Zugabe von SDS-Probenpuffer die Reaktion beendet wurde. Nach Auftrennen der Proteine durch SDS-PAGE wurde der Phosphateinbau und die Phosphoaminosäure-Zusammensetzung bestimmt. **A:** Substratphosphorylierung in Abwesenheit des regenerierenden Systems. **B:** Substratphosphorylierung in Anwesenheit des regenerierenden Systems.

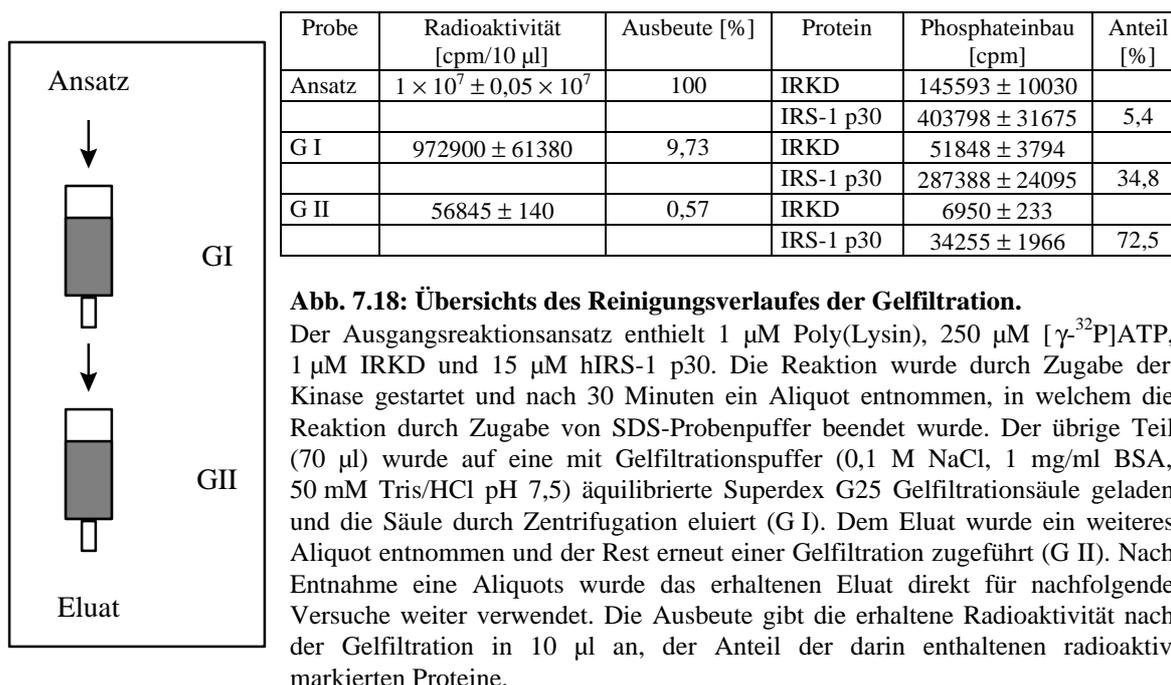
Der Phosphateinbau in die IRKD gleicht in Abwesenheit des regenerierenden Systems einer Sättigungskurve. Die Initialgeschwindigkeit der Reaktion beträgt  $68 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , der maximale Phosphateinbau im Mittel  $3,6 \text{ mol/mol}$ . Die Serinphosphorylierung erreicht nach etwa 10 Minuten ihr Maximum, die Initialgeschwindigkeit der Reaktion beträgt  $1,7 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ . Der Phosphotransfer auf das Substrat wird ebenfalls durch einen „Sättigungsverlauf“ beschrieben, der maximale Einbau beträgt im Mittel  $26 \text{ pmol Phosphat}$ , die Initialgeschwindigkeit der Reaktion  $33 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ . Die Phosphatinkorporation in Serinreste ergibt nahezu identische Werte wie für die Autophosphorylierungsreaktion. Nach 60 Minuten werden  $7,3 \text{ pmol Serinphosphat}$  gefunden, die Initialgeschwindigkeit der Reaktion ist allerdings mit  $0,13 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  deutlich langsamer. Im Vergleich zu einer Substratphosphorylierungsreaktion mit dem IRS-1-Fragment ohne GST-Fusionsproteinanteil wird deutlich, daß GST-IRS-1 p30 ein wesentlich schlechteres Substrat für die Kinase darstellt.

Dies drückt sich zum einen in der geringeren Beeinflussung der Autophosphorylierungsreaktion der Kinase aus, zum anderen in den spezifischen Konstanten der Substratphosphorylierung, die alle weit aus geringer ausfallen als in der vergleichbaren Reaktion mit IRS-1 p30 ohne GST-Fusionsproteinanteil (Kap. 5.4.4). In Anwesenheit des regenerierenden Systems ist in der initialen Phase der Reaktion nahezu kein Unterschied zur Kontrollreaktion festzustellen, die Initialgeschwindigkeiten der Autophosphorylierung, der Phosphatinkorporation in das Substrat und der Serinphosphorylierung ergeben vergleichbare kinetischen Konstanten. Nach 5 Minuten Reaktionszeit wird die permanente Abnahme der inkorporierten Radioaktivität im Substrat und der Kinase beobachtet. Nach 60 Minuten verlieren sowohl Kinase als auch Substrat etwa 70 % der inkorporierten Radioaktivität. Im Vergleich dazu bleibt der Serinanteil in Substrat und Enzym unverändert. Der mittlere Phosphateinbau in Serin- bzw. Serin-/Threoninreste beträgt jeweils etwa  $2 \text{ pmol}$ . Die Tatsache, daß es während der Reaktion nicht zu einem Anstieg der Phosphatinkorporation in Serinreste kommt, belegt wiederum, daß die zunehmende Verdünnung des radioaktiven ATP-Pools und der daraus resultierende Verlust der inkorporierten Radioaktivität allein auf die transiente Phosphorylierung von Tyrosinphosphorylierungsstellen zurückzuführen ist. In einem Kontrollexperiment wurde nach 5 Minuten Reaktionszeit in Anwesenheit des regenerierenden Systems zusätzlich  $100 \text{ }\mu\text{M ADP}$  dem Ansatz zugefügt. Die schnellere Abnahme der inkorporierten Radioaktivität sowohl in Kinase als auch Substrat belegen die Wirksamkeit des ATP-regenerierenden Systems, durch die Zugabe wird eine schnellere Verdünnung des radioaktiven ATP-Pools erreicht, welche zu einer schnelleren Abnahme der spezifischen Phosphatinkorporation in den Molekülen führt. Das Ausmaß der transienten Phosphorylierung bleibt aber konstant.

### 7.3.3 Die transiente Phosphorylierung in Gegenwart des vorphosphorylierten *hIRS-1 p30*

Sowohl die Autophosphorylierung der IRKD als auch die durch sie vermittelte Katalyse der Substratphosphorylierung unter Pulse-Chase-Bedingungen zeigt das Vorhandensein einer transienten Phosphorylierung, welche ein Ausdruck einer intrinsischen Phosphatase-Aktivität zu sein scheint. Dabei kommt es im Enzym selber zu einem Austausch von radioaktiven Phosphaten an den C-terminalen Tyrosinphosphorylierungsstellen und zu einem geringen Teil auch an Tyrosinresten der katalytischen Domäne. Desweiteren ist die Fähigkeit einer De- und Rephosphorylierung phosphorylierter Tyrosinreste auch während der Substratphosphorylierung zu beobachten. Dabei ergibt sich die Frage, ob die Phosphorylierungsreaktion der IRKD über ein Phospho-Enzymintermediat verläuft und damit einem Ping-Pong-Mechanismus unterliegt. Demnach sollte dem Enzym ein vorphosphoryliertes Substrat als Phosphatdonor dienen können.

Im folgenden Experiment wurde das rekombinante Fragment des humanen IRS-1 ( $15 \text{ }\mu\text{M}$ ) durch die IRKD ( $1 \text{ }\mu\text{M}$ ) in Gegenwart von  $250 \text{ }\mu\text{M } [\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  und  $1 \text{ }\mu\text{M Poly(Lysin)}$  für 30 Minuten vorphosphoryliert und im Anschluß der Reaktionsansatz durch Zentrifugation über Superdex-G25-Säulen vom  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  befreit. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt darin, daß das auf die Säulen aufgegebene Volumen des Reaktionsansatzes nach der Gelfiltration weitestgehend erhalten bleibt. Allerdings kommt es durch unspezifische Wechselwirkung der Proteine mit der Gelfiltrationsmatrix immer zu einem Verlust an Protein.

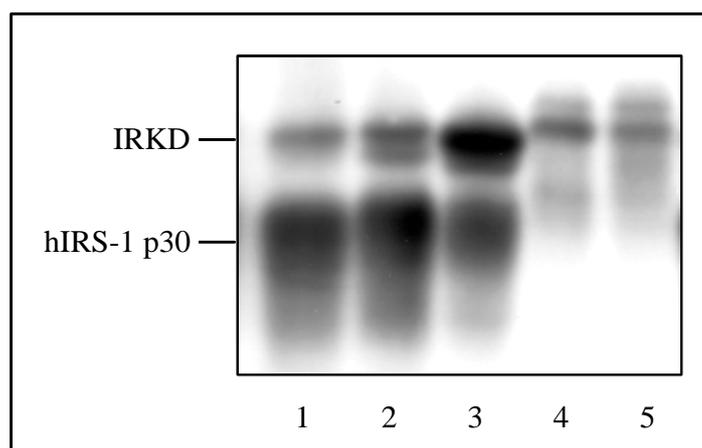


**Abb. 7.18: Übersichts des Reinigungsverlaufes der Gelfiltration.**

Der Ausgangsreaktionsansatz enthielt 1 µM Poly(Lysin), 250 µM [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP, 1 µM IRKD und 15 µM hIRS-1 p30. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Kinase gestartet und nach 30 Minuten ein Aliquot entnommen, in welchem die Reaktion durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet wurde. Der übrige Teil (70 µl) wurde auf eine mit Gelfiltrationspuffer (0,1 M NaCl, 1 mg/ml BSA, 50 mM Tris/HCl pH 7,5) äquilibrierte Superdex G25 Gelfiltrationsssäule geladen und die Säule durch Zentrifugation eluiert (G I). Dem Eluat wurde ein weiteres Aliquot entnommen und der Rest erneut einer Gelfiltration zugeführt (G II). Nach Entnahme eines Aliquots wurde das erhaltene Eluat direkt für nachfolgende Versuche weiter verwendet. Die Ausbeute gibt die erhaltene Radioaktivität nach der Gelfiltration in 10 µl an, der Anteil der darin enthaltenen radioaktiv markierten Proteine.

Um den Reinigungsverlauf zu dokumentieren, wurden jeweils gleich große Aliquots des Reaktionsansatzes und der einzelnen Reinigungsschritte in einer SDS-PAGE aufgetrennt und der spezifische Phosphateinbau in die Proteine gemessen. Desweiteren wurde die vorhandene Radioaktivität durch Messung der Cerenkov-Strahlung und der prozentuale Anteil des [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP nach der Gelfiltration durch den Vergleich mit dem Ausgangsansatz dünnstichtchromatographisch bestimmt. Die Übersicht für einen typischen Reinigungsverlauf ist in Abbildung 7.18 zusammengefaßt. Die Auswertung der Reinigung zeigt, daß das Verfahren zur Abtrennung des radioaktiv markierten ATP durch Gelfiltration zu hohen Verlusten an Protein führt. Gemessen an eingesetztem radioaktiv markiertem Protein (~ 550000 cpm) können demnach nur ca. 7 % (~ 42000 cpm) wiedergewonnen werden. Unter Berücksichtigung der Ausbeute an Gesamtradioaktivität und dem Anteil der wiedererhaltenen radioaktiv markierten Proteine ergibt sich, daß das erhaltene Eluat nur noch ca. 1 µM [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP enthält.

Das erhaltene IRKD-Substrat-Gemisch wurde in einem neuen Phosphorylierungsansatz mit 1 µM IRKD in Gegenwart von 1 µM Poly(Lysin) und variierenden Konzentrationen an nicht radioaktiv markiertem ATP zeitabhängig inkubiert und im Anschluß daran die Reaktionen durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Als Kontrolle diente ein Ansatz, der kein ATP enthielt. Nach Auftrennen der Proteine durch SDS-PAGE wurden die Gelbanden durch Autoradiographie lokalisiert und der Phosphatgehalt und die Phosphoaminosäure-Zusammensetzung bestimmt. Abb. 7.19 zeigt die erhaltene Autoradiographie nach einer Reaktionszeit von 10 Minuten, Abb. 7.20 den Zeitverlauf der Reaktionen. Deutlich ist zu erkennen, daß es mit Zunahme der ATP-Konzentration zu einem Verlust der inkorporierten Radioaktivität im hIRS-1 p30 kommt. In der Enzymbande wird in Anwesenheit geringer ATP-Konzentrationen (1 µM und 10 µM) eine Zunahme der Phosphatinkorporation beobachtet, welche direkt mit dem erhaltenen Verlust der Radioaktivität im Substrat zu korrelieren scheint. Demnach muß sich ein Teil der hinzugefügten Kinase phosphoryliert haben. Dieser Umstand ist insofern bemerkenswert, als daß nicht von einer Autophosphorylierung aufgrund des noch vorhandenen Rest-ATP im Reaktionsansatz ausgegangen werden kann. Ohne Zusatz nicht radioaktiv markierten ATP wird keine zusätzliche Phosphatinkorporation beobachtet. Bei den höheren ATP-Konzentrationen wird dieser Effekt nicht mehr detektiert, der apparente Verlust der Radioaktivität im Substrat ist aber unverändert und verläuft hier mit einer noch höheren Geschwindigkeit.

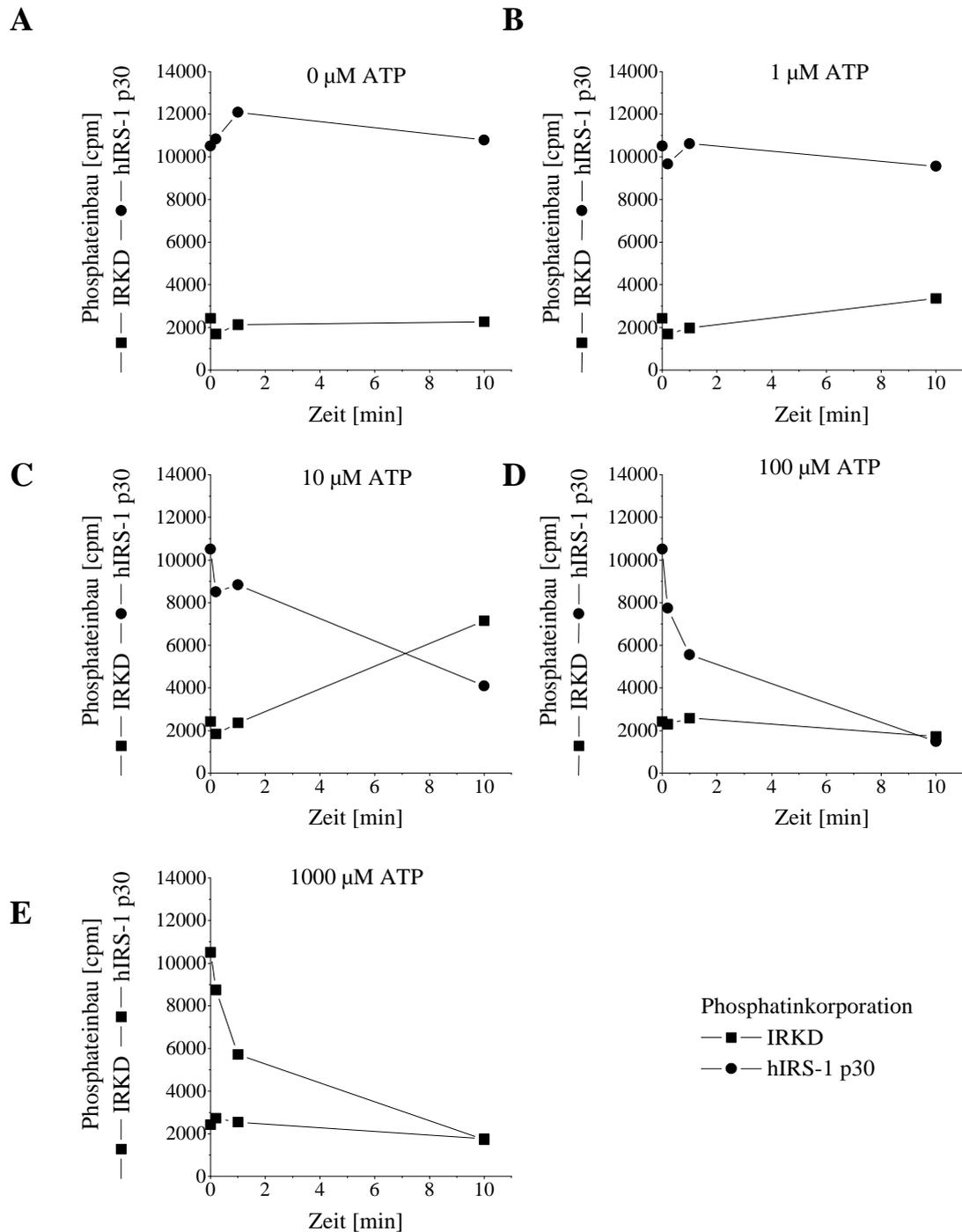


**Abb. 7.19: Zeitverlauf der transienten Phosphorylierung des vorphosphorylierten hIRS-1 p30.** Die Reaktionsansätze enthielten 2,5  $\mu\text{l}$  des vorphosphorylierten Enzym-Substrat Gemisches, 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin), 1  $\mu\text{M}$  IRKD und variierende ATP-Konzentrationen. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Kinase gestartet und zu definierten Zeitpunkten durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Im Anschluß daran erfolgte die Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE und die Bestimmung der inkorporierten Radioaktivität. Aufgetragen sind die erhaltenen Proben nach einer Reaktionszeit von 10 Minuten. 1: 0  $\mu\text{M}$  ATP, 2: 1  $\mu\text{M}$  ATP, 3: 10  $\mu\text{M}$  ATP, 4: 100  $\mu\text{M}$  ATP, 5: 1000  $\mu\text{M}$  ATP. Autoradiographie nach SDS-PAGE.

ATP [ $\mu\text{M}$ ]	IRKD					hIRS-1 p30				
	Gelbande [cpm]	P-Tyr [%]	P-Ser [%]	P-Tyr [cpm]	P-Ser [cpm]	Gelbande [cpm]	P-Tyr [%]	P-Ser/-Thr [%]	P-Tyr [cpm]	P-Ser/-Thr [cpm]
0	2268	90,7	9,3	2057	211	10788	96,2	3,8	10378	410
1	3360	89,3	10,7	3000	360	9558	95,4	4,6	9118	440
10	7158	85,9	14,1	6149	1009	4100	85,6	14,4	3510	590
100	1730	80,8	19,2	1398	332	1486	72,4	27,6	1076	410
1000	1772	84,3	15,7	1494	278	1720	72,8	27,2	1252	468

**Tab. 7.3: Analyse der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung der IRKD und dem vorphosphorylierten hIRS-1 p30.** Die Proteinbanden (Abb. 7.18) wurden aus dem Gel tryptisch eluiert, partiell hydrolysiert und die Phosphoaminosäuren dünnschichtchromatographisch aufgetrennt.

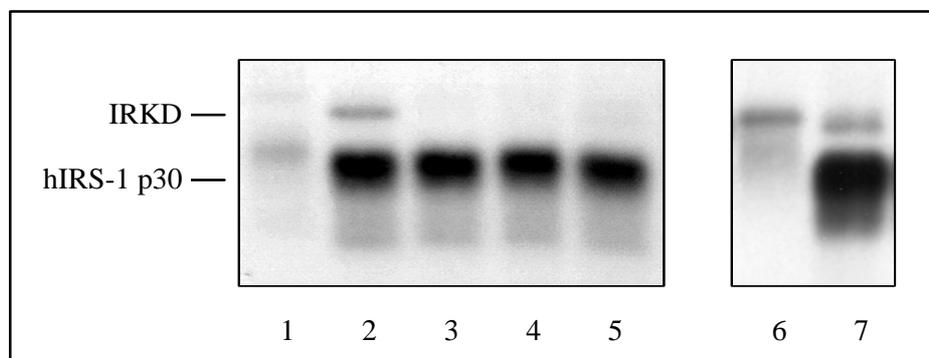
Die Analyse der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung der Proteine nach einer Reaktionszeit von 10 Minuten zeigt, daß es in allen Fällen zu einer leicht erhöhten Zunahme der Serinphosphorylierung in der Kinase kommt (Tab. 7.3). In Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  ATP ist die Zunahme des Serinphosphatgehaltes in der Kinasebande am höchsten, er beträgt im Vergleich zur Kontrollreaktion in Abwesenheit von ATP 1006 cpm gegenüber 211 cpm. Der Serin-/Threoninphosphatgehalt im Substrat bleibt dagegen in etwa konstant, bei allen Konzentrationen werden ca. 400 -500 cpm Phosphoserin erhalten. Demzufolge betrifft die Dephosphorylierung des Substrates ausschließlich Phosphotyrosine. Weiterhin zeigt daß Experiment, daß einige dieser radioaktiv markierten Phosphate als Phosphatdonor für die Serinphosphorylierung der IRKD dienen können. Allerdings ist die Effizienz dieser Phosphatübernahme, im Vergleich zum Gesamtposphatverlust der Tyrosinphosphorylierung im hIRS-1 p30, nur äußerst gering. Die beobachtete apparente Dephosphorylierung des Substrates scheint weiterhin unbedingt von der Anwesenheit von ATP und damit von der Kinaseaktivität abhängig zu sein. Diese Beobachtung wurde durch weitere Experimente bestätigt.



**Abb. 7.20: Zeitverlauf der transienten Phosphorylierung des vorphosphorylierten hIRS-1 p30.** Die Reaktionsansätze enthielten 2,5  $\mu\text{l}$  des vorphosphorylierten Enzym-Substrat Gemisches, 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin), 1  $\mu\text{M}$  IRKD und variierende ATP-Konzentrationen. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Kinase gestartet und zu den angegebenen Zeitpunkten mittels SDS-Probenpuffer beendet. Im Anschluß daran erfolgte die Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE und die Bestimmung der inkorporierten Radioaktivität. A: 0  $\mu\text{M}$  ATP, B: 1  $\mu\text{M}$  ATP, C: 10  $\mu\text{M}$  ATP, D: 100  $\mu\text{M}$  ATP, E: 1000  $\mu\text{M}$  ATP.

In Analogie zum obigen Experiment wurden das vorphosphorylierte Substrat mit 1  $\mu\text{M}$  IRKD, 1  $\mu\text{M}$  IRKD-K1018A oder 1  $\mu\text{M}$  IRKD-Y960/1316/22F in An- oder Abwesenheit von 250  $\mu\text{M}$  nicht radioaktiv markiertem ATP inkubiert. In einem weiteren Experiment wurde 1  $\mu\text{M}$  IRKD und 250  $\mu\text{M}$  ATP,

2,5 mM AMP-PNP und vorphosphoryliertes Substrat zugefügt. Die Reaktionen wurden nach 10minütiger Inkubation durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet und die Proteine durch SDS-PAGE getrennt. Nach Lokalisation der Gelbanden im getrockneten Gel durch Autoradiographie wurden die erhaltenen Gelbanden ausgeschnitten und die Radioaktivität durch Messung der Cerenkov-Strahlung bestimmt (Abb. 7.21, Tab. 7.4).



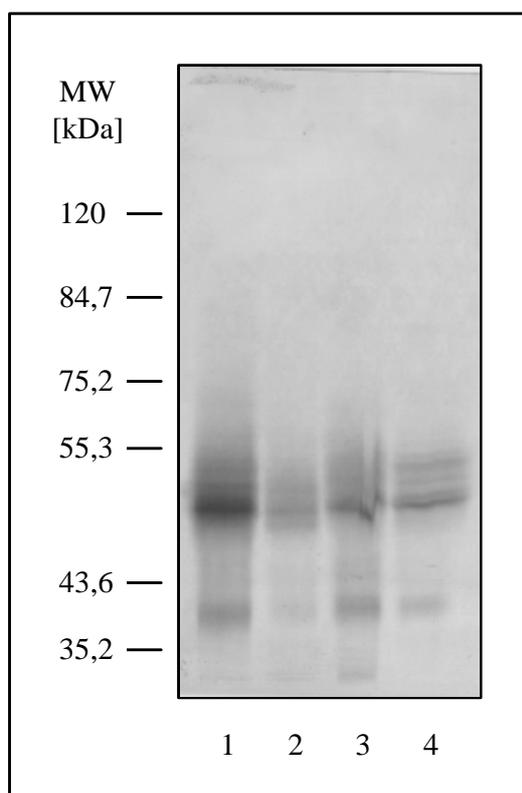
**Abb. 7.21: Abhängigkeit der transienten Phosphorylierung des hIRS-1 p30 von der Kinaseaktivität.** Das radioaktiv markierte Substrat (Ausgang: 2447 cpm in IRKD; 21908 cpm in hIRS-1 p30) wurde zusammen mit der IRKD, IRKD-K1018A und der IRKD-Y960/1316/22F in An- oder Abwesenheit von 250  $\mu$ M nicht radioaktiv markierten ATP inkubiert. In einem weiteren Experiment wurde 1  $\mu$ M IRKD und 250  $\mu$ M ATP, 2,5 mM AMP-PNP und vorphosphoryliertes Substrat eingesetzt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Kinase und ihrer Varianten gestartet und nach einer Reaktionszeit von 10 Minuten durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Nach Auftrennen der Proteine durch SDS-PAGE erfolgte die Bestimmung des Phosphateinbaus durch Messung der Cerenkov-Strahlung. 1: IRKD + 250  $\mu$ M ATP, 2: IRKD + 250  $\mu$ M ATP und 2,5 mM AMP-PNP, 3: IRKD - ATP, 4: IRKD-K1018A + 250  $\mu$ M ATP, 5: IRKD-K1018A - ATP, 6: IRKD-Y960/1316/22F + 250  $\mu$ M ATP, 7: IRKD-Y960/1316/22F - ATP. Autoradiographie nach SDS-PAGE.

Die Anwesenheit von ATP im die IRKD enthaltenden Ansatz führt zur apparenten Dephosphorylierung des Substrates. Diese Beobachtung wird auch für die IRKD-Y960/1316/22F erhalten. In Abwesenheit von ATP kann kein signifikanter Verlust an der inkorporierter Radioaktivität des Substrates beobachtet werden, allerdings wird im Vergleich zu den Ansätzen mit dem inaktiven Enzym eine Zunahme der Radioaktivität in der Kinasebande detektiert. Diese zusätzliche Inkorporation kann durch noch im Ansatz enthaltendes Rest- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  erklärt werden. Ein nicht zu beobachtender Phosphatverlust im Substrat in Anwesenheit des kinaseinaktiven Proteins zeigt, daß die Möglichkeit zur Dephosphorylierung des Substrates unbedingt abhängig von der Kinaseaktivität ist. Die Zugabe von 2,5 mM AMP-PNP zum Reaktionsansatz führt ebenfalls nicht zu einem apparenten Phosphatverlust im Substrat und bestätigt damit die obige Aussage.

Bahn	Enzym	ATP [ $\mu$ M]	Zusatz	Gelbande (IRKD) [cpm]	Gelbande (hIRS-1 p30) [cpm]
1	IRKD	250	-	3083	7545
2	IRKD	250	2,5 mM AMP-PNP	4737	23475
3	IRKD	0	-	2325	21038
4	IRKD-K1018A	250	-	1692	20778
5	IRKD-K1018A	0	-	2271	21694
6	IRKD-Y960/1316/22F	250	-	2758	3429
7	IRKD-Y960/1316/22F	0	-	9030	19840

**Tab. 7.4: Zusammenfassung des Phosphateinbaus der Proteine aus Abb. 7.21.**

Zur Klärung der Frage ob es sich bei dem beobachtetem apparenten Phosphatverlust um eine tatsächliche Dephosphorylierung handelt, wurden ein Teil der die IRKD enthaltenen Ansätze in einer weiteren SDS-PAGE getrennt, die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und der Phosphorylierungsstatus durch  $\alpha$ -Phosphotyrosin-Antikörper analysiert (Abb. 7.22). Deutlich ist zu erkennen, daß es nur in Anwesenheit von 250  $\mu$ M ATP zu einem verstärkten Signal mit dem Antikörper kommt. Damit zeigt sich, daß der apparenten Dephosphorylierung des Substrates eine Rephosphorylierung folgt.



**Abb. 7.22: Analyse des Phosphorylierungsstatus der Proteine aus Abb. 7.21 durch Western-Blot-Analyse mit  $\alpha$ -Phosphotyrosin-Antikörper.** Ein Teil der die IRKD enthaltenen Ansätze aus Abb. 7.21 wurden durch SDS-PAGE getrennt und die Proteine durch Western Blotting auf eine PVDF-Membran transferiert. Im Anschluß daran erfolgte der immunologische Nachweis des Phosphorylierungsstatus der Proteine durch  $\alpha$ -Phosphotyrosin-Antikörper. 1: IRKD + 250  $\mu$ M ATP, 2: IRKD - ATP, 3: IRKD + 250  $\mu$ M ATP und 2,5 mM AMP-PNP, 4: Ausgangsansatz. Western-Blot, immunologischer Nachweis mit  $\alpha$ -Phosphotyrosin-Antikörper.

## 8 Diskussion

### 8.1 Expression und Reinigung der IRKD

Die Expression der löslichen Insulinrezeptorkinase IRKD erreichte etwa 72 Stunden nach der Infektion von Sf9-Zellen mit den rekombinanten Baculoviren ihr Maximum (Kap. 3.4, Abb. 3.2). Nach dem Aufschluß der Zellen konnte das Enzym aus dem cytosolischen Zellüberstand durch Anionenaustausch- und hydrophobe Interaktionschromatographie gereinigt werden (Kap. 3.5, Abb. 3.3, Tab. 3.1). Im Cytosol infizierter Zellen machte die Kinase etwa 3-10 % am Gesamtproteinanteil aus (optische Abschätzung aus der SDS-PAGE, Abb. 4.1 A), im ersten Reinigungsschritt kam es zu einer Anreicherung von ca. 60 %. Nach Ammoniumsulfatfällung und hydrophober Interaktionschromatographie lag das Protein nach optischer Abschätzung unter Berücksichtigung der verwendeten Färbemethode (Blakesley und Boezi 1977) in einem Reinheitsgrad von über 95 % vor. Aus  $10^9$  Zellen können mit diesem Verfahren ca. 2,5-5 mg Protein gereinigt werden. Bemerkenswert ist, daß das Enzym im rohen Zell-Lysat und im Eluat nach Anionenaustausch-Chromatographie mit  $\alpha$ -Phosphotyrosin-Antikörper immunologisch nachweisbar war; ein Hinweis auf die konstitutive Aktivität der Kinase. Nach hydrophober Interaktionschromatographie zeigte sich keine weitere Kreuzreaktion mit dem Antikörper (Abb. 4.1 C). Wahrscheinlich erfolgte in der Aufarbeitung des Enzyms eine Dephosphorylierung durch exogene Phosphatasen. Ähnliche Reinigungsergebnisse wurden auch mit den anderen in dieser Arbeit vorgestellten Kinasekonstrukten erzielt. Nach erfolgreicher Mutagenese und Expression im Baculovirus-Expressionssystem (Kap. 3.6.1 und Kap. 3.6.2) konnten alle Enzyme durch Anionenaustausch- und hydrophobe Interaktionschromatographie mit denselben Reinigungsdaten der IRKD gereinigt werden. Eine Ausnahme bildete die Reinigung der IRKD-Y1316/22T (Kap. 3.4.2). Während die Anionenaustausch-Chromatographie mit vergleichbarer Ausbeute und Reinheitsgrad durchgeführt werden konnte, erwies sich die Reinigung durch hydrophobe Interaktionschromatographie als ineffizient. Das Protein eluierte bereits bei hoher Ionenstärke von der Säule, was die Ausbeute des Enzyms verminderte. In einer der Anionenaustausch-Chromatographie nachgeschalteten Gelfiltration, die zur Entsalzung und Aufkonzentration des Enzyms führen sollte, eluierte das Protein über einen Molekulargewichtsbereich von ca. 60 - 100 kDa (Kap. 3.4.2, Abb. 3.4). Im Vergleich dazu eluierten die nicht phosphorylierte IRKD und die IRKD-Y1316/22F bei einem apparenten Molekulargewicht von 60 kDa (Kap. 4.1, Abb. 4.2 A, C). In der Gelfiltration wird die Annahme gemacht, daß Proteine eine ideale globuläre Form einnehmen und sich entsprechend ihrem Stokes'schen Radius zwischen Gelmatrix und Lösungsmittel verteilen. Eine Änderung oder Abweichung der idealen globulären Struktur kann daher zu Unterschieden führen. Die Beobachtung eines anderen Laufverhaltens der IRKD-Y1316/22T in der Gelfiltration scheint demnach für eine Konformationsänderung des Moleküles zu sprechen und spiegelt sich auch in den enzymatischen Eigenschaften dieser Kinase in der Autophosphorylierungsreaktion wieder (Kap. 8.2). Die Möglichkeit, die Insulinrezeptorkinase und abgewandelte Konstrukte im Baculovirus-Expressionssystem zu reinigen, hat in den letzten Jahren zu einer Vielzahl von Publikationen geführt, die bemüht waren, mit diesem rekombinanten Enzym strukturelle und katalytische Eigenschaften zu analysieren (Ellis et al. 1988, Herrera et al. 1989, Cobb et al. 1989, Villalba et al. 1989, Kallen et al. 1990, Al-Hasani 1995, Wei et al. 1995). Dabei unterscheiden sich die jeweiligen Proteine in ihrer Konstruktion und ihrem Reinigungsweg aber auch in ihren ermittelten spezifischen Aktivitäten. Diese sind bedingt durch unterschiedliche Reaktionsbedingungen (Temperatur, Substrat-, Metallionen-, und ATP-Konzentration, Aktivierung durch Polykationen und DTT), die die einzelnen Arbeitsgruppen bei ihrer Charakterisierung anwandten (Kap. 8.2). In Tabelle 8.1 sind die beschriebenen Konstrukte und deren Reinigung zusammengefaßt. Allen gemeinsam ist, daß sie über eine intakte, nicht durch Mutationen veränderte aktive Kinasedomäne verfügen.

Abschließend betrachtet führt die Aufarbeitung der löslichen Insulinrezeptorkinase zu einer hochreinen Enzymfraktion, in welcher die Abwesenheit exogener enzymatischer Aktivitäten (ATPasen, Phosphatasen oder andere Serin/Threonin- und Tyrosinkinase, Kap. 5.2 und Kap. 7.2.1) nachgewiesen werden konnte. Dieses ist eine essentielle Voraussetzung für die Charakterisierung ihrer enzymatischen und biophysikalischen Eigenschaften.

Sequenz <sup>a</sup> , Anzahl Aminosäuren	Proteinausbeute <sup>b</sup> [mg]	Reinigungs- faktor	Referenz
947-1343, 397	0,5	20	Ellis et al. 1987 Cobb et al. 1989
948-1343, 396	0,4	40	Herrera et al. 1988
941-1343, 403	1,2	35	Villalba et al. 1989
946-1303, 358	0,4	15	Kallen et al. 1990
947-1343, 432 <sup>c</sup>	0,75	15	Al-Hasani 1995
973-1271, 297	0,25	k. A.	Wei et al. 1995
941-1343, 403	0,25 - 0,5	13,5	diese Arbeit

**Tab. 8.1: Vergleich löslicher Insulinrezeptorkinasen aus Insektenzellen.** <sup>a</sup> Aminosäuresequenz nach Ullrich et al. 1985. <sup>b</sup> aus 10<sup>8</sup> Zellen. <sup>c</sup> enthält 35 Aminosäuren eines Histidinfusionproteinanteils. k. A.: keine Angaben.

## 8.2 Die enzymatischen Eigenschaften der löslichen Insulinrezeptorkinase

### 8.2.1 Allgemeine Charakterisierung der löslichen Insulinrezeptorkinase

Die gereinigte IRKD und die in dieser Arbeit vorgestellten Konstrukte zeigen in der SDS-PAGE und in der Gelfiltration apparente Molekulargewichte von 48 kDa bzw. 60 kDa (Kap. 4.1, Abb. 4.1, Abb. 4.2). Der größere Fehler bei der Bestimmung der Molmassen durch Gelfiltration ist durch den exponentiellen Zusammenhang zwischen Molekulargewicht und dem Verteilungskoeffizienten  $K_{av}$  erklärbar (Al-Hasani 1995). Demnach liegen die löslichen Kinasen nach der Reinigung als monomere Moleküle vor; das rechnerische Molekulargewicht von 45,7 kDa stimmt daher in etwa mit den durch die verschiedenen Methoden erhaltenen apparenten Molekularmassen überein. Vergleichbare Ergebnisse zeigen Cobb et al. (1989), die die monomere Form einer löslichen Rezeptorkinase durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation belegen. Eine Ausnahme stellt die IRKD-Y1316/22T dar. Während ihr apparentes Molekulargewicht in der SDS-PAGE mit den beobachteten Molmassen aller anderen Konstrukte übereinstimmt, ergeben sich Unterschiede in der Gelfiltrationsanalyse. Das Molekül eluiert in einem nicht aufgelösten Doppelpeak in einem Bereich von 60-100 kDa (Kap. 3.4.2, Abb. 3.3). Offensichtlich führen die eingeführten Mutationen zu einer Änderung der hydrodynamischen Eigenschaften des Enzyms.

Abweichende Ergebnisse werden bei der Analyse der phosphorylierten IRKD gefunden. In der SDS-PAGE erhöht sich das apparente Molekulargewicht um 5 kDa, wobei bis zu drei Phosphoprotein-Banden unterschieden werden können (Kap. 4.1, Abb. 4.1). Eine Veränderung der apparenten Molmasse einer löslichen Kinase wird auch von Herrera et al. (1988) beobachtet. Die Erhöhung ist wahrscheinlich auf eine verminderte SDS-Bindung des Phosphoproteins zurückzuführen. Dabei ist zu bemerken, daß die Substitution der beiden C-terminalen Tyrosinreste gegen Phenylalanin oder Threonin in den korrespondierenden Kinasevarianten IRKD-Y1316/22F und IRKD-Y1316/22T keine Veränderung des Laufverhaltens der autophosphorylierten Enzyme in der SDS-PAGE bewirkt (Kap. 5.2, Abb. 5.2). Interessanterweise ergibt sich auch ein anderes apparentes Molekulargewicht der IRKD, wenn das phosphorylierte Enzym für die Gelfiltration verwendet wird. Das Phosphoenzym eluiert zwischen den Eichproteinen Aldolase (158 kDa) und BSA (67 kDa). Gegenüber den 60 kDa des nicht phosphorylierten Enzyms ergibt sich ein apparentes Molekulargewicht von 100 kDa (Kap. 4.1, Abb. 4.2 A). Dieselbe Beobachtung wird erhalten, wenn die kinaseinaktive Variante IRKD-K1018A und die IRKD zusammen in einem Phosphorylierungsansatz inkubiert und anschließend durch Gelfiltration aufgetrennt werden (Kap. 4.1, Abb. 4.2 B). Für dieses Verhalten könnte eine Dimerisierung monomerer phosphorylierter Proteine oder eine Konformationsänderung in Folge der Phosphorylierung ursächlich sein. Untersuchungen mit konformationssensitiven Antikörpern ergaben, daß es nach der Autophosphorylierung des Insulinrezeptors zu Konformationsänderungen in der katalytischen Domäne und im C-Terminus kommt (Herrera und Rosen 1986, Baron et al. 1992). Letztere Aussage wird durch den Befund bekräftigt, daß die IRKD-Y1316/22F sowohl in ihrer nicht phosphorylierten als auch in ihrer phosphorylierten Form bei einem Molekulargewicht von 60 kDa von der Säule eluiert (Kap. 4.1, Abb. 4.2 C). Demnach muß die Phosphorylierung der beiden

C-terminalen Tyrosin-Phosphorylierungsstellen als die Ursache für das veränderte Laufverhalten in der Gelfiltration angesehen werden. Das Enzym könnte durch die Besetzung dieser beiden Phosphorylierungsstellen von einer kompakten in eine weniger kompakte Form mit einem größeren Stocke'schen Radius übergehen. Die Nichtexistenz der aromatischen Seitenketten in der IRKD-Y1316/22T scheint damit das veränderte Laufverhalten dieser Kinase in der Gelfiltration zu erklären. Die Möglichkeit einer Konformationsänderung als Folge der Autophosphorylierung der monomeren löslichen Kinase werden auch durch die Untersuchungen von Al-Hasani (1995) belegt. In dieser Arbeit wird demonstriert, daß weder die Anwesenheit von hoher Ionenstärke (1 M NaCl) noch von EDTA (100 mM) zum Auftreten der niedermolekularen Form führt, wenn das vorphosphorylierte Enzym in der Gelfiltration eingesetzt wird.

Im Gegensatz zum Insulinrezeptor zeigen seine löslichen Kinasen eine konstitutive Kinaseaktivität. Auf eine immunologisch nachweisbare Tyrosinphosphorylierung des Enzyms nach Aufschluß der Sf9-Zellen wurde bereits hingewiesen (Kap. 8.1). In dieser Arbeit wurden der Einfluß der zweiwertigen Metallionen  $Mg^{2+}$  und  $Mn^{2+}$ , der ATP-Konzentration, der Temperatur, des pH-Wertes, die Anwesenheit von Poly(Kationen) und die Konzentrationsabhängigkeit auf die Autophosphorylierung der Kinase untersucht. Im allgemeinen zeigen Tyrosinkinasen eine Präferenz für das zweiwertige Metallkation Mangan gegenüber Magnesium (Swarup et al. 1984). Diese Beobachtung scheint sowohl auf die in der Literatur beschriebenen löslichen Kinasen als auch den Insulinrezeptor zuzutreffen, bei denen die Mangan-Abhängigkeit in der Autophosphorylierung eine Optimumskurve bei einer Konzentration von 5 mM zeigt (Herrera et al. 1989, Al-Hasani 1995). Allerdings kann die maximale Phosphotransferaseaktivität des Insulinrezeptors als auch des löslichen Enzyms durch die gleichzeitige Anwesenheit von  $MgCl_2$  gesteigert werden. Für den Insulinrezeptor wurden optimale Bedingungen bei 0,5 M  $MnCl_2$  und 10 mM  $MgCl_2$  gefunden, während die IRKD-HIS ihre maximale Transferaseaktivität bei 5 mM  $MnCl_2$  und 5 mM  $MgCl_2$  erreicht (Schmidt 1991, Al-Hasani 1995). Die Ergebnisse mit der IRKD-HIS stehen in Einklang mit den gefundenen Verhältnissen für die IRKD, die ebenfalls ihr Optimum bei 5 mM  $Mn^{2+}$  und 5 mM  $Mg^{2+}$  erreicht (Kap. 4.2.1, Abb. 4.3). Die kinetischen Konstanten für ATP wurden mit einem apparenten  $K_m$ -Wert von  $135 \pm 28 \mu M$  und mit einem  $V_{max}$ -Wert von  $230 \pm 23 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  bestimmt (Kap. 4.2.2, Abb. 4.4). Die erhaltenen Werte stimmen in der Größenordnung mit früher berichteten Werten für die lösliche Rezeptorkinase überein (Cobb et al. 1989, Quirk et al. 1995, Wei et al. 1995). Im Gegensatz dazu wurde von Conn (1997) für die IRKD-Y960/1316/22F ein apparenter  $K_m$ -Wert für ATP von  $300 \mu M$  und ein apparenter  $V_{max}$ -Wert von  $106 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  berichtet. Die Beobachtung, daß eine Phosphorylierung der C-terminalen Tyrosinreste zu einer weniger kompakten Molekülstruktur führt (Kap. 4.1, Abb. 4.2), könnte die Erhöhung des  $K_m$ -Wertes für diese Kinase erklären. Interessanterweise berichten Quirk et al. (1995) von einem apparenten  $K_m$ -Wert für ATP von  $< 20 \mu M$  bei einer löslichen Insulinrezeptorkinase, bei welcher C-terminal 72 Aminosäuren deletiert sind. Daher scheint eine direkte Interaktion der C-terminalen Domäne mit dem aktiven Zentrum der katalytischen Domäne zu bestehen, welche in Folge der Phosphorylierung aufgehoben werden kann.

Das Temperaturoptimum der Autophosphorylierungsreaktion wurde mit  $20 \text{ }^\circ C$  bestimmt (Kap. 4.2.5, Abb. 4.7 A) und ist somit niedriger als der erwartete physiologische Wert von  $37 \text{ }^\circ C$ . Verschiedene Autoren beobachten bei der Analyse der löslichen Kinase oder des Holorezeptors ebenfalls Werte unterhalb von  $37 \text{ }^\circ C$  (Yan et al. 1993, Zick et al. 1983, Fujita-Yamaguchi und Kathuria 1985). Dabei scheint dem C-Terminus eine wichtige Funktion in der Stabilität des Moleküls zuzukommen, da eine C-terminale Deletion von 72 Aminosäuren eine noch höhere Instabilität bewirkt (Yan et al. 1993). Eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen der Thermostabilität des gereinigten Moleküls und der physiologischen Temperatur von  $37 \text{ }^\circ C$  ist zur Zeit noch nicht gegeben. Möglicherweise bewirken die in der Zelle vorhandenen Substrate oder andere Faktoren eine höhere Stabilität des Moleküls.

Die Autophosphorylierungsreaktion des Insulinrezeptors und seiner löslichen Kinase kann durch die Anwesenheit von Polykationen wie Protamin und Poly(Lysin) gesteigert werden (Rosen und Lebowitz 1988, Kohanski 1989, Li et al. 1992, Al-Hasani 1995). Ferner wird die Insulinrezeptorkinaseaktivität in Anwesenheit von Histon 2b moduliert (Baron et al. 1995). Auch die in dieser Arbeit vorgestellte lösliche Kinase IRKD läßt sich durch Polykationen oder das stark positiv geladene Histon 2b stimulieren. Im Vergleich zu der nicht stimulierten Reaktion bewirkt der äquimolare Zusatz von

Poly(Lysin) eine 6-11fache Beschleunigung der initialen Phosphorylierungsgeschwindigkeit des Enzyms (Kap. 4.2.3, Abb. 4.5 A und Kap. 5.3, Abb. 5.5 A, B). Allerdings hat der äquimolare Einsatz des Polykations nur einen geringen Einfluß auf den maximal erreichbaren Phosphorylierungsgrad der Kinase. Während ohne Poly(Lysin)-Stimulierung ein Phosphateinbau von etwa 1,5 - 2 mol/mol Enzym detektiert werden kann, beträgt er bei Stimulierung 4 - 4,5 mol/mol. Vergleichbare Stimulationsraten ergeben sich bei der Analyse der IRKD-Y1316/22F und IRKD-Y1316/22T, allerdings zeigen sich Unterschiede im Einfluß auf die maximal erzielten Phosphorylierungsraten der Enzyme (Kap. 5.3, Abb. 5.5 C, D, F). In Folge der Poly(Lysin)-Stimulierung wird eine andere Verteilung der Phosphate in die einzelnen Autophosphorylierungsstellen beobachtet (Kap. 5.4.3). Während in der stimulierten Reaktion die Phosphorylierung aller drei Tyrosinreste der katalytischen Domäne beobachtet wird (Kap. 5.4.2, Abb. 5.7), findet sich in der nicht stimulierten IRKD maßgeblich die Besetzung mono-phosphorylierter Formen. Im Gegensatz dazu bleibt der prozentuale Anteil der C-terminalen Tyrosinphosphorylierungsstellen in beiden Fällen gleich. Dasselbe Phänomen wird in der Untersuchung der Poly(Lysin)-Abhängigkeit der IRKD-Y1316/22F beobachtet (Kap. 5.4.2, Abb. 5.6 und Kap. 5.4.3, Abb. 5.7). Auch mit dem stark positiv geladenen Histon 2b kann eine Steigerung der Initialgeschwindigkeit der Autophosphorylierungsreaktion der IRKD hervorgerufen werden, wenn es in einem Konzentrationsbereich von 5 - 10  $\mu\text{M}$  eingesetzt wird (Kap. 4.2.3, Abb. 4.5 B). Die geringere Effektivität dieser Stimulation im Vergleich zu Poly(Lysin) ist in der parallel stattfindenden Substratphosphorylierung des Proteins begründet (Affüpper 1997).

Der Wirkungsmechanismus der Aktivierung durch Poly(Kationen) oder stark positiv geladene Proteinen ist nicht geklärt. So wird bei einer löslichen Kinase eine 10-30fachen Aktivierung durch Poly(Lysin) oder Protamin beschrieben, die mit einer Unabhängigkeit des Enzyms für Manganionen einhergeht (Rosen und Lebwohl 1988, Herrera et al. 1989). Rosen und Lebwohl (1988) postulieren daher eine zweite Kationenbindungsstelle, an welcher entweder Manganionen oder Poly(Lysin) binden können. Baron et al. (1995) spekulieren, daß eine sehr azide Domäne in der Aminosäuresequenz der  $\beta$ -Untereinheit des Insulinrezeptors an einer Bindung eines Poly(Kationen) beteiligt ist (Aminosäure 1270-1280). Ihren Ergebnissen zufolge könnte die Interaktion zu einer veränderten Konformation des C-Terminus führen, welches wiederum einen Einfluß auf die katalytische Aktivität der Kinase haben könnte. Diese These wird durch die Analyse einer Deletionsmutante der löslichen Kinase gestützt, die den C-Terminus und damit diese azide Region nicht mehr enthält. Sie zeigt in Bezug auf die Initialgeschwindigkeit keine Stimulierbarkeit durch Poly(Kationen) (Wieber 1998). Demnach könnte Poly(Lysin) als allosterischer Aktivator dienen, der Konformationsänderungen des Enzyms bewirkt, welche zu einer veränderten Präferenz einzelner Phosphorylierungsstellen führen könnten. Allerdings bleibt festzuhalten, daß alle Phosphorylierungsstellen unabhängig von der Anwesenheit des Poly(Lysin) für eine Phosphorylierung zugänglich sind (Kap. 5.4.3, Abb. 5.7). Das Poly(Kation) würde dementsprechend nur zu einer Einstellung eines anderen Gleichgewichtes in der Phosphorylierung der Phosphorylierungsstellen führen. Andere Autoren führen die gesteigerte Aktivität auf eine durch die Poly(Kationen) induzierte Molekülaggregation zurück, die eine intermolekulare Phosphorylierung (*trans*-Phosphorylierung) zwischen Monomeren (bei den löslichen Kinasen) bzw. dem Holorezeptor ermöglichen könnte (Kohanski 1989, Li et al. 1992, Yan et al. 1993). Die Untersuchung der Kristallstruktur der Insulinrezeptorkinasedomäne von Hubbard (1994, 1997) weisen auf einen intermolekularen Mechanismus des Tyrosinrestes Tyr<sup>1150</sup> der Autophosphorylierung hin. Auch aus den Untersuchungen der Substratphosphorylierungsreaktionen der löslichen Kinase mit den aus den Autophosphorylierungsstellen des Insulinrezeptors abgeleiteten GST-Fusionsproteinen (Kap. 6.2, Tab. 6.1) und der kinaseinaktiven IRKD-K1018A (Kap. 6.2, Abb. 6.4) geht hervor, daß diese Substrate für das Enzym darstellen. Für den Insulinrezeptor konnte eine *trans*-Phosphorylierung bei Rezeptorhybriden aus kinaseaktiven und kinaseinaktiven Monomeren bereits mehrfach gezeigt werden (Treadway et al. 1991, Shoelson et al. 1992, Frattali et al. 1992, Leavy-Toleando 1994). In diesem Zusammenhang belegen die experimentellen Daten von Bähr (unveröffentlicht), daß eine künstliche Dimerisierung der löslichen IGF-I-Rezeptorkinase durch einen GST-Fusionproteinanteil einen ähnlichen Effekt wie eine Poly(Lysin)-Stimulation bewirkt.

Die Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit der Autophosphorylierung liefern keinen eindeutigen Hinweis auf eine intra- oder intermolekulare Reaktion (Kap. 4.2.4). Der Phosphateinbau der IRKD verläuft in Abwesenheit von Poly(Kationen) in einem Konzentrationsbereich von 0,25 - 4  $\mu\text{M}$  linear (Kap. 4.2.4, Abb. 4.6 A). Vergleichbaren Ergebnisse wurden auch bei anderen löslichen Kinasen erzielt (Villalba et al. 1989, Kohanski 1993, Al-Hasani 1995). Diese Beobachtungen deuten daher auf eine intramolekulare Phosphorylierung der einzelnen Enzymmoleküle hin. Die Linearität der Initialgeschwindigkeit könnte an der viel zu geringen experimentellen Variationsbreite der Enzymkonzentration liegen. Höhere Konzentrationen sind aber wegen der Aufrechterhaltung der ATP-Konzentration während der Reaktion kaum einsetzbar. Allerdings zeigen die Ergebnisse der Substratphosphorylierung der IRKD-HIS und der IRKD-K1018A, daß auch in Abwesenheit von Poly(Lysin) eine Dimerisierung und damit eine intermolekulare Phosphorylierung zwischen den monomeren Enzymmolekülen möglich ist (Kap. 4.2.4, Abb. 4.6 B). Desweiteren findet sich in der IRKD-K1018A nach Substratphosphorylierung in Abwesenheit von Poly(Lysin), wie nach einer Autophosphorylierung der IRKD, eine nahezu identische Verteilung der Phosphate in den einzelnen Phosphorylierungsstellen (Kap. 6.4.3, Abb. 6.16). Demnach scheint die Möglichkeit einer *trans*-Phosphorylierung auch ohne Poly(Lysin)-Stimulation gegeben. Neuere Untersuchungen von Cann et al. (1997) deuten auf die Existenz beider Reaktionen, intra- und intermolekulare Phosphorylierung hin. In Abwesenheit von Poly(Kationen) finden sie eine *cis*-Phosphorylierung der N-terminalen Tyrosinphosphorylierungsstellen, während die Besetzung der Tyrosinreste der katalytischen und der C-terminalen Domäne einer *trans*-Phosphorylierung unterliegt.

## 8.2.2 Die Autophosphorylierung

Der Phosphateinbau in der Autophosphorylierungsreaktion der Poly(Lysin) stimulierten IRKD wird durch eine „Sättigungskurve“ beschrieben. Die Halbwertszeit der Reaktion beträgt 0,5 Minuten, die Initialgeschwindigkeit  $160 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  und der maximale Phosphateinbau 4 - 4,5 mol/mol (Kap. 5.3). Damit zeigt das Enzym die für andere lösliche Kinasen beschriebenen Phosphorylierungsraten (Herrera et al. 1989, Cobb et al. 1989, Villalba et al. 1989, Kohanski 1993, Al-Hasani et al. 1997). Für den Phosphorylierungsgrad des Insulinrezeptors finden sich in der Literatur Werte von 3-9 mol/mol für eine ( $\alpha\beta$ )-Untereinheit (Argetsinger und Schafer 1992, Kohanski 1993, Matthey 1993, Kayatz 1994, Magg 1994, Heidenreich 1995, Parvaresh 1996). Im Verlauf der Autophosphorylierungsreaktion der IRKD kommt es neben der Besetzung von Tyrosinphosphorylierungsstellen auch zur Phosphatinkorporation in Serinreste. Der Serinphosphatanteil beträgt gemessen an der Gesamtphosphorylierung etwa 25 %. Durch die direkte Sequenzierung tryptischer Phosphopeptide konnten die Serinreste Ser<sup>1275</sup> und Ser<sup>1309</sup> als Phosphorylierungsstellen identifiziert werden (Al-Hasani et al. 1997). Die Serinphosphorylierung besitzt charakteristische Eigenschaften, die auf eine intrinsische Serinkinaseaktivität der Insulinrezeptorkinase hindeuten. Folglich kann sie in die Klasse der Kinasen mit dualer Spezifität eingeordnet werden (Lindberg et al. 1992). Diese Besonderheit soll in einem eigenen Kapitel diskutiert werden (Kap. 8.3).

Mittels Phosphopeptidkartierung konnten die in der Literatur beschriebenen Autophosphorylierungsstellen der katalytischen und der C-terminalen Domäne der Kinase identifiziert werden (Kap. 5.4.2 Abb. 5.6). Die Phosphorylierung umfaßt die Tyrosinreste Tyr<sup>1146</sup>, Tyr<sup>1150</sup> und Tyr<sup>1151</sup> und die C-terminalen Tyrosinphosphorylierungsstellen Tyr<sup>1316</sup> und Tyr<sup>1322</sup> (Al-Hasani et al. 1997, Tornqvist et al. 1987, Tavaré und Denton 1988, White et al. 1988, Kohanski 1993). Eine Aussage über die N-terminalen Phosphorylierungsstellen ist nicht möglich, da sie in der angewandten Methode nicht nachweisbar sind. Allerdings zeigen mehrere Untersuchungen, daß die Autophosphorylierung des Insulinrezeptors und seiner löslichen Kinase auch in der Besetzung der Tyrosinreste Tyr<sup>960</sup> und Tyr<sup>953</sup> resultiert (Feener et al. 1993, Kohanski 1993, Cann et al. 1997). Diese Daten sind mit der Beobachtung konsistent, daß es zu einer Reduktion der Gesamtphosphatinkorporation in der IRKD-Y960/1316/22F kommt. Damit kann auch von einer Besetzung des Tyrosinrestes Tyr<sup>960</sup> ausgegangen werden (Kap. 5.3, Abb. 5.5 E). Die Analyse der relativen Verteilung der Tyrosinphosphate in der zur Sättigung phosphorylierten, Poly(Lysin)-stimulierten IRKD ergibt unter Berücksichtigung partiell phosphorylierter Peptide und der Serinpeptide eine Phosphatinkorporation von 23

% in den C-Terminus und 43 % in die katalytischen Domäne (Kap. 5.4.2, Abb 5.6). Allerdings ist zu beachten, daß es sich hierbei aufgrund unterschiedlicher Wiederfindungsraten der einzelnen Phosphopeptide nur um apparente Größen handelt, zudem sind in den Profilen noch weitere radioaktive Signalspitzen vorhanden, die nicht eindeutig bestimmten Phosphorylierungsstellen zugeordnet werden können. Vergleichbare Verteilungsmuster finden sich auch in den Untersuchungen von Kohanski (1993). Zudem belegen die Studien von Cann et al. (1997) einen etwa 20%igen Phosphatanteil in der Juxtamembrandomäne. Im Gegensatz dazu wird in der nicht Poly(Lysin)-stimulierten Reaktion, neben einer reduzierten Phosphatinkorporation, auch ein anderes Verteilungsmuster beobachtet. Hier findet sich maßgeblich die Besetzung mono-phosphorylierter Formen der katalytischen Domäne, allerdings scheint der prozentuale Anteil der C-terminalen Tyrosinphosphorylierungsstellen zur stimulierten Reaktion vergleichbar (Kap. 5.4.3, Abb. 5.7).

In der Gegenüberstellung der Phosphopeptidkartierungen der IRKD und des Insulinrezeptors nach Autophosphorylierung *in vitro* ergibt sich für die Verteilung der Phosphate in die einzelnen Tyrosinphosphorylierungsstellen ein übereinstimmendes Bild (Kap. 5.4, Abb. 5.10). Dagegen wird nach Isolation der  $\beta$ -Untereinheit aus einer humanen oder aus einer Nager-Zell-Linie nach Phosphorylierung *in situ* ein anderes Phosphorylierungsmuster erhalten (Kap. 5.4, Abb. 5.10). Hier ist weder eine ausgeprägte Phosphorylierung der C-terminalen noch eine vollständige Besetzung der Tyrosinphosphorylierungsstellen der katalytischen Domäne beobachtbar. Die dominante Phosphorylierung ist die Besetzung der beiden Tyrosinreste Tyr<sup>1150</sup> und Tyr<sup>1151</sup>. Die Nichtdetektierbarkeit der C-terminalen Phosphorylierung ist nicht durch einen proteolytischen Abbau der isolierten  $\beta$ -Untereinheit zu erklären, da das intakte Molekül durch Western-Blot-Analyse immunologisch mit dem erwarteten apparenten Molekulargewicht detektiert wird (Kap. 5.4.4, Abb. 5.8). Demnach kann das auftretende Verteilungsmuster nur durch eine schnelle partielle Dephosphorylierung des Rezeptors durch exogene Phosphatasen oder eine nicht vollständige Aktivierung aller Moleküle in den überexprimierenden Zellen erklärt werden. Letzteres wird durch Untersuchungen an nicht den Rezeptor überexprimierenden Zell-Linien widerlegt, in welchen ebenfalls hauptsächlich eine bis-Phosphorylierung der katalytischen Domäne und eine geringe Phosphorylierung der C-terminalen Tyrosinreste nach „*in situ*“-Autophosphorylierung beobachtet wird (White et al. 1985, White und Kahn 1989, Feener et al. 1993). Die Stimulationsdauer betrug in diesen Experimenten zwischen 10 und 60 Minuten. Bestätigt werden diese Studien von Issad et al. (1991) durch „*in situ*-Labeling“ intakter Ratten-Leberzellen. Demnach scheint die Nichtbesetzung bestimmter Phosphorylierungsstellen kein Artefakt der Überexpression des Rezeptors zu sein. Nach Insulinstimulation kommt es innerhalb von zwei Minuten zur Internalisation des Hormonrezeptorkomplexes in die Zelle und innerhalb von 15 Minuten zu einer beobachtbaren Dephosphorylierung der  $\beta$ -Untereinheit (Kublaoui et al. 1995). Dabei wird eine sehr schnelle Dephosphorylierung der katalytischen und der C-terminalen Domäne beobachtet (King und Sale 1990, King et al. 1991, Wang et al. 1996, Burgess et al. 1992). Folglich könnte das beobachtete Phosphorylierungsmuster durch eine Dephosphorylierung noch während der 20minütigen Stimulationsdauer erklärt werden.

Die Substitution der beiden C-terminalen Tyrosinphosphorylierungsstellen Tyr<sup>1316</sup> und Tyr<sup>1322</sup> gegen Phenylalanin bzw. Threonin bewirkt eine Reduktion der Phosphatinkorporation auf 3 mol/mol bzw. 1,2 mol/mol (Kap. 5.3, Abb. 5.5 C, F). Die erniedrigte Phosphateinbaurate der IRKD-Y1316/22F kann direkt mit der Substitution von zwei potentiellen Tyrosinphosphorylierungsstellen erklärt werden und geht mit einem Verlust der entsprechenden Phosphopeptide in der Phosphopeptidkartierung einher (Kap. 5.4.2, Abb. 5.6). Im Gegensatz dazu kann die deutlich verminderte Phosphatinkorporation in die IRKD-Y1316/22T nicht alleine auf die Aminosäureaustausche zurückgeführt werden. Zunächst ist auffällig, daß es in Folge der Autophosphorylierungsreaktion in diesem Enzym weder zu einer Phosphorylierung der beschriebenen Serinautophosphorylierungsstellen noch zu einer Phosphorylierung der eingeführten Threoninreste kommt (Kap. 5.2, Abb. 5.2, Kap. 8.3). Weiterhin zeigt die Kinase ein anderes Verteilungsmuster in den Phosphorylierungsstellen der katalytischen Domäne des Enzyms (Kap. 5.4.2, Abb. 5.6). Während die IRKD-Y1316/22F eine vergleichbare Besetzung wie die IRKD aufweist, ist in der IRKD-Y1316/22T ein sehr hoher Anteil mono-phosphorylierter Peptide und die bis-Phosphorylierung der beiden Tyrosinreste Tyr<sup>1150</sup> und Tyr<sup>1151</sup> detektierbar. Eine Besetzung dieser beiden Phosphorylierungsstellen wird normalerweise bei der IRKD nur in der initialen Phase

der Autophosphorylierungsreaktion beobachtet ( $< 30$  sec., Nölle 1998). Offensichtlich bewirkt der Austausch der beiden Tyrosinreste gegen Threonin gravierende Änderungen in der Tertiärstruktur der Kinase, die zu einer verringerten Aktivität in der Autophosphorylierung führen (Kap. 8.2.1). Der Vergleich der Initialgeschwindigkeiten der beiden Enzyme zu der der IRKD zeigt, daß die eingeführten Mutationen eine Erniedrigung bewirken. Dabei ist die Initialgeschwindigkeit für die IRKD-Y1316/22T mit  $40 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  deutlich niedriger als die für die IRKD-Y1316/22F gemessene ( $88 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , Kap. 5.3, Abb. 5.5). Bemerkenswert ist, daß das Einfügen einer zusätzlichen Substitution (Tyr<sup>960</sup>→Phe) in der IRKD-Y960/1316/22F zwar zu einer weiteren Reduktion des Phosphateinbaus führt (2 mol/mol), während die Initialgeschwindigkeit der Reaktion mit  $87 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  der der IRKD-Y1316/22F vergleichbar ist (Kap. 5.3, Abb. 5.5). Damit wird offensichtlich, daß in der IRKD bereits in der initialen Phase der Reaktion eine Phosphorylierung der beiden C-terminalen Tyrosinreste erfolgt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Beobachtungen von Nölle (1998), der eine initiale Besetzung der beiden C-terminalen Tyrosinphosphorylierungsstellen und eines Tyrosinrestes in der katalytischen Domäne (Tyr<sup>1150</sup> oder Tyr<sup>1151</sup>) findet.

### 8.2.3 Die Substratphosphorylierung

Für die Charakterisierung der Substratphosphorylierungsreaktion der löslichen Insulinrezeptorkinase wurden zum einen Histon 2b oder *Myelin Basic Protein* verwendet, zum anderen solche Substrate, welche sich vom Rezeptor selbst (Domänen oder Peptide, die Autophosphorylierungsstellen enthalten, Kap. 6.1.2, Kap. 6.4.5), oder von Signalproteinen, die von der Kinase *in vivo* erkannt und phosphoryliert werden (Kap. 6.4.3, Kap. 6.4.4), ableiten. Die von anderen Arbeitsgruppen publizierten kinetischen Konstanten löslicher Kinasen lassen sich aufgrund unterschiedlicher Reaktionsbedingungen (Temperatur, Metallionen-, ATP-Konzentrationen, Aktivierung durch Polykationen) mit denen in dieser Arbeit berichteten Daten nur schwer vergleichen.

Die ermittelten kinetischen Konstanten  $K_m$  und  $V_{max}$  variieren für die untersuchten Substrate erheblich und unterscheiden sich um bis zu zwei Größenordnungen (Kap. 6.2, Tab. 6.1). Für unphysiologische Substrate, wie Histon 2b, *Myelin Basic Protein* und Poly(Glu:Tyr)<sub>4:1</sub> werden Konstanten erhalten, die für eine ineffiziente Phosphorylierung dieser Substrate sprechen. Vergleichbare kinetische Konstanten für die Substratphosphorylierungsreaktion mit löslichen Insulinrezeptorkinasen werden von Ellis et al. (1988), Kallen et al. (1990), Herrera et al. (1989), Villalba et al. (1989) und Al-Hasani (1995) berichtet. Im Gegensatz dazu zeigen alle vom Insulinrezeptor und von seinen natürlichen Substraten (hIRS-1 p30 und Gab-1, Tab. 6.2) abgeleitete Substrate  $K_m$ -Werte im niederen mikromolaren Bereich ( $< 20 \mu\text{M}$ ). Bemerkenswert ist, daß die  $K_m$ -Werte für kurze synthetische Peptide mit korrespondierenden Phosphorylierungsstellen des Insulinrezeptors generell wesentlich größer sind und zum Teil im millimolaren Bereich liegen. Stadtmayer und Rosen (1986) ermittelten für den Insulinrezeptor mit einem Peptid, welches alle drei Tyrosinphosphorylierungsstellen der katalytischen Domäne des Insulinrezeptors enthält (Y3-Peptid) einen  $K_m$ -Wert von  $240 \mu\text{M}$ . Weiterhin wurde für ein 12 Aminosäuren langes Peptid mit dem Tyrosinrest Tyr<sup>1316</sup> ein  $K_m$ -Wert von  $1130 \mu\text{M}$  und ein den Tyrosinrest Tyr<sup>960</sup> enthaltendes Peptid ein  $K_m$ -Wert von  $1200 \mu\text{M}$  erhalten (Stadtmayer und Rosen 1986). Im Vergleich dazu wurden mit der löslichen Kinase als Katalysator für das Y3-Peptid ein  $K_m$ -Wert von  $258 \mu\text{M}$  und für ein das Tyrosin Tyr<sup>1322</sup> enthaltende Peptid ein  $K_m$ -Wert von  $800 \mu\text{M}$  bestimmt (Quirk et al. 1995). In dieser Arbeit wurde für das den Tyrosinrest Tyr<sup>1316</sup> enthaltende Peptid ein  $K_m$ -Wert von  $192 \mu\text{M}$  ermittelt (Kap. 6.4.5, Abb. 6.17). Substrate der cAMP-abhängigen Proteinkinase und kurze synthetische Peptide mit korrespondierenden Phosphorylierungsstellen zeigen dagegen  $K_m$ -Werte im mikromolaren Bereich (Kemp et al. 1977). Der Vergleich der kinetischen Konstanten für kurze synthetische Peptide ( $< 20$  Aminosäuren) und der in dieser Arbeit verwendeten Substrate ( $> 100$  Aminosäuren) zeigt, daß für eine Substraterkennung der Tyrosinkinase des Insulinrezeptors nicht nur die Aminosäurereste in der direkten Nachbarschaft der Phosphorylierungsstelle eine Rolle spielen, sondern auch weiter entfernte Bereiche wichtig zu sein scheinen. Umgekehrt bedeutet dieses, daß die Enzym-Substraterkennung auch Regionen außerhalb des aktiven Zentrums der Kinase einschließt.

Die Betrachtung der einzelnen Substrate ergibt, daß die kinaseinaktive IRKD-K1018A der weitaus beste Phosphatakzeptor für die Insulinrezeptorkinase darstellt (Kap. 5.4.5, Abb. 5.11). Allerdings zeigt sich, daß dieses Substrat nicht der Michaelis-Menten-Kinetik zu unterliegen scheint, vielmehr sprechen die Daten für einen allosterisch kontrollierten Prozeß. Demnach ergeben sich konzentrationsabhängig unterschiedliche Affinitäten zum Enzym. Die Analyse der Phosphopeptidkartierung dieses Substrates nach Phosphorylierung durch die IRKD-HIS zeigt aber, daß alle Phosphorylierungsstellen dem Katalysator zugänglich sind (Kap. 5.4.5, Abb. 5.14). Für dieses Verhalten könnten möglicherweise Konformationsänderungen verantwortlich sein. Der Austausch der invarianten Aminosäure Lys<sup>1018</sup> bewirkt, daß das Enzym nicht mehr in der Lage ist, ATP zu binden. Möglicherweise ist aber eine Bindung Voraussetzung für eine effektive Zugänglichkeit der Phosphorylierungsstellen in der initialen Phase der Reaktion. Diese Hypothese wird durch die Befunde von Wieber (1998) und Nölle (1998) gestützt, die die kinetischen Konstanten für die kinaseinaktive IRKD-D1120A untersucht haben. Dieses Substrat ist noch in der Lage ATP zu binden und zeigt den klassischen Verlauf einer Michaelis-Menten-Kinetik. Dabei stimmen die gefundenen apparenten kinetischen Konstanten mit den extrapolierten Werten für die IRKD-K1018A sehr gut überein. In der Kinetik der zeitabhängigen Substratphosphorylierung der beiden inaktiven Kinasen werden Unterschiede erhalten. Während in der Reaktion mit der IRKD-D1120A (und der IRKD-HIS als Katalysator) das Substrat einen vergleichbaren Verlauf in der Phosphatinkorporation wie eine aktive Kinase in der Autophosphorylierungsreaktion zeigt (Kessler 1998), ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Phosphatinkorporation in die IRKD-K1018A und die IRKD-HIS deutlich verlangsamt (Kap. 5.4.5, Abb. 5.13). Zu vergleichbaren Ergebnissen kommen Frattali et al. (1992) unter der Verwendung von Rezeptorhybriden aus einer aktiven und einer inaktiven ( $\alpha\beta$ )-Untereinheit. Dabei ist bemerkenswert, daß solche Rezeptorhybride keinerlei exogene Tyrosinkinaseaktivität aufweisen. Lee et al. (1993) berichten für den intakten Holorezeptor eine asymmetrische Phosphorylierung der einzelnen  $\beta$ -Untereinheiten. Die Autoren demonstrieren, daß es nach Bindung des Hormons an die hochaffine Bindungsstelle einer  $\alpha$ -Untereinheit zu einer 40%igen Phosphorylierung in der Rezeptorhälfte kommt, an welcher die Assoziation erfolgte. Die Untersuchungen der Substratphosphorylierungen der IRKD-K1018A geben keinen Hinweis auf eine solche asymmetrische Phosphorylierung. Sowohl der spezifische Phosphateinbau als auch die Verteilung der Phosphate in die einzelnen Phosphorylierungsstellen sind unter Verwendung des einfachen  $K_m$ -Wertes mit denen der aktiven Kinase vergleichbar (Kap. 5.4.5, Abb. 5.14). Interessanterweise stellt die IRKD-K1018A kein Substrat für den Holorezeptor dar (Magg, persönliche Mitteilung). Dies ist möglicherweise ein Hinweis, daß eine intermolekulare Phosphorylierung zwischen zwei Holorezeptoren nicht stattfinden kann.

Neben den vom Rezeptor abgeleiteten Substraten sind die aus natürlichen Signalproteinen des Insulinrezeptors (IRS-1 und GAB-1) erhaltenen rekombinanten Fragmente sehr effiziente Substrate für die Insulinrezeptorkinase (Kap. 6.2, Tab. 6.1 und Kap. 6.4.4, Tab. 6.4). Der ermittelte apparente  $K_m$ -Wert für hIRS-1 p30 von 12  $\mu\text{M}$  stimmt in der Größenordnung mit dem für einen WGA-gereinigten Insulinrezeptor ermittelten Wert von 6,8  $\mu\text{M}$  überein (Siemeister et al. 1995). Im Gegensatz dazu berichten Shoelson et al. (1992) für aus IRS-1 abgeleitete Peptide  $K_m$ -Werte von 24–300  $\mu\text{M}$ . Interessanterweise werden andere Verhältnisse bei der Betrachtung der  $K_m$ -Werte für die rekombinanten Gab-1 Fragmente oder dem intakten Gab-1 Protein beobachtet. In diesem Fall sind die für die lösliche Kinase erhaltenen  $K_m$ -Werte für die Teilbereiche um den Faktor 10 niedriger als für den Holorezeptor. (Kap. 6.4.4, Tab. 6.2, Lehr, eingereicht zur Publikation). Dagegen besitzt der Holorezeptor eine um den Faktor 2 höhere Affinität zum intakten Gab-1 Protein (10  $\mu\text{M}$ ) als die IRKD (20  $\mu\text{M}$ , Lehr, eingereicht zur Publikation). Dies zeigt die Wichtigkeit der im Molekül enthaltenen PH-Domäne für die Substraterkennung des Insulinrezeptors. In diesem Zusammenhang steht die Beobachtung, daß sich bei Verwendung der rekombinanten Fragmente von IRS-1 und Gab-1 große Unterschiede in den  $V_{\text{max}}$ -Werten für den Insulinrezeptor und seine lösliche Kinase ergeben. In allen Fällen ist die Geschwindigkeit der Reaktion für die IRKD um den Faktor 5–10 höher als für den gereinigten Insulinrezeptor (Siemeister et al. 1995, Lehr, persönliche Mitteilung). Im Fall der Gab-1 Fragmente könnte diese Beobachtung mit der schlechteren Substraterkennung durch den Holorezeptor begründet werden, allerdings erklärt es nicht die Unterschiede in den  $V_{\text{max}}$ -Werten für das rekombinante IRS-1 Fragment. Möglicherweise ist für dieses Verhalten als weitere Ursache die Flexibilität des intakten

Rezeptormoleküls verantwortlich. Untersuchungen von Baron et al. (1992) und Herrera und Rosen (1986) zeigen, daß während der Autophosphorylierung in der C-terminalen und der katalytischen Domäne Konformationsänderungen stattfinden, welche einen Einfluß auf die Zugänglichkeit exogener Substrate haben können. Da der gereinigte Insulinrezeptor immer in Verbindung mit Detergenzien in Micellen vorliegt, könnte dies zum einen die Zugänglichkeit der Substratmoleküle erschweren, zum anderen aber auch Auswirkungen auf die Flexibilität des Moleküls haben. Für diese Hypothese sprechen die Ergebnisse von Pavaresch (unveröffentlicht), welche eine Abhängigkeit der katalytischen Effizienz des Rezeptors von dem verwendeten Detergenzien belegen. Die Untersuchung der Teilbereiche und des Gesamtproteins Gab-1 in der Substratphosphorylierung durch die lösliche EGF-Rezeptorkinase und die IRKD zeigt, daß sich deutliche Unterschiede in den apparenten  $K_m$ -Werten ergeben (Kap. 6.4.4, Tab. 6.2). Das 77 kDa große Protein gilt als Adapterprotein in der Insulinrezeptor- und EGF-Rezeptor-Signalweiterleitung. Gab-1 zeigt hohe Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz und seinen strukturellen Motiven zu dem Signalprotein IRS-1 (Holgado-Madruga et al. 1996). Neuere Untersuchungen zur Phosphorylierung von Gab-1 durch die IRKD und die EGF-Rezeptorkinase belegen, daß verschiedene Phosphorylierungsstellen durch die beiden Kinasen besetzt werden, welche zu unterschiedlichen Signalweiterleitungen in der Zelle führen (Lehr et al. eingereicht zur Publikation). Das Gesamtprotein enthält 47 potentielle Serin- und Threoninphosphorylierungsstellen und 16 potentielle Tyrosinphosphorylierungsstellen. In der Substratphosphorylierungsreaktion des Insulinrezeptors kommt es vornehmlich zur Besetzung eines Tyrosinrestes (Tyr<sup>447</sup>) im zentralen Bereich des Proteins. Durch Interaktionsstudien konnte nachgewiesen werden, daß diese Phosphorylierung maßgeblich zu einer Aktivierung der PI3-Kinase führt. Im Gegensatz dazu findet sich nach Phosphorylierung durch den EGF-Rezeptor oder seine lösliche Kinase die Besetzung eines Tyrosinrestes in der C-terminalen Domäne (Tyr<sup>657</sup>), welches als Bindungsstelle für die Phosphatase Syp identifiziert werden konnte. Demnach ist für die Signalweiterleitung der Rezeptorkinasen nicht alleine die Quantität der Phosphorylierung und damit die Multiplikation des Signales entscheidend, vielmehr deutet dieser Befund auf eine hohe Qualität und Spezifität des Signals. Dafür sprechen auch die, für alle Substrate beobachteten, sehr niedrigen Wechselzahlen, die in den Größenordnungen mit gefundenen Werten für andere Tyrosinkinase übereinstimmen (Affüpper 1997, Al-Hasani 1995, Walker et al. 1987, Pike et al. 1984, Richert et al. 1982, Graziani et al. 1983). Im Vergleich dazu zeigen Serin/Threoninkinasen eine deutlich höhere Phosphotransferaseaktivität (Kemp et al. 1977, Kemp und Pearson 1991).

Die Analyse der IRKD-Y1316/22F beweist, daß der C-Terminus und seine Phosphorylierung der hier enthaltenen Tyrosinphosphorylierungsstellen einen Einfluß auf die katalytische Effizienz in der Substratphosphorylierung besitzt. Die Substitution der beiden Tyrosinreste Tyr<sup>1316</sup> und Tyr<sup>1322</sup> gegen Phenylalanin bewirkt eine Reduktion der apparenten  $V_{max}$ -Werte für die beiden untersuchten Substrate GST-CT und GST-Ex20 (Kap. 6.2, Abb. 6.3), wobei der Einfluß auf die Phosphorylierung des C-terminalen Fusionsproteins deutlich größer ausfällt. In beiden Fällen bleibt die Substratbindung unbeeinträchtigt, was sich durch vergleichbare, apparente  $K_m$ -Werte in der IRKD und der IRKD-Y1316/22F katalysierten Reaktion ausdrückt. Demnach ergibt sich ein kompetitiver Einfluß des C-Terminus in der Phosphotransferasereaktion. Dies impliziert, daß der C-Terminus in seiner nicht phosphorylierten Form direkt mit dem aktiven Zentrum der Kinase interagiert. Zu vergleichbaren Ergebnissen kommen Gual. et al. (1996). Sie demonstrieren, daß ein gegen die Tyrosinphosphorylierungsstellen gerichteter Antikörper eine Unterbindung ihrer Phosphorylierung bewirkt und damit bei vergleichbaren  $K_m$ -Werten für die Substrate Shc, IRS-1, Histon 2b und Poly(Glu:Tyr) eine Reduktion der apparenten  $V_{max}$ -Werte hervorruft. Quirk et al. (1995) und Wei et al. (1995) zeigen, daß die Deletion von 72 Aminosäuren des C-terminalen Bereichs in einer Erhöhung der apparenten  $V_{max}$ -Werte für synthetische Peptide resultiert, dagegen wird keine Veränderung der apparenten  $K_m$ -Werte für diese Substrate beobachtet. Untersuchungen von Wieber (1998) und Nölle (1998) belegen, daß Unterschiede in der Substraterkennung und Phosphorylierungsgeschwindigkeit bestehen, wenn mit einer C-terminalen Deletionsmutante ( $\Delta 72$ ) ein rekombinantes Fragment des IRS-1 phosphoryliert wird. Möglicherweise sind im C-Terminus Bereiche vorhanden, die für eine effektive Erkennung dieser großen Proteinstrukturen verantwortlich sind, während die Naherkennung von Peptiden nicht beeinflußt wird. Für eine direkte Interaktion des C-Terminus mit dem katalytischen Zentrum sprechen

auch die kinetischen Konstanten für ATP, die bei Abwesenheit der beiden Tyrosinphosphorylierungsstellen oder der C-terminalen Domäne verändert sind (Kap. 8.2, Conn 1997, Quirk et al. 1995). Die Beeinträchtigung der Affinitäten für Substrate (ATP und Phosphosubstrat) sprechen daher für eine Beteiligung des C-Terminus bei der Substratphosphorylierungsreaktion durch eine direkte Interaktion mit dem aktiven Zentrum.

Die Rolle der C-terminalen Tyrosinphosphorylierung bzw. der C-terminalen Domäne für die biologische Aktivität wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Aufgrund der Eigenschaft des Insulinrezeptors, sowohl mitogene als auch metabolische Effekte zu vermitteln und einer geringen Sequenzhomologie der C-terminalen Domäne zu anderen Mitgliedern der Insulinrezeptorkinase-Familie (Ullrich et al. 1986) oder anderen Tyrosinkinase-Rezeptoren (Hunter und Lindberg 1994), wurde dieser Domäne eine mögliche Funktion in der Signaltransduktion zugesprochen. Generell zeigt sich, daß der C-Terminus einen Beitrag für die Stabilität der Rezeptorkinase leistet. Die Deletion von mehr als 82 Aminosäuren bewirkt eine vollkommene Reduktion der Kinaseaktivität (Wei et al. 1995, Yamamoto-Honda et al. 1993, Clark und Konstantopoulos 1994, Yan et al. 1993). Im Gegensatz dazu bewirkt der Austausch der C-terminalen Tyrosine oder die Deletion von weniger als 82 Aminosäuren eine normale Insulinbindung, Kinaseautophosphorylierung der katalytischen Domäne oder Rezeptorinternalisierung (Ando et al. 1992, Takata et al. 1992, Thies et al. 1989, Yan et al. 1993, Myers et al. 1991, Takata et al. 1991, Yamamoto-Honda et al. 1993, Clark und Konstantopoulos 1994). Zu verschiedenen Ergebnissen kommen die Autoren bei der Analyse der Signalweiterleitung *in situ*. Während einige verstärkte mitogene und mit dem Wildtyp vergleichbare metabolische Effekte feststellen (Takata et al. 1991, Takata et al. 1992, Ando et al. 1992), beschreiben andere die Stimulation metabolischer und eine Verringerung mitogener Effekte (Gual et al. 1996, Baron et al. 1990). Dagegen finden Myers et al. (1991) eine normale biologische Wirkung. Zu beachten ist, daß bei den verschiedenen Untersuchungen unterschiedliche Zell-Linien verwendet wurden. Aus der Tatsache, daß die C-terminalen Tyrosinreste potentielle Bindungsstellen für verschiedene Signalproteine darstellen können (Einleitung), ergibt sich, daß möglicherweise schon ein differentes Spektrum an in diesen Zellen enthaltenen Molekülen zu den beobachteten Unterschieden führt. Da die in dieser Arbeit gefundene Beeinträchtigung des Phosphotransfers auf exogene Substrate offensichtlich ist, besteht ferner die Möglichkeit, daß es bei der Substratphosphorylierung *in situ* zu unterschiedlichen Phosphorylierungsmustern in den Adaptermolekülen kommt, welches wiederum ein differenziertes Spektrum in der Signalweiterleitung ergibt. Auf solche Unterschiede in der Besetzung einzelner Phosphorylierungsstellen wurde bereits bei der Diskussion der Substratphosphorylierung des Gab-1-Proteins hingewiesen. Möglicherweise spielt aber auch die Dauer eines Signals für die Spezifität eine Rolle. Stimulierung von PC12-Zellen mit NGF oder EGF führt zur Aktivierung der Map-Kinase (Obermaier et al. 1994). Während die Stimulation mit NGF Neuritenwachstum induziert (Greene und Tischler 1976), führt EGF zur Proliferation dieser Zellen (Huff et al. 1981). Die differenzierte Signalweiterleitung ist in einer zeitlich unterschiedlich anhaltenden Aktivierung der Map-Kinase begründet (Muroya et al. 1992, Heasley und Johnson 1992, Traverse et al. 1992). Möglicherweise führt die veränderte katalytische Aktivität der C-terminalen Mutanten zu einer anderen zeitlichen Phosphorylierungskinetik exogener Substrate und ergibt daher eine unterschiedliche Spezifität in der Signalweiterleitung.

Exogene Substrate bewirken eine Hemmung der Autophosphorylierungsreaktion der Insulinrezeptorkinase (Kap. 6.3, Abb. 6.5). Bei allen in dieser Arbeit untersuchten Substraten findet sich eine halbmaximale Inhibition der Rezeptorkinase bei Konzentrationen, die in etwa den jeweiligen  $K_m$ -Werten entsprechen. Diese Inhibition deutet darauf hin, daß die Substrate mit den Autophosphorylierungsstellen des Enzyms kompetitieren. Die Analyse des Phosphorylierungsstatus der einzelnen Phosphorylierungsstellen des inhibierten Enzyms zeigt, daß vor allem die katalytische Domäne und die Serinautophosphorylierungsstellen der C-terminalen Domäne betroffen werden (Kap. 6.3, Abb. 6.6, Kap. 8.4). Dabei ist die auftretende mono-Form der katalytischen Domäne auf die Besetzung des Tyrosinrestes Tyr<sup>1150</sup> oder Tyr<sup>1151</sup> zurückzuführen (Nölle 1998). Die Inhibition der Kinaseautophosphorylierung unterbindet aber nicht generell die Fähigkeit zum Phosphotransfer auf das Substrat. Steigende Substratkonzentrationen führen, wie erwartet, zu einer gesteigerten Phosphatinkorporation in die Substrate (Kap. 6.3, Abb. 6.5 C). Die Inhibition der Autophosphorylierung des Insulinrezeptors durch exogene Substrate wurde von verschiedenen Autoren beschrieben (Kwok et al. 1986, Kohanski

und Lane 1986, Flores-Riveros et al. 1989, Shoelson et al. 1989). Dabei konnte gezeigt werden, daß die Substrathemmung zu einer Inhibition der katalytischen Domäne des Insulinrezeptors führt (Flores-Riveros et al. 1989) und gleichzeitig eine Erniedrigung des  $V_{\max}$ -Wertes für das verwendete Substrat bewirkt (White et al. 1984, Kwok et al. 1986). Im Gegensatz dazu führt die Vorphosphorylierung der Kinase zu keiner signifikanten Beeinträchtigung der Autophosphorylierung und zu einer 10-20fachen Erhöhung der jeweiligen  $V_{\max}$ -Werte in der Substratphosphorylierungsreaktion (Al-Hasani 1995, Lehr 1995, Shoelson et al. 1989, Müller 1996). Demnach scheint die Besetzung eines Tyrosinrestes bereits für eine Aktivierung der Phosphotransferaseaktivität der Kinase ausreichend. Erst mit der weiteren Besetzung der Tyrosinphosphorylierungsstellen in der katalytischen Domäne kommt es dann zu einer Erhöhung der Katalysegeschwindigkeit des Enzyms. Aus den vorliegenden Röntgenstrukturanalysen der Insulinrezeptorkinasedomäne schließt Hubbard, daß die Phosphorylierung des Tyr<sup>1150</sup> als erstes erfolgt und damit eine Freigabe des aktiven Zentrums und der ATP-Bindungsstelle bewirkt (Hubbard et al. 1994, Hubbard 1997).

Die ausgeprägte Konkurrenz der katalytischen Domäne könnte auf eine unterschiedliche Molekularität der einzelnen Autophosphorylierungsstellen und damit auf einen kinetisch kontrollierten Prozeß in der Kinaseaktivierung hindeuten. Die Besetzung der Tyrosinreste der katalytischen Domäne scheint einem *trans*-Phosphorylierungsprozeß zu folgen (Kohanski 1989, Li et al. 1992, Yan et al. 1993, Hubbard et al. 1994, Hubbard 1997, Cann et al. 1997). Demnach ist in Anwesenheit von Substraten zwar eine *trans*-Phosphorylierung des Tyrosinrestes Tyr<sup>1150</sup> möglich, mit der Freigabe des aktiven Zentrums kommt es aber dann zur Bindung des Substrates und führt zu einer Konkurrenz der *trans*-Phosphorylierung der weiteren Phosphorylierungsstellen in der katalytischen Domäne. Aus der Beobachtung, daß im inhibierten Enzym eine effiziente Phosphorylierung der beiden C-terminalen Phosphorylierungsstellen erhalten wird, muß gefolgert werden, daß eine *trans*-Phosphorylierung nicht generell von exogenen Substraten unterbunden wird. Für die Besetzung dieser beiden Tyrosinphosphorylierungsstellen Tyr<sup>1316</sup> und Tyr<sup>1322</sup> wird ebenfalls ein intermolekularer Mechanismus postuliert (Cann et al. 1997). Interessanterweise führt die Autophosphorylierung der Kinase in Abwesenheit von Substrat und Poly(Lysin) zu einem vergleichbaren Chromatogramm in der Phosphopeptidkartierung wie die substratinhibierte Kinase (Kap. 5.4.3, Abb. 5.7 und Kap. 5.4.5, Abb. 5.14). Untersuchungen von Lehr (1995) belegen, daß die Abwesenheit von Poly(Lysin) zu einer 10fachen Erniedrigung des  $V_{\max}$ -Wertes für das Ex20-Peptid führt. Da ohne Stimulation keine vollständige Besetzung der Tyrosinreste in der katalytischen Domäne erhalten wird, scheint die verminderte Phosphotransferase-Aktivität in diesem Sachverhalt begründet. Aus den Beobachtungen könnte gefolgert werden, daß exogene Substrate mit der Kinase um das Poly(Kation) konkurrieren, welches wiederum zu einer schlechten Aktivierung und damit einer Verminderung der Phosphotransferase-Aktivität führt. Diese Möglichkeit könnte eine fehlende Inhibition bei der Substratphosphorylierung der synthetischen Peptide erklären (Kap. 6.4.5, Abb. 6.17 und Abb. 6.18), die möglicherweise Poly(Lysin) schlechter abstrahieren. Allerdings zeigen Walker et al. (1987) und Shoelson et al. (1989) eine starke Inhibition der Autophosphorylierung des Insulinrezeptors in Anwesenheit von Peptiden, welche sich aus der katalytischen Domäne der Kinase abgeleiten. Zudem führen hohe Substratkonzentrationen in Abwesenheit von Poly(Lysin) bei der löslichen Kinase und dem Insulinrezeptor ebenfalls zu einer verminderten Autophosphorylierung des Enzyms (Al-Hasani 1995, Kwok et al. 1986, Kohanski und Lane 1986, Flores-Riveros et al. 1989, Shoelson et al. 1989). Auch die Beobachtung, daß verschiedene Substrate mit unterschiedlichen Eigenschaften eine Konkurrenz bewirken, die jeweils bei Konzentrationen um den jeweiligen  $K_m$ -Wert auftritt (Kap. 6.3, Abb. 6.5), scheinen die Möglichkeit der Erniedrigung der Poly(Lysin)-Konzentration als alleinige Ursache für die verminderte Autophosphorylierung auszuschließen.

#### 8.2.4 Die transiente Phosphorylierung

Die Untersuchung des ATP-Umsatzes der Poly(Lysin)-stimulierten IRKD demonstriert, daß die Phosphatinkorporation in die Kinase im Verlauf der Autophosphorylierungsreaktion eine Sättigungsphase erreicht (Halbwertszeit ca. 5 min), während die ADP-Bildung weiter anhält. (Kap. 7.1, Abb. 7.1 A). Dabei zeigt sich, daß in der initialen Phase der Reaktion die ADP-Bildung und die

Phosphatinkorporation eine nahezu identische Geschwindigkeit besitzen und belegt, daß in nur dieser Phase der Reaktion alle Phosphorylgruppen in das Enzym inkorporiert werden. Ein ATP-Umsatz wird auch in Abwesenheit von Poly(Lysin) beobachtet, allerdings ist die Geschwindigkeit der Reaktion und das Ausmaß der Freisetzung von ADP um den Faktor 15 geringer (Kap. 7.1, Abb. 7.1 B). Vergleichbare Verhältnisse finden sich bei der IRKD-HIS und dem aus Humanplazenta gereinigten Insulinrezeptor (Al-Hasani et al. 1994, Matthey 1993, Heidenreich 1995). Das zur Sättigung phosphorylierte Enzym setzt demnach in einer konstitutiven Aktivität ATP zu ADP und anorganischem Phosphat um. Letzteres kann im Verlauf der Reaktion durch Adsorptionsmessungen an Aktivkohle sowohl im Verlauf der Autophosphorylierungsreaktion des Insulinrezeptor (Matthey 1993, Kayatz 1994) als auch der IRKD-HIS (Al-Hasani 1995) nachgewiesen werden. Der Befund einer Abhängigkeit des ATP-Umsatzes von der Poly(Lysin)-Stimulation deutet darauf hin, daß es sich bei dieser Eigenschaft des Enzyms um eine intrinsischen Aktivität handelt. Jedoch ist nicht auszuschließen, daß der gesteigerte ATP-Verbrauch auf eine im Reaktionsansatz enthaltene Fremdaktivität zurückzuführen ist. Dabei könnte es sich zum einen um eine Phosphatase oder eine ATPase handeln. Eine Phosphatase würde die Kinase permanent dephosphorylieren und dadurch eine Rephosphorylierung des Enzyms unter ATP-Verbrauch bewirken. Dagegen würde eine ATPase, parallel zur Autophosphorylierungsreaktion, ATP hydrolysieren und somit den erhöhten ATP-Umsatz hervorrufen. Gegen eine Fremdaktivität sprechen mehrere Befunde: Zum einen zeigt sich, daß die Zugabe von Kinaseinhibitoren (AMP-PNP oder Staurosporin) nach Vorphosphorylierung der IRKD-HIS (Al-Hasani 1995) oder IRKD (Kap. 7.2.1, Abb. 7.2; Koch 1998) keinen Verlust der inkorporierten Radioaktivität hervorruft. Damit kann die Anwesenheit einer exogenen Phosphataseaktivität im Reaktionsansatz ausgeschlossen werden. Werden die Autophosphorylierungsreaktionen direkt in Anwesenheit der Inhibitoren durchgeführt und das ATP-ADP-Verhältnis nach einer 10minütigen Reaktionszeit bestimmt, so findet sich eine Hemmung sowohl im Phosphateinbau als auch in der Bildung von ADP (Al-Hasani 1995). In diesem Zusammenhang zeigt Nölle (1998), daß kein ATP-Umsatz beobachtet wird, wenn die kinaseinaktiven Varianten der IRKD (IRKD-K1018A und IRKD-D1120A) für die Untersuchung verwendet werden. Aus diesen Ergebnissen kann daher gefolgert werden, daß keine der Kinase assoziierten ATPase- sondern eine intrinsische Aktivität der Insulinrezeptorkinase für den erhöhten ATP-Umsatz verantwortlich ist.

Nach Krebs (persönliche Mitteilung) zeigen viele Kinase, wie z. B. die Proteinkinase A (Mendelow et al. 1993, Lee et al. 1994), eine geringe basale „ATPase-Aktivität“. Allerdings sind diese geringen Aktivitäten in keinem Fall mit den erhaltenen Befunden für die IRKD vergleichbar. So zeigt sich, daß in Anwesenheit von exogenen Substraten die ADP-Bildung und die Besetzung der Phosphorylierungsstellen in den angebotenen Phosphoakzeptorstellen parallel verlaufen (Al-Hasani et al. 1994). Dabei ist die Effizienz dieser Reaktion abhängig von der Substratkonzentration. Bemerkenswert ist aber, daß auch bei Anwesenheit eines Substrates die Geschwindigkeit des Phosphotransfers auf die exogenen Phosphoakzeptorstellen der Geschwindigkeit des ATP-Umsatzes der Autophosphorylierungsreaktion entspricht. Weiterhin ergeben sich in beiden Fällen vergleichbare Mengen an umgesetztem ATP. Daraus kann gefolgert werden, daß die beobachtete „ATPase-Aktivität“ direkt mit der Phosphotransferaseaktivität des Enzyms korreliert (Al-Hasani 1995). In diesem Zusammenhang steht die Beobachtung, daß bei unterschiedliche ATP-Konzentrationen immer die gleiche Geschwindigkeit im ATP-Umsatz erhalten wird (Nölle 1998). Aus diesen Ergebnissen ergibt sich die Frage, ob der erhöhte ATP-Umsatz auf eine intrinsischen „ATPase- oder Phosphatase-Aktivität“ des phosphorylierten Enzyms beruht:

- Bei einer intrinsische ATPase-Aktivität würde die Kinase ATP spalten und die  $\gamma$ -Phosphorylgruppe auf das Enzym selbst, ein Substrat oder auf Wasser übertragen. In der initialen Phase der Reaktion würde demnach bei einer konstanten Wechselzahl nur die Übertragung auf Phosphorylierungsstellen des Enzyms oder des Substrates stattfinden, danach überwiegt die einfache Hydrolyse und Übertragung auf das Wasser, wobei anorganisches Phosphat entsteht.

- Bei einer intrinsischen Phosphataseaktivität würde nach Phosphorylierung der Kinase eine Dephosphorylierung erfolgen, wobei anorganisches Phosphat entsteht. Anschließend käme es zu einer Rephosphorylierung der Kinase unter ATP-Verbrauch. Demnach müßten in der Kinase transiente Phosphorylierungsstellen nachweisbar sein. Denkbar wäre in diesem Fall aber auch, daß das Phosphoenzym und das gebildete ADP zu einer Rückreaktion zu ATP und Dephosphoenzym führen könnte.

Die Untersuchungen der Kinase-Autophosphorylierungsreaktion unter Pulse-Chase-Bedingungen zeigen, daß nach Inkubation mit nicht radioaktiv markiertem ATP ein apparenter Verlust an inkorporierten radioaktiv markierten Phosphaten des zur Sättigung phosphorylierten Enzyms erkennbar ist. Allerdings scheint dieser Verlust nicht in einer realen Dephosphorylierung begründet, da der Phosphorylierungsstatus der Kinase vor und nach der Pulse-Chase-Reaktion im immunologischen Nachweis mit  $\alpha$ -Phosphotyrosin-Antikörper vergleichbar ist (Kap. 7.2.1, Abb. 7.2). Demnach kann der beobachtete Verlust an inkorporierter Radioaktivität auf eine permanente De- und Rephosphorylierung von einzelnen Phosphorylierungsstellen und damit auf eine transiente Phosphorylierung der Kinase zurückgeführt werden. Dieser Umstand drückt sich auch in Reaktionen unter Pulse-Hotchase-Bedingungen aus. Das mit nicht radioaktiv markiertem ATP zur Sättigung phosphorylierte Enzym inkorporiert nach Zugabe von radioaktiv markiertem ATP weiterhin  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-Phosphat}$  (Kap. 7.2.2, Abb. 7.5). Dabei zeigt sich, daß der Anteil der ausgetauschten Phosphate sowohl in der Chase- als auch in der Hotchase-Reaktion der Kinase ca. 2 mol/mol ausmacht. Ferner ergeben sich in beiden Fällen vergleichbare Initialgeschwindigkeiten. Dabei erfordert der Phosphorylaustausch eine aktive Kinase. Der Zusatz von Kinaseinhibitoren zum Reaktionsansatz verhindert sowohl die Autophosphorylierung als auch die transiente Phosphorylierung des Enzyms (Kap. 7.2.1, Abb. 7.3). Die Analyse der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung des unter Pulse-Chase-Bedingungen phosphorylierten Enzyms demonstriert, daß von der transienten Phosphorylierung ausschließlich Tyrosinphosphatreste betroffen sind (Kap. 7.2.2.1, Abb. 7.7). Dabei zeigt sich in der Phosphopeptidkartierung, daß die beiden C-terminalen Tyrosinreste Tyr<sup>1316</sup> und Tyr<sup>1322</sup> zu den Tyrosinphosphorylierungsstellen der Kinase gehören, die einer transienten Phosphorylierung unterliegen. Die korrespondierenden Peptide verlieren in der Chase-Reaktion Radioaktivität, in der Hotchase-Reaktion wird in diese verstärkt eine Inkorporation von  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-Phosphat}$  erhalten (Kap. 7.2.2.1, Abb. 7.8). Die Daten sind in Einklang mit Beobachtungen von Gruppuso et al. (1992). Bei dem Vergleich der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren einer 48 kDa Kinase und einer C-terminalen Deletionsmutante stellten sie fest, daß im intakten Enzym nach längeren Reaktionszeiten eine Dephosphorylierung erkennbar wird. Allerdings zeigt die Analyse der Pulse-Chase- und Pulse-Hotchase-Reaktionen der IRKD-Y1316/22F und der IRKD-Y1316/22T, daß bei Abwesenheit dieser beiden Tyrosinphosphorylierungsstellen, ebenfalls eine transiente Phosphorylierung zu beobachten ist. Jedoch sind die Effizienz und die Kinetik dieser Reaktionen im Vergleich zur IRKD wesentlich geringer (Kap. 7.2.3, Abb. 7.9). Die Analyse mittels Phosphopeptidkartierung demonstriert hier, daß von der transienten Phosphorylierung Tyrosinreste in der katalytischen Domäne betroffen sind (Kap. 7.2.3, Abb. 7.10). Dieses Ergebnis stimmt mit den Untersuchungen von Heidenreich (1995) und Kayatz (1994) überein, die den humanen Insulinrezeptor unter Pulse-Chase-Bedingungen untersuchten. Die Analyse von BrCN-Fragmenten ergab, daß außer den C-terminalen Tyrosinresten in der  $\beta$ -Untereinheit auch Phosphorylierungsstellen im Juxtamembranbereich und der katalytischen Domäne an der transienten Phosphorylierung beteiligt sind. Demnach scheint die Existenz transients Phosphorylierungsstellen für den erhöhten ATP-Umsatz verantwortlich. Allerdings zeigt sich beim Vergleich der Initialgeschwindigkeiten der Hotchase- bzw. der Chase-Reaktion und der Geschwindigkeit des ATP-Umsatzes eine Diskrepanz: Während der ATP-Umsatz nach der initialen Phase der Reaktion linear mit einer Geschwindigkeit von etwa 60 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> verläuft (Kap. 7.1, Abb. 7.1), ergeben sich sowohl für Hotchase- als auch Chase-Reaktion Geschwindigkeiten von ca. 10-15 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> (Kap. 7.2.2, Abb. 7.5). Folglich kann die beobachtete transiente Phosphorylierung und damit die Existenz einer intrinsischen Phosphataseaktivität des Enzyms nicht alleine für den erhöhten ATP-Umsatz verantwortlich gemacht werden. In diesem Zusammenhang stehen die Untersuchungen von Nölle (1998), der für die IRKD-Y960/1316/22F bezüglich ihrer kinetischen Konstanten, einen vergleichbaren ATP-Umsatz wie für die IRKD beobachtet. Demnach

scheint die Existenz transienter Phosphorylierungsstellen in der Kinase keine unbedingte Voraussetzung für die Bildung von ADP.

Bemerkenswert ist, daß die Fähigkeit spezifisch Tyrosinphosphorylierungsstellen zu de- und rephosphorylieren auch auf die Substratphosphorylierungsreaktion der Kinase übertragen werden kann. Im Fall der kinaseinaktiven IRKD-K1018A (Kap. 7.2.4, Abb. 7.13) und des C-terminalen Fusionsproteins (Kap. 7.3.1, Abb. 7.14) zeigt sich, daß die IRKD in der Lage ist, spezifisch eine transiente Phosphorylierung der Tyrosinphosphorylierungsstellen Tyr<sup>1316</sup> und Tyr<sup>1322</sup> zu katalysieren. Diese Fähigkeit zum Phosphorylaustausch im Substrat findet sich auch in der Phosphorylierung des hIRS-1 p30 unter Pulse-Chase-Bedingungen (Kap. 7.3.2, Abb. 7.16), sie kann aber nicht bei der Substratphosphorylierung des GST-Ex20 oder des GST-JM detektiert werden (Kap. 7.3.1, Abb. 7.15). Bei der Beobachtung der transienten Phosphorylierung in den Substraten ergeben sich einige Gemeinsamkeiten. Zunächst ist festzuhalten, daß ein Phosphorylaustausch in einem Substrat immer an eine aktive Kinase gebunden ist. Die Anwesenheit von Kinaseinhibitoren im Reaktionsansatz der Chase-Reaktion führt stets zu einem Verlust der intrinsischen Phosphatase-Aktivität des Enzyms (Nölle 1998). Weiterhin scheinen von dem Phosphorylaustausch nur Tyrosinphosphorylierungsstellen betroffen zu sein, da nach der Chase-Reaktion keine Zunahme der absoluten Serinphosphatinkorporation im Substrat erhalten wird (Kap. 7.2.4, Abb. 7.11 und Tab. 7.3, Kap. 7.3.1, Kap. 7.3.2, Abb. 7.16 B). Ferner führt die Anwesenheit von hohen Substratkonzentrationen immer zu einem Erliegen oder zu einer Minimierung des Ausmaßes der transienten Phosphorylierung in der Kinase und im Substrat. Im Gegensatz dazu ist in Anwesenheit von Substratkonzentrationen, die in etwa den jeweiligen  $K_m$ -Werten entsprechen, eine transiente Phosphorylierung sowohl in der Kinase als auch im Substrat beobachtbar. Allerdings scheint diese einem gerichteten Prozeß zu unterliegen, da das Ausmaß und die Effizienz des Phosphorylaustausches für die verschiedenen Substrate immer höhere Werte als für die Kinase selbst erreichen (Kap. 7.2.4, Abb. 7.12, Kap. 7.3.1, Abb. 7.14, Kap. 7.3.2, Abb. 7.16). In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß die Kinase die Fähigkeit besitzt in Abhängigkeit von ATP einen Phosphorylaustausch an einem bereits vorphosphoryliertem Substrat zu katalysieren (Kap. 7.3.3). Zu vergleichbaren Ergebnissen kommen Kole et al. (1988), die von einer ADP-unabhängigen Dephosphorylierung phosphorylierter Substrate durch den Insulinrezeptor berichten.

Aus der Beobachtung einer transienten Phosphorylierung in der Auto- und Substratphosphorylierungsreaktionen der IRKD ergibt sich die Frage nach einem Mechanismus, der für die beobachtete Katalyse einer De- und Rephosphorylierung von Tyrosinresten verantwortlich ist. Von mehreren Arbeitsgruppen wurde eine Dephosphorylierung des Insulinrezeptors in Anwesenheit von ADP berichtet (Pike et al. 1986, Argetsinger und Shafer 1992). Diese Möglichkeit konnte auch für eine lösliche Insulinrezeptorkinase aufgezeigt werden (Cobb et al. 1989). Das Phosphoenzym reagiert dabei mit ADP zu ATP und Dephosphoenzym. Die Möglichkeit zur Dephosphorylierung der Kinase in Anwesenheit von ADP in der Chase-Reaktion wird zwar auch für die IRKD beobachtet (Kap. 7.2.1, Abb. 7.4), allerdings kann sie nicht als die alleinige Ursache für die transiente Phosphorylierung verantwortlich gemacht werden. Zunächst ergibt sich, daß bei vergleichbaren ATP-Konzentrationen immer ein höherer Verlust der spezifisch inkorporierten Radioaktivität des phosphorylierten Enzyms erhalten wird. Dabei ist bemerkenswert, daß von dem Verlust der inkorporierten Radioaktivität auch andere Phosphorylierungsstellen im Enzym betroffen sind. Während die Anwesenheit von ADP zu einer Abnahme der inkorporierten Radioaktivität in der katalytischen Domäne führt, wird in Gegenwart von nicht radioaktiv markiertem ATP maßgeblich ein apparenter Verlust der Phosphatinkorporation in den C-terminalen Tyrosinresten beobachtet (Kap. 7.2.2.1, Abb. 7.8). Die Abhängigkeit der transienten Phosphorylierung von ATP wird auch bei der Analyse der Auto- bzw. Substratphosphorylierungsreaktion in Anwesenheit des ATP-regenerierenden Systems deutlich (Kap. 7.2.2, Abb. 7.6, Kap. 7.3.2, Abb. 7.17). Die Aufrechterhaltung der ATP-Konzentration durch die Reaktion des entstandenen ADP mit nichtradioaktiv markiertem Phosphoenolpyruvat und Pyruvatkinase zu ATP führt zu einer permanenten Verdünnung des radioaktiv markierten „ATP-Pools“ und resultiert damit in einer konstanten Abnahme der im Enzym oder Substrat vorhandenen inkorporierten [<sup>32</sup>P]-Phosphorylgruppen. Gegen die einfache Rückreaktion sprechen auch die Untersuchungen zum ATP-Umsatz der Reaktion. Die Rückreaktion sollte nach dem Massenwirkungsgesetz zu einem Fließgleichgewicht (*steady state*) führen, bei dem die Konzentrationen von Phosphoenzym, ADP, ATP und

Dephosphoenzym konstante Werte erreichen. Dieser Umstand wird aber bei der Analyse des ATP-Umsatzes nicht beobachtet (Kap. 7.1, Abb. 7.1) auch dann nicht, wenn geringere ATP-Konzentrationen verwendet werden (Nölle 1998). Immer wird eine konstante ADP-Bildung bei gleichbleibendem Phosphorylierungsstatus der Kinase beobachtet. Erst lange Reaktionszeiten führen zu einer Abnahme der Phosphatinkorporation in der Kinase. Dabei zeigt die Nukleotidanalyse, daß in diesem Fall das im Reaktionsansatz vorhandene ATP vollständig zu ADP umgewandelt worden ist (Al-Hasani 1995, Nölle 1998). Zu vergleichbaren Ergebnissen kommen Gruppuso et al. (1992), welche eine Dephosphorylierung einer löslichen Kinase erst nach vollständigem Verbrauch des im Reaktionsansatz enthaltenen ATP beobachten. Dabei ist bemerkenswert, daß sie in diesem Fall in NMR-spektroskopischen Untersuchungen nicht die Neubildung von ATP beobachten. Die Autoren spekulieren daher über eine möglicherweise allosterische Aktivierung der Dephosphorylierung in Anwesenheit von ADP.

Die Beobachtung einer ADP-unabhängigen Phosphataseaktivität der IRKD und einer vergleichbaren Geschwindigkeit des ATP-Umsatzes in der initialen Phase der Substrat- und der Autophosphorylierungsreaktion der IRKD-HIS (Al-Hasani et al. 1994) spricht hypothetisch für einen katalytischen Mechanismus, bei welchem zunächst, in einem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, die Aktivierung des ATP erfolgt und die  $\gamma$ -Phosphorylgruppe auf das Enzym transient übertragen wird. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung unterstützt, daß nach Austausch der transienten Phosphorylierungsstellen im C-Terminus der Kinase IRKD-Y1316/22F eine vergleichbare Geschwindigkeit im ATP-Umsatz wie für die IRKD erhalten wird (Nölle 1998). Im weiteren Verlauf der Reaktion kommt es dann zur Übertragung des Phosphorylrestes auf ein anwesendes Substrat (exogenes oder Enzymsubstrat) oder zu einer Übertragung auf Wasser. Dieses impliziert die Existenz einer transienten Bindungsstelle für Phosphorylgruppen im Enzym. Dementsprechend sollten Tyrosinreste im Enzym oder im Substrat, die über einen ausreichend hohen Energiegehalt verfügen, nach dem allgemeingültigen Prinzip der Mikroreversibilität von enzymkatalysierten Prozessen auf diese Bindungsstelle übertragen werden können. In der Literatur werden zahlreiche Beispiele beschrieben, die zeigen, daß Tyrosinphosphate als intermediäre Phosphodonatoren dienen können (Fukami und Lipman 1983, Hubler et al. 1989, Kole et al. 1988, Gruppuso et al. 1992, Ikebe und Hartshorne 1986). Untersuchungen von Argetsinger und Shafer (1992) belegen, daß im Insulinrezeptor „reversible“ und „irreversible“ Autophosphorylierungsstellen vorhanden sind, die unterschiedliche freie Reaktionsenthalpien in der Phosphoester-Bindung besitzen. Den Untersuchungen zufolge unterschieden sich dabei die reversiblen Phosphorylierungsstellen nur um 5,4 kJ/mol von der freien Energie der  $\gamma$ -Phosphatbindung des ATP. Für die Hydrolyse dieser Bindung im ATP werden  $\Delta G^\circ$ -Werte von 29,3 kJ/mol bis 46 kJ/mol angegeben (George et al. 1970, De Meis 1993).

Die Diskrepanz in den Initialgeschwindigkeiten der Phosphorylierung (Pulse) und Rephosphorylierung (Chase- bzw. Hotchase-Reaktion) zeigt, daß die beobachtete transiente Phosphorylierung eine gerichtete Reaktion darstellt; die Phosphorylierung ist der apparenten Rephosphorylierung immer bevorzugt. Dieser Umstand könnte mit unterschiedlichen  $\Delta G^\circ$ -Werten für die ATP- und Tyrosinphosphathydrolyse erklärt werden, welche möglicherweise in einer anderen Affinität der unphosphorylierten Akzeptorstellen gegenüber bereits phosphorylierten Akzeptorstellen begründet ist. Möglicherweise sind aber auch vorhergehende Konformationsänderungen in der Kinase als Voraussetzung für einen effektiven Zugang der phosphorylierten Tyrosinreste des Enzyms zu der postulierten Transferstelle von Bedeutung. In diesem Zusammenhang steht die Beobachtung, daß in Anwesenheit von exogenen Phosphorylakzeptorstellen immer eine gerichtete transiente Phosphorylierung zu beobachten ist, deren Effizienz im Substrat immer höhere Werte als in der Kinase selbst erreicht (Kap. 7.2.4, Abb. 7.12, Kap. 7.3.1, Abb. 7.14, Kap. 7.3.2, Abb. 7.16). Demnach ergibt sich eine Konkurrenzreaktion zwischen den transienten Phosphorylierungsstellen im Substrat und Enzym. Der Umstand einer Bevorzugung der Phosphorylierungsreaktion gegenüber der apparenten Dephosphorylierung drückt sich auch in der Tatsache aus, daß in Anwesenheit von Substratkonzentrationen, die etwa dem 5-10fachen des jeweiligen  $K_m$ -Wertes entsprechen, keine oder nur eine verminderte transiente Phosphorylierung im Substrat bzw. der Kinase stattfindet (Kap. 7.3.1, Abb. 7.14, Abb. 7.15, Kap. 7.3.2, Abb. 7.16). Demnach wird nach dem Massenwirkungsgesetz durch Erhöhung der Phosphorylakzeptorstellen die Reaktion auf die Seite der Phosphorylierung verlagert.

Formal gehorcht die Phosphorylierungsreaktion der IRKD einer Bisubstratkinetik, bei der die beiden Substrate ATP und Enzymsubstrat oder im Falle einer Substratphosphorylierungsreaktion ATP und Substrat, zu ADP und Phospho-Enzymsubstrat bzw. Phospho-Substrat umgesetzt werden. Die Katalyse kann dabei grundsätzlich drei Enzymmechanismen folgen (Fromm 1979):

1. Geordnete Bi-Bi Reaktion: ATP und Substrat binden in festgelegter Reihenfolge an das aktive Zentrum, bilden den ternären Komplex und verlassen nach der Reaktion das katalytische Zentrum in geordneter Reihenfolge.
2. Random Bi-Bi Reaktion: Bindung und Dissoziation der beiden Reaktanden sind zufällig, es kommt aber ebenfalls zu einer Bildung des ternären Komplexes.
3. Ping-Pong Reaktion: Die  $\gamma$ -Phosphorylgruppe des ATP wird transient auf das Enzym übertragen. Nach der Dissoziation des gebildeten ADP erfolgt die Bindung des Phosphorylakzeptors, welcher anschließend die Phosphorylgruppe erhält.

Die bisherigen kinetische Untersuchungen zum Mechanismus der Insulinrezeptorkinase deuten auf einen Random Bi-Bi Mechanismus (Walker et al. 1987, Vicario et al. 1988, Shoelson et al. 1992), Danach scheint ein über ein Phosphoenzymintermediat vermittelter Prozeß ausgeschlossen. Allerdings muß berücksichtigt werden, daß alle Autoren bei der Betrachtung des katalytischen Mechanismus kurze, synthetische Peptidsubstrate verwenden. Aus der Beobachtung, daß solche kleinen Substrate wesentlich schlechtere Phosphorylakzeptoren als z. B. die aus dem Insulinrezeptor abgeleiteten Fusionsproteine darstellen (Kap. 8.2.3), ergibt sich möglicherweise generell die Bevorzugung einer Phosphorylierung gegenüber der Rückreaktion, die thermodynamisch ausschließlich in der geringeren Affinität und damit in einer schlechteren Phosphorylierbarkeit begründet sein könnte. Die vorliegende Kristallstruktur der phosphorylierten Kinasedomäne gibt keinen Aufschluß über den Mechanismus der Phosphotransferasereaktion (Hubbard 1997). In dieser Struktur ist das  $\gamma$ -Phosphorylatom des ATP-Analog AMP-PNP 5,0 Å von der Hydroxylgruppe des Tyrosinrestes eines Peptidsubstrates entfernt und damit nicht in der Position für einen direkten „*in line*-Angriff“ positioniert. Ein solcher Mechanismus wird für die cAMP abhängigen Proteinkinase (PKA) postuliert (Madhusudan et al. 1994). Detaillierte Studien zeigen in diesem Fall, daß eine katalytische Base das Proton der Hydroxylgruppe des Phosphatakzeptors in der Polypeptidkette des Substrates abstrahiert und somit ein Nukleophil erzeugt (Zheng et al. 1993, Bossemeyer et al. 1993). Für einen produktiven Phosphattransfer wird es dann so positioniert, daß ein „*in-line*-Angriff“ auf die  $\gamma$ -Phosphorylgruppe des Phosphodonors ATP erfolgen kann. Dabei sollen Bindung und Deprotonierung des Substrates gleichzeitig verlaufen (Yoon und Cook 1987). Hubbard (1997) erklärt den Unterschied mit einer möglicherweise anderen Positionierung des ATP-Analogons in der ATP-Bindungstasche des Enzyms. Allerdings zeigen sich unter der Verwendung von ATP oder AMP-PNP in der Kristallisation des ternären Komplexes der PKA keine signifikanten Unterschiede (Zheng et al. 1993, Bossemeyer et al. 1993). Dennoch postuliert Hubbard (1997) einen vergleichbaren katalytischen Mechanismus wie für die Serin/Threoninkinase. Diese Erkenntnisse beruhen aber alleine auf dem Vergleich der Röntgenstrukturanalysen und den Sequenzvergleichen zwischen den Vertretern der beiden Kinasefamilien. Daher ist die vorliegende Kristallstruktur kein Argument für Nichtexistenz einer Phosphotransferstelle im Enzym.

Die Phosphoesterbindung im Phosphotyrosin ist außerordentlich stabil. Die Hydrolyse der Bindung erfordert einen enzymkatalysierten, nukleophilen Angriff auf das Phosphoratom. Für Protein-Tyrosinphosphatasen konnte demonstriert werden, daß die Dephosphorylierung über einen Cysteinrest im Enzym katalysiert wird (Guan und Dixon 1990). Dieses Cystein stellt ein echtes Phosphoenzymintermediat dar (Guan und Dixon 1991). Die strukturelle Grundlage für die Hydrolyse der Phosphoesterbindung ist das Motiv Cys(x)<sub>5</sub>Arg (Zhang et al. 1994), wobei ein dem Cystein benachbartes Histidin ein entstehendes Thiolat-Anion stabilisieren kann. Die Guanidinium-Gruppe des Arginins koordiniert dabei die Phosphorylgruppe des Tyrosinrestes, so daß ein *in-line* Angriff des Thiolat-Anions auf das Phosphor-Atom in einem pentakovalenten Übergangszustand erfolgt (Zhang et al.

1994). Im cytoplasmatischen Anteil des Insulinrezeptors finden sich ebenfalls zwei Cysteine in direkter Nachbarschaft von Histidin und Argininresten, die dem beschriebenen strukturellen Phosphatase-Motiv sehr ähnlich sind. Allerdings zeigte der Austausch der beiden Cysteine gegen Serin oder Threonin in der löslichen Insulinrezeptorkinase keinen Effekt auf die transiente Phosphorylierung dieser Enzyme (Behle 1997, Nölle 1998). Daher scheint die katalytische Aktivität, auf welche die transiente Phosphorylierung beruht, in einem anderen strukturellen Motiv manifestiert zu sein. Die Beobachtung, daß eine N- und C-terminale Deletionsmutante der IRKD einen erhöhten ATP-Umsatz zeigt (Wei et al. 1995, N. Keane, persönliche Mitteilung), grenzt den Ort des Motivs auf die katalytische Domäne des Enzyms ein. Dies wird durch Untersuchungen von Wieber (1998) bestätigt, der eine transiente Phosphorylierung exogener Substrate mit einer C-terminalen Deletionsmutante der IRKD beobachten kann.

### 8.3 Die duale Aktivität der löslichen Insulinrezeptorkinase

#### 8.3.1 Allgemeine Charakterisierung der Serinphosphorylierung

In Analogie zum gereinigten Insulinrezeptor aus Humanplazenta und der löslichen Kinase IRKD-HIS zeigt die IRKD in der Autophosphorylierungsreaktion die Phosphatinkorporation sowohl in Tyrosin- als auch in Serinreste des Enzyms (Kap. 5.2, Abb. 5.1). Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Baltensperger et al. 1992, Lewis et al. 1990a, Heidenreich et al. 1994, Al-Hasani 1995 und Tauer et al. 1997 können dieser Serinphosphorylierung Eigenschaften zugeschrieben werden, die auf eine intrinsische Aktivität und nicht auf eine assoziierte Serinkinase hindeuten.

Der aus Plazentamembranen durch Insulinaffinitäts-, WGA-Chromatographie und nachfolgender Saccharose-Dichtezentrifugation gereinigte humane Insulinrezeptor inkorporiert in der Autophosphorylierungsreaktion nach Insulinstimulation ca. 1 Mol Phosphat pro Mol  $\beta$ -Untereinheit in Serinreste (Heidenreich 1995). Der Phosphoserinanteil in der Poly(Lysin) stimulierten löslichen Kinase IRKD ist damit direkt vergleichbar (Kap. 5.3, Abb. 5.5 A). Dabei ist zu bemerken, daß Serinphosphorylierung in der löslichen Kinase in sehr geringem Maße auch unabhängig von der Stimulierung durch Poly(Lysin) auftritt (Kap. 5.3, Abb. 5.5 B). Die unterschiedlichen Reinigungswege von Insulinrezeptor und löslicher Kinase machen die Wahrscheinlichkeit eine exogene Serinkinase um den gleichen Faktor anzureichern kaum möglich. Allerdings könnte eine exogene Serinkinase trotz stringenter Bedingungen in der Reinigung eine starke Assoziation mit der IRKD und dem Insulinrezeptor eingehen. Asamoah et al. (1995) und Carter et al. (1995) berichten von der Reinigung einer dem Insulinrezeptor assoziierten Serinkinase aus Humanplazenta. Dabei schreiben sie diesem 41 kDa großen Enzym die Fähigkeit zu, die Serinphosphorylierung von *Myelin Basic Protein* und von einem, aus der Aminosäuresequenz der  $\beta$ -Untereinheit abgeleiteten, synthetischen Peptid mit dem darin enthaltenen Serinrest 1078 zu katalysieren. Allerdings konnten diese Ergebnisse in unserer Arbeitsgruppe trotz vergleichbarer Aufreinigung des Insulinrezeptors nicht bestätigt werden (Kap. 6.4.5). Gegen eine assoziierte exogene Serinkinaseaktivität spricht, daß die Überexpression der IRKD im Baculo-Expressionssystem nicht zu einer anderen Stöchiometrie der Serin- und Tyrosinphosphorylierung der Kinase im Vergleich zum Insulinrezeptor führt. Die Aufarbeitung von drei Plazentamembranen ergibt in der Regel etwa 50  $\mu$ g Rezeptor mit einer Ausbeute von 6-7 % (Mölders 1991, Walter 1992, Paduschek 1992, Kayatz 1994, Heidenreich 1995). Demnach enthalten die Membranen etwa 0,8 mg Rezeptorprotein, entsprechend einem Anteil von 0,08 %. Im Gegensatz dazu enthalten infizierte Sf9-Zellen zum Zeitpunkt der Zellernte die lösliche Kinase zu etwa 5 %. Von der Annahme ausgehend, daß  $1 \times 10^8$  Sf9-Zellen ca. 1 mg IRKD enthalten, errechnen sich etwa  $1 \times 10^7$  Kinasemoleküle pro Zelle. Für den Insulinrezeptor wurden dagegen Zelldichten von  $2-3 \times 10^5$  Rezeptoren ermittelt (Ginsberg 1977). Da eine exogene Serinkinase im Baculosystem nicht überexprimiert wird, sollte daher aufgrund der Molekülanzahl die Serinphosphorylierung der löslichen Kinase eine viel geringere Stöchiometrie besitzen.

Die beobachtete Serinphosphorylierung ist direkt abhängig von der Phosphotransferaseaktivität der Kinase. Die Anwesenheit von Inhibitoren wie AMP-PNP, EDTA oder Staurosporin in der Autophosphorylierungsreaktion des Insulinrezeptors oder der löslichen Kinase IRKD-HIS führen in gleichem

Maße sowohl zur Inhibition der Tyrosin- als auch der Serinphosphorylierung (Heidenreich 1995, Al-Hasani 1995). Zudem ist im Fall des Insulinrezeptors Serin- und Tyrosinphosphorylierung abhängig von der Insulinstimulation. Das Hormon bewirkt eine fünffache Steigerung der Serinphosphorylierung gegenüber dem basalen Wert (Heidenreich et al. 1994). Der Austausch des Lysinrestes in Position 1018 gegen Alanin in der IRKD-K1018A, welcher beim Insulinrezeptor die ATP-Bindung verhindert und damit zur Inaktivierung der Kinase führt (Chou et al. 1987, Ebina et al. 1987, Mc Clain et al. 1987), bewirkt denselben Effekt in der IRKD-K1018A (Kap. 5.2, Abb. 5.1 A). Im Rahmen einer Diplomarbeit wurde die kinaseinaktive Variante IRKD-D1120A konstruiert (Keßler 1998). Die Substitution der katalytischen Base Aspartat Asp<sup>1120</sup> gegen Alanin erlaubt noch die Bindung von ATP, unterbindet aber die Fähigkeit zur Hydrolyse der  $\gamma$ -Phosphoanhydridbindung des Moleküls. In beiden Fällen belegt die fehlende Phosphatinkorporation in der Autophosphorylierungsreaktion die Abwesenheit einer exogenen Serin/Threonin- oder Tyrosin-Kinaseaktivität in der gereinigten Enzymfraktion. Allerdings könnte argumentiert werden, daß eine exogene Serinkinase eine Aktivierung durch Tyrosinphosphorylierung benötigt oder nur nach Bindung an eine Tyrosin-phosphorylierte Kinase wirksam werden kann. Für eine Interaktion der Rezeptorkinase mit exogenen Molekülen sind die Tyrosinphosphorylierungsstellen im N-Terminus (Tyr<sup>960</sup>), in der katalytischen (Tyr<sup>1146</sup>) und in der C-terminalen Domäne (Tyr<sup>1316</sup> und Tyr<sup>1322</sup>) präferenziert (Einleitung). Die Substitution dieser Phosphorylierungsstellen gegen Phenylalanin (IRKD-Y1316/22F Kap. 5.2, Abb. 5.2 B, IRKD-Y960/1316/22F Abb. 5.2 C, IRKD-Y1146F, Nölle 1998) führt jedoch in keinem Fall zu einem Verlust der Serinphosphorylierung im Enzym. Im Gegensatz dazu berichtet Nölle (1998) von einer starken Beeinträchtigung der Serinphosphorylierung in einer löslichen Kinase, in welcher der Tyrosinrest Tyr<sup>1151</sup> gegen Phenylalanin ersetzt wurde. Das Enzym besitzt dieselben Reinigungsdaten wie die IRKD, ist in der Lage die noch vorhandenen Tyrosinphosphorylierungsstellen zu besetzen und katalysiert die Tyrosinphosphorylierung in exogenen Substraten. Das Phosphorylierungsverhalten dieser Kinasevariante ist daher ein weiteres Argument für die Abwesenheit einer exogenen Serinkinase in der gereinigten Enzymfraktion.

Die Analyse der Serinphosphorylierung der löslichen Kinase in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen demonstriert, daß maximale Autophosphorylierungsaktivität immer auch zu einer maximalen Phosphorylierung von Serinresten in der Kinase führt (Kap. 5.2.1). Folglich ist es nicht möglich, die Serinkinaseaktivität von der Tyrosinkinaseaktivität der IRKD zu trennen. Dies unterstützt die Hypothese, daß Serin- und Tyrosinphosphorylierung auf einem gemeinsamen, enzymkatalysierten Mechanismus basieren. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß die duale Kinaseaktivität von der verwendeten Metallionensorte abhängig zu sein scheint (Kap. 5.2.1, Abb. 5.4). Über ein ähnliches Phänomen wurde bei der Phosphorylase-Kinase (Yuan et al. 1993) und der Caseinkinase II aus Hefe (*Yarrowia lipolytica*, Chardot et al. 1995) berichtet. In beiden Fällen führt Magnesium zu einer verstärkten Phosphotransferaseaktivität auf Serinreste, während Mangan eine bevorzugte Tyrosinphosphorylierung bewirkt. Mutationsanalysen der Phosphorylase-Kinase von Chi-Ying et al. (1994) belegen, daß die Bindung der beiden Metallionen zu unterschiedlichen Konformationsänderungen im katalytischen Zentrum des Enzyms führen. Möglicherweise ergeben sich für die IRKD ähnliche Effekte.

Neben einer vergleichbaren Stöchiometrie von Insulinrezeptor und löslicher Kinase ergeben sich auch übereinstimmende kinetische Eigenschaften. In beiden Fällen folgt die Serin- der Tyrosinphosphorylierung zeitlich nach (Heidenreich et al. 1994, Kap. 5.3, Abb. 5.5 A). Für die Serinphosphorylierung der löslichen Kinase ergibt sich eine Initialgeschwindigkeit von  $3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  und eine Halbwertszeit von 5 Minuten. Vergleichbare Werte werden für die Serinphosphorylierung der Kinasen IRKD-Y1316/22F und IRKD-Y960/1316/22F erhalten (Kap. 5.3, Tab. 5.1). Nach einer Reaktionszeit von 20 Minuten werden, gemessen an der Gesamtposphorylierung, 28 % Phosphoserin in der IRKD, 38 % in der IRKD-Y1316/22F und 42 % in der IRKD-Y960/1316/22F detektiert. Aus den relativen Anteilen ergeben sich spezifische Phosphateinbauraten von 1,2 mol/mol für die IRKD, 1,1 mol/mol für die IRKD-Y1316/22F und 0,85 mol/mol für die IRKD-Y960/1316/22F. Die Analyse zeigt, daß die Serinphosphorylierung in den Mutanten unabhängig von den eingeführten Substitutionen ist. Folglich liegt für alle Enzyme in Bezug auf die Serinphosphorylierung ein gemeinsamer katalytischer Mechanismus zu Grunde. Im Gegensatz dazu wird nach Autophosphorylierung der IRKD-Y1316/22T keine

Serinphosphorylierung detektiert. Das Enzym zeigt im Vergleich zur IRKD-Y1316/22F eine wesentlich langsamere Initialgeschwindigkeit in der Autophosphorylierung (Kap. 5.3, Tab. 5.1). Weiterhin ergeben sich in der Gegenüberstellung zu den, zur Serinphosphorylierung befähigten Kinasen Unterschiede in der Besetzung der Tyrosinphosphorylierungsstellen in der katalytischen Domäne (Kap. 5.4.2, Abb. 5.6). Diese Differenzen müssen alleine aufgrund der eingefügten Mutationen erklärt werden. Aus der Beobachtung einer Änderung der hydrodynamischen Eigenschaften dieses Moleküls in der Gelfiltration kann abgeleitet werden, daß die aromatischen Aminosäuren im C-Terminus einen Beitrag für die Stabilität der Tertiärstruktur leisten müssen (Kap. 4.1, Abb. 4.2). Die weniger kompakte Struktur der IRKD-Y1316/22T deutet darauf hin, daß der C-Terminus, welchem eine regulatorische Funktion bei der Autophosphorylierung und der Substratphosphorylierung zugeschrieben wird (Gual. et al. 1996, Kap. 8.3), seine modulatorischen Eigenschaften weniger entfalten kann. Somit wird die optimale Kinaseaktivität in der Autophosphorylierung und folglich auch die Serinphosphorylierung beeinträchtigt.

Die beschriebene Serinphosphorylierung beruht maßgeblich auf der Besetzung der beiden Serinreste Ser<sup>1275</sup> und Ser<sup>1309</sup> im C-Terminus der Kinase, welche durch direkte Sequenzierung tryptischer Phosphopeptide einer autophosphorylierten löslichen Kinase (IRKD-HIS) identifiziert werden konnten (Al-Hasani et al. 1997). Der Vergleich der korrespondierenden Chromatogramme der IRKD-HIS, der IRKD, der IRKD-Y1316/22F, der IRKD-Y960/1316/22F und des Insulinrezeptors nach Autophosphorylierungsreaktionen *in vitro* zeigt, daß in allen Fällen die beobachtete Serinphosphorylierung auf die Besetzung dieser C-terminalen Phosphorylierungsstellen zurückgeführt werden kann (Kap. 5.4.2, Abb. 5.6., Kap. 5.4.4, Abb. 5.8). Interessanterweise berichten Ahn et al. (1993) ebenfalls von einer Phosphorylierung des Serinrestes Ser<sup>1275</sup> einer löslichen Kinase, schreiben diese Phosphorylierung aber einer exogenen Serinkinase zu. Andere Autoren, welche die beobachtete Serinphosphorylierung ebenfalls auf eine intrinsische Aktivität zurückführen, lokalisierten mögliche Phosphorylierungsstellen ebenfalls in der C-terminalen Domäne (Baltensperger et al. 1992, Lewis et al. 1990). Baltensperger et al. (1992) beschrieben die beiden Serinreste Ser<sup>1293</sup> und/oder Ser<sup>1294</sup> als Phosphorylierungsstellen im Enzym. Ihre Analyse beruhte auf dem Vergleich der Retentionszeiten von synthetischen Phosphopeptiden mit radioaktiv markierten tryptischen Phosphopeptiden des Insulinrezeptors nach Autophosphorylierung *in vitro* und anschließender zweidimensionaler Elektrophorese. Im Gegensatz dazu identifizierten Lewis et al. (1990) zwei an Serinresten phosphorylierte, tryptische Peptide einer löslichen Insulinrezeptorkinase. Nach Deletion von 72 Aminosäuren des C-Terminus konnten sie diese Peptide nicht mehr erhalten. Allerdings scheinen noch weitere Serinphosphorylierungsstellen im Molekül enthalten zu sein. Wieber (1998) beobachtet in einer C-terminalen Deletionsmutante noch einen geringen Anteil an Serinphosphorylierung, die möglicherweise im Juxtamembrananteil der Kinase lokalisiert ist. Einen Hinweis auf das Vorhandensein weiterer Serinautophosphorylierungsstellen in dieser Region wird auch durch die Analyse von Bromcyan-Fragmenten des humanen Insulinrezeptors belegt (Heidenreich 1995, Magg 1994, Kayatz 1994). Dabei könnte es sich um die Phosphorylierung des Serinrestes Ser<sup>994</sup> handeln (Nölle 1998).

Durch die Methode der Phosphopeptidkartierung können die beiden *in vitro* identifizierten Serinphosphorylierungsstellen Ser<sup>1275</sup> und Ser<sup>1309</sup> auch im Insulinrezeptor nach Autophosphorylierung *in situ* nachgewiesen werden. Nach Insulinstimulation führt die Autophosphorylierung *in situ* zu einem Anstieg der Tyrosin- und Serinphosphorylierung in den, aus den verwendeten Zell-Linien CHO800 und A14 isolierten,  $\beta$ -Untereinheiten. In beiden Fällen werden trotz der unterschiedlichen Zelltypen und der verschiedenen, verwendeten Antikörper (Nager- und humane Zell-Linie) nur geringe Abweichungen in den prozentualen Anteilen der Serinphosphorylierung erhalten (Kap. 5.4.4, Abb. 5.9). In beiden Fällen ist die Phosphorylierung der Serinreste Ser<sup>1275</sup> und Ser<sup>1309</sup> nachweisbar (Kap. 5.4.4, Abb. 5.10). Zusammen mit den Erkenntnissen der *in vitro* Untersuchungen muß daher gefolgert werden, daß die Phosphorylierung der Serinreste Ser<sup>1275</sup> und Ser<sup>1309</sup> auf eine intrinsische Serinkinaseaktivität des Insulinrezeptors zurückzuführen ist. Die Analyse der isolierten  $\beta$ -Untereinheiten aus den Kontrollzellen zeigt, daß der nicht insulinstimulierte Rezeptor bereits einen hohen Anteil an Phosphoserin enthält. Leider war es nicht möglich, genügend Rezeptormaterial aus nicht stimulierten Zellen zu erhalten, um die Identität der Serinphosphorylierungsstellen durch Phosphopeptidkartierung zu überprüfen. Diese Beobachtung bedarf weiterer Untersuchung, letztendlich zeigt aber die Identifizierung

der beiden Serinautophosphorylierungsstellen nach Insulinstimulation, daß der Serinphosphorylierung auch in der Zelle eine biologische Relevanz beigemessen werden muß.

Der eindrucksvollste Beweis, daß die Insulinrezeptorkinase in die Klasse der Kinasen mit dualer Spezifität eingeordnet werden muß, ist der Nachweis der enzymkatalysierten Serinphosphorylierung exogener Substrate. Nach Lindberg (1992) sind dualspezifische Kinasen Enzyme, die exogene Substrate sowohl an Tyrosin- als auch an Serin/Threoninresten phosphorylieren können. Erst diese Eigenschaft demonstriert, daß diese Phosphorylierungen an einen enzymatischen Mechanismus gekoppelt sind. In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß die lösliche Kinase in der Lage ist, spezifisch die beiden identifizierten Serinreste Ser<sup>1275</sup> und Ser<sup>1309</sup> in dem aus dem C-Terminus abgeleiteten Fusionsprotein GST-CT (Kap. 6.4.1, Abb. 6.7) und in der kinaseinaktiven Variante IRKD-K1018A (Kap. 5.4.5, Abb. 5.12) zu phosphorylieren. Dies konnte auch in der Substratphosphorylierungsreaktion der IRKD-D1120A demonstriert werden (Kessler 1998). Demnach ist für die beobachtete Serinautophosphorylierung des Insulinrezeptors oder der löslichen Kinasen ein *trans*-Phosphorylierungsmechanismus sowohl für die Besetzung der Tyrosin- als auch der Serinreste möglich. Bestätigt wird das Modell durch die Untersuchungen des CTphe-Fusionsproteins, welches nur noch die beiden Serinphosphorylierungsstellen Ser<sup>1275</sup> und Ser<sup>1309</sup> enthält. Das Substrat wird von der IRKD erkannt und sehr effizient an den beiden enthaltenen Serinresten phosphoryliert (Kap. 6.4.2, Abb. 6.11). Die exogene Serinphosphorylierung ist auch auf die rekombinanten Fragmente der natürlichen Substrate hIRS-1 p30 (Kap. 6.4.3) und Gab-1 (Kap. 6.4.4) des Insulinrezeptors übertragbar; in diesen Substraten konnte zudem eine signifikante Threoninphosphorylierung nachgewiesen werden. Die beobachtete Phosphorylierung der exogenen Substrate zeigt in allen Fällen folgende Gemeinsamkeiten: (1) Hohe Substratkonzentrationen bewirken bei der Betrachtung der absoluten Phosphatinkorporation immer eine Verteilung zu Gunsten der Tyrosinphosphorylierung; (2) die Serinphosphorylierung der exogenen Substrate ist, wie in der Autophosphorylierungsreaktion, der Besetzung der Tyrosinreste zeitlich nachgeschaltet; (3) die Initialgeschwindigkeiten der Serinphosphorylierung sind immer deutlich niedriger als die vergleichbaren der Tyrosinphosphorylierung und (4) hohe Substratkonzentrationen führen zu einer Hemmung der Serinautophosphorylierung der Kinase. Die Beobachtung einer Verteilung der Phosphatinkorporation zu Gunsten der Tyrosinphosphorylierung im Substrat in Anwesenheit hoher Substratkonzentrationen ist ein weiteres Argument gegen die Anwesenheit einer exogenen Serinkinaseaktivität im Reaktionsansatz. Unter der Annahme, daß eine Tyrosinphosphorylierung im Substrat eine Voraussetzung für die Aktivität einer solchen Kinase darstellt, sollte bei der Anwesenheit eines solchen Enzyms bei jeder Konzentration ein vergleichbares Verhältnis von Phosphotyrosin zu Phosphoserin erhalten werden.

### 8.3.2 Mechanistische Aspekte zur dualen Aktivität der Insulinrezeptorkinase

Eine Vielzahl von Untersuchungen belegt, daß eine Serinphosphorylierung des Insulinrezeptors durch exogene Serinkinasen nicht ausgeschlossen werden kann (Einleitung). Dennoch liefern die im vorangehenden Kapitel aufgeführten Eigenschaften der Insulinrezeptorkinase eindeutige Hinweise, daß das Enzym auch eine intrinsische Serinkinaseaktivität besitzt. Aus diesen Beobachtungen ergibt sich damit die Frage nach einem katalytischen Mechanismus, der die duale Spezifität dieser Kinase erklärt. Die strukturellen Voraussetzungen eines katalytischen Zentrums für einen Phosphotransfer auf Serin/Threonin oder Tyrosin sollten sehr verschieden sein. Die Analyse der Substratspezifität der Insulinrezeptorkinase mit synthetischen Peptiden zeigt, daß die Kinase Substrate bevorzugt, in denen ein oder zwei saure Aminosäurereste der Tyrosinphosphorylierungsstelle voranstehen, welcher ein oder mehrere hydrophobe Aminosäuren folgen (Shoelson et al. 1992, Songyang et al. 1995). Diese Aussage läßt sich mit der vorliegenden Kristallstruktur der Insulinrezeptorkinasedomäne in Übereinstimmung bringen (Hubbard 1997). Neben verschiedenen basischen Aminosäureseitenketten im N-terminalen „Loop“ (Lys<sup>1073</sup>, Arg<sup>1077</sup> und Lys<sup>1080</sup>) finden sich einige hydrophobe Seitenketten im C-terminalen „Loop“ (Val<sup>1161</sup> und Leu<sup>1207</sup>), die ein Substrat mit den beschriebenen Eigenschaften durch Wasserstoffbrücken und hydrophoben Wechselwirkungen stabilisieren können. Im Vergleich dazu ist z. B. das aktive Zentrum der Serin/Threoninkinase PKA (Einleitung) durch viele negativ geladene Aminosäureseitenketten geprägt, so daß aliphatische Aminosäuren in Nachbarschaft positiv

geladener Seitenketten bevorzugt werden (Taylor et al. 1995). Weitere Unterschiede ergeben sich in der Konformation des „P+1-Loop“ und des katalytischen „Loop“, in letzterem findet sich hier bei der Serin/Threoninkinase ein konservierter Lysin-, in der Tyrosinkinase ein Argininrest. Allerdings bleibt zweifelhaft, ob diese Differenzen generell für eine unterschiedliche Substratspezifität verantwortlich gemacht werden können. Zunächst zeigt sich, daß in beiden Fällen die auf Substratebene aufgezeigten Konsensussequenzen keine generelle Gültigkeit besitzen, da auch Phosphorylakzeptoren in Nachbarschaft anderer Aminosäurereste erkannt und phosphoryliert werden können (Shoelson et al. 1992, Songyang et al. 1995, Lee et al. 1994).

Weiterhin belegen die Untersuchungen zur Substratspezifität der PKA und der Tyrosinkinase Src pp60<sup>c-src</sup> von Lee et al. (1994 und 1995), daß sowohl die Serin/Threoninkinase als auch die Tyrosinkinase die Fähigkeit besitzt, kurze synthetische Peptide an aromatischen und aliphatischen Aminosäuren zu erkennen und zu phosphorylieren. Zur Begründung dieser multiplen Spezifität schlägt der Autor zwei Modelle vor. Das eine Modell geht von einem sehr flexiblen aktiven Zentrum aus, welches in der Lage ist, unterschiedliche Konformationen einzugehen und somit entweder den Zugang für die lange Seitenkette des Tyrosinrestes oder die kleine Seitenkette des aliphatischen Aminosäurerestes ermöglicht. Untersuchungen mit konformationssensitiven Antikörpern zeigen, daß sich auch in der katalytischen Domäne der Insulinrezeptorkinase eine hohe Beweglichkeit findet (Herrera und Rosen 1986). Möglicherweise ergeben sich auch vollkommen andere strukturelle Verhältnisse nach der Besetzung von nur einer oder zwei Tyrosinphosphorylierungsstellen im Aktivierungs-„Loop“ der Kinase. Studien über den *in situ* Phosphorylierungsstatus der Kinase zeigen, daß nur zwei der drei Tyrosinreste phosphoryliert sind (White 1998). Allerdings sprechen gegen das Modell eines flexiblen aktiven Zentrums die Unterschiede in den  $k_{\text{cat}}/K_m$ -Werten der untersuchten Substrate der pp60<sup>c-src</sup>-Kinase (Lee et al. 1994 und 1995), die vor allem in verschiedenen  $V_{\text{max}}$ -Werten begründet sind. Die Autoren schlagen daher ein erweitertes Modell vor, welches von einem starren aktiven Zentrum ausgeht. Hierbei sollte ein Substrat die Möglichkeit besitzen, verschiedene Positionen auf der Enzymoberfläche einzunehmen. Für diese Positionierung ist demnach nicht die Länge der zu phosphorylierenden Seitenkette entscheidend, sondern vielmehr die sie umgebende Polypeptidkette. Das Modell impliziert, daß ein Substrat nicht an einer Stelle im aktiven Zentrum fixiert wird, sondern die Bindung sich gemäß der strukturellen Natur des Substrates manifestiert. In Bezug auf die IRKD spricht für ein solches Modell die Beobachtung, daß für das GST-CTphe-Fusionsprotein im Vergleich zu dem GST-CT-Fusionsprotein nahezu identische kinetischen Konstanten der Serinphosphorylierung erhalten werden (Kap. 6.4.2, Abb. 6.13). Weiterhin könnte es die experimentellen Daten erklären, daß in Peptidsubstraten des Insulinrezeptors, deren jeweilige Tyrosinphosphorylierungsstellen gegen Serinreste ausgetauscht wurden, gleiche Bindungskonstanten wie für das Ausgangssubstrat erhalten werden, aber keine Serinphosphorylierung beobachtet wird (Shoelson et al. 1989, Walker et al. 1987). Möglicherweise ist die umgebene Polypeptidkette nicht in der Lage, den Serinrest für eine effiziente Phosphorylierung zu positionieren. Dieselbe Erklärung könnte auch für die Nichtphosphorylierbarkeit der Threoninreste des GST-CTthr-Fusionsproteins und der IRKD-Y1316/22T gegeben werden, welche an Stelle der beiden Tyrosinphosphorylierungsstellen in diesen Molekülen vorhanden sind (Kap. 6.4.2). Aus den Beobachtungen sollte gefolgert werden, daß sich für eine Serin/Threoninphosphorylierungsstelle der Insulinrezeptorkinase eine Konsensussequenz aufzeigen läßt. Gemeinsames Merkmal beider Serinautophosphorylierungsstellen der IRKD sind unpolare bzw. ungeladene, relativ kleine Aminosäuren in der -2, -3 und +3 Position. Aus der Beobachtung einer Stabilisierung unpolarer Aminosäuren im aktiven Zentrum der phosphorylierten Kinase und den relativ kleinen Seitengruppen in der Polypeptidkette könnte demnach sehr wohl ein Zugang zum aktiven Zentrum des Enzyms erfolgen. Möglicherweise spielt aber bei der Positionierung nicht nur die direkte Umgebung des zu phosphorylierenden Aminosäurerestes eine Rolle. Im Vergleich zu synthetischen Peptiden (Stadtmauer und Rosen 1986, Shoelson et al. 1992) liegen die erhaltenen  $K_m$ -Werte für die vom Rezeptor abgeleiteten und natürlichen Substrate im niederen mikromolaren Bereich (Kap. 6.2 Tab. 6.1). Demnach ist für die Substraterkennung nicht nur die direkte Umgebung der Phosphorylierungsstelle entscheidend, vielmehr müssen auch Strukturen in weiter entfernten Regionen eine Rolle spielen. Diese Aussage wird durch den zum GST-CT-Fusionsprotein vergleichbaren  $K_m$ -Wert für das GST-CTphe-Fusionsprotein bestätigt (Kap. 6.4.2 Abb. 6.14). Ferner zeigt sich, daß die in dieser Arbeit untersuchten Peptidsubstrate nicht an den enthaltenen

Serinresten phosphoryliert werden (Kap. 6.4.5). Umgekehrt bedeutet dies, daß die Enzym-Substrat-erkennung auch Regionen außerhalb des aktiven Zentrums einschließt, an der der C-Terminus der Kinase beteiligt zu sein scheint. Die Deletion von 72 Aminosäuren bewirkt, daß das rekombinante GST-hIRS-1 p30 Fusionsprotein von dieser Kinase nicht mehr effizient erkannt und phosphoryliert wird (Wieber 1998, Nölle 1998). Ferner ergeben sich bei der Phosphorylierung synthetischer Peptide mit dieser Kinasevariante höhere Bindungsaffinitäten zum Enzym (Quirk et al. 1995). Demnach kommen dem C-Terminus modulatorische Eigenschaften in der Substraterkennung zu, die in dem Röntgenstrukturmodell von Hubbard (1997) nicht berücksichtigt werden.

Da im Fall der IRKD unzweifelhaft eine Zugänglichkeit für Serin- und Tyrosinreste zum katalytischen Zentrum der Kinase besteht, stellt sich die Frage, warum unterschiedliche Kinetiken in der Besetzung der beiden Aminosäurereste beobachtet werden. In der Autophosphorylierung der Kinase ist die Initialgeschwindigkeit der Tyrosinphosphorylierung immer deutlich höher als die Geschwindigkeit der Serinphosphorylierung (Kap. 5.3, Tab. 5.1). Dieser Umstand zeigt sich auch in der Substratphosphorylierungsreaktion, zudem ist hier die Initialgeschwindigkeit der Serinphosphorylierung im Substrat abhängig von seiner Konzentration (Kap. 6.4.1, Abb. 6.10 und Kap. 6.4.2, Abb. 6.13). Die zeitliche Nachschaltung der Serinphosphorylierung in der Auto- und Substratphosphorylierungsreaktion könnte auf einen kinetisch kontrollierten Prozeß hindeuten. In diesem Zusammenhang steht die Beobachtung, daß hohe Substratkonzentrationen auf der Ebene der IRKD zu einer kompetitiven Hemmung der Autophosphorylierung des Enzyms führen und auf Substratebene eine Verschiebung der Phosphorylierung zu Gunsten von Tyrosinresten bewirkt. Die beobachtete Inhibition betrifft vor allem die Tyrosinphosphorylierung der katalytischen Domäne, führt aber auch zu einer starken Inhibition der Serinautophosphorylierung der Kinase. Daher könnte geschlossen werden, daß für eine effiziente Serinphosphorylierung die Ausprägung des aktiven Zentrums für den Phosphotransfer auf Serinreste eine entscheidende Bedeutung zukommt. Allerdings zeigen die Untersuchungen der Substratphosphorylierung, daß nicht nur Tyrosinreste dem aktiven Zentrum zugänglich sind, sondern daß auch unter den Bedingungen hoher Konzentrationen im Substrat Serinphosphorylierung erhalten wird (Kap. 6.4.1 und Kap. 6.4.2). Demnach betrifft eine kinetische Kontrolle, d.h. eine Zugänglichkeit der Serinreste zum aktiven Zentrum nur die Serinautophosphorylierungsstellen des Enzyms selbst. Viele Beobachtungen sprechen für eine direkte Interaktion des C-Terminus mit dem aktiven Zentrum des Enzyms. Im Verlauf der Autophosphorylierung kommt es beim Insulinrezeptor zu Konformationsänderungen in der C-terminalen Domäne (Herrera und Rosen 1986, Baron et al. 1992). Desweiteren ergeben sich modulatorische Eigenschaften auf den  $V_{\max}$ -Wert für ATP oder exogene Substrate, die für eine Kompetition dieser Region mit den Substraten um die Bindung an das aktive Zentrum sprechen (Gual et al. 1996, Quirk et al. 1995, Wei et al. 1995, Wieber 1998, Nölle 1998, Kap. 8.3). Aus dem Vergleich der Initialgeschwindigkeiten von IRKD und IRKD-Y1316/22F geht hervor, daß die C-terminale Tyrosinphosphorylierung eine der ersten Schritte in der Autophosphorylierung der Kinase darstellt (Kap. 5.3, Tab. 5.1). Allerdings belegt die Beobachtung einer transienten Phosphorylierung dieser Tyrosinreste (Al-Hasani et al. 1994, Gruppuso et al. 1992, Kap. 8.3.4), daß keine „statische“ Konformationsänderung nach der Besetzung der beiden Tyrosinreste hervorgerufen wird. Vielmehr ist es ein Anhaltspunkt für einen ständigen Wechsel zwischen Bindung und Freigabe des aktiven Zentrums durch diese Region. Demnach hindern hohe Substratkonzentrationen die Zugänglichkeit des C-Terminus zum aktiven Zentrum und unterbinden somit die hier lokalisierte Serinphosphorylierung.

Die geringere Aktivität gegenüber Serin/Threoninresten könnte aber auch thermodynamisch begründet sein. Eine Substitution der Tyrosinphosphorylierungsstellen gegen Phenylalanin im GST-CTphe-Fusionsprotein führt nicht zu einer Änderung seiner kinetischen Konstanten. Im Vergleich von GST-CTphe- und GST-CT finden sich im Bezug auf die Serinphosphorylierung vergleichbare  $V_{\max}$ - und  $K_m$ -Werte der Reaktion (Kap. 6.4.2, Abb. 6.14). Diese Gemeinsamkeit scheint zunächst widersprüchlich, da die Substitution der beiden Tyrosinreste gegen Phenylalanin eine höhere Initialgeschwindigkeit der Serinphosphorylierung bewirken sollte, wenn von einer Bevorzugung der Tyrosinphosphorylierung ausgegangen wird. Demnach kann nicht eine Kompetition zwischen Serin- und Tyrosinresten um das aktive Zentrum stattfinden. Ebenso zeigen die in dieser Arbeit vorgestellten Kinasevarianten vergleichbare Initialgeschwindigkeiten und Phosphorylierungsgrade in der Serinautophosphorylierung (Kap. 5.3, Tab. 5.1). Die Hydroxylgruppe eines Tyrosinrestes besitzt einen  $pK_a$ -

Wert von 10,07 (Barker 1971), während der  $pK_a$ -Wert für die Hydroxylgruppe eines Serinrestes mit 13,6 angegeben werden kann (Metzler 1979). Demnach sollte die Hydroxylgruppe eines Tyrosinrestes im Vergleich zu der eines Serinrestes viel leichter deprotonierbar sein. Umgekehrt ergibt sich aus dieser Betrachtungsweise aber auch, daß ein Serinalkoxid ein wesentlich stärkeres Nukleophil als das gebildete Phenoxid des Tyrosins darstellt. Allerdings muß berücksichtigt werden, daß die die Aminosäure umgebenden Nachbargruppen einen Einfluß auf den Ionisierungsgrad haben können (Martin et al. 1990). Demnach scheint bei dem Vorhandensein von Tyrosin- und Serinphosphorylierungsstellen auch die Geschwindigkeit entscheidend zu sein, mit welcher die Deprotonierung der Hydroxylgruppe der zu phosphorylierenden Aminosäure erfolgt. Möglicherweise erklärt dieser Umstand die Tatsache, daß die beobachtete Serinphosphorylierung, auch in Abwesenheit von Tyrosinphosphorylierungsstellen, generell eine wesentlich langsamere Reaktion darstellt und daß folglich bei Anwesenheit von hohen Substratkonzentrationen eine Tyrosinphosphorylierung bevorzugt wird. Erhärtet wird diese Aussage durch die Untersuchungen von Lee et al. (1994 und 1995) zur Substratspezifität der PKA und pp60<sup>c-src</sup>. Die von ihnen untersuchten Peptide differieren nur in den Phosphoakzeptorstellen. Sowohl für die Serin/Threoninkinase PKA als auch die Tyrosinkinase pp60<sup>c-src</sup> ergeben sich nahezu gleiche  $K_m$ -Werte, aber unterschiedliche  $V_{max}$ -Werte der Reaktion. Für die Serin/Threoninkinase findet sich im Vergleich zum aliphatischen für den aromatischen Phosphoryl-akzeptor ein niedriger  $V_{max}$ -Wert, für die Tyrosinkinase verhält es sich genau umgekehrt. Demnach ist für eine Spezifität dieser beiden Proteinkinasen ein weiterer entscheidender Schritt in der Reaktion die Geschwindigkeit der Deprotonierung der zu phosphorylierenden Aminosäure.

Die thermodynamisch bedingte, unterschiedliche Deprotonierung der Aminosäuren als einzige Ursache der zeitlich nachgeschalteten Serinphosphorylierung erklärt aber nicht die Tatsache, daß im Verlauf der Autophosphorylierungsreaktion der zur Sättigung phosphorylierten Enzyme IRKD, IRKD-Y1316/22F und IRKD-Y960/1316/22F (Kap. 5.3, Abb. 5.5) oder eines Substrats (Kap. 6.4.1, Abb. 6.10; Kap. 6.4.3, Abb. 6.15) eine Verschiebung des Verhältnisses von Phosphotyrosin und Phosphoserin beobachtet wird. Dieser Umstand kann mechanistisch nur durch zwei Möglichkeiten erklärt werden. Die eine ist, daß während der Phosphorylierung ein Transfer von Tyrosinphosphaten auf Serinreste stattfindet, wobei die als Phosphodonatoren dienenden Tyrosinreste nicht mehr rephosphoryliert werden. Eine weitere Möglichkeit wäre, daß es während der Autophosphorylierungsreaktion unabhängig von der Serinphosphorylierung zu einer Dephosphorylierung von Tyrosinphosphorylierungsstellen im Enzym kommt. Die Beobachtung eines erhöhten ATP-Umsatzes und die Fähigkeit der transienten Phosphorylierung (Kap. 8.2.3) demonstriert, daß eine generelle enzymkatalysierte Reversibilität zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung einzelner Phosphorylierungsstellen im Enzym besteht. Ein Zusammenhang zwischen transientser Phosphorylierung und Serinphosphorylierung wird durch die Beobachtungen belegt, daß in Anwesenheit hoher Substratkonzentrationen neben der Abnahme der spezifischen Phosphatinkorporation in Serinreste auch eine Verringerung der Fähigkeit zur transienten Phosphorylierung von Enzym und Substrat beobachtet wird (Kap. 7.3.1 und 7.3.2). Dies demonstriert, daß Serinphosphorylierung und transiente Phosphorylierung einem gemeinsamen katalytischen Mechanismus zu unterliegen scheinen und impliziert ferner, daß erst die Fähigkeit zur transienten Phosphorylierung eine Serinphosphorylierung ermöglicht. Interessanterweise findet sich diese Kombination, Fähigkeit zur transienten Phosphorylierung und zur Serinphosphorylierung, nicht nur bei der Insulinrezeptorkinase. Sie wird auch bei der EGF-Rezeptorkinase (Affüpper 1997), der IGF-1 Rezeptorkinase (Magg 1997) und der trk b-Rezeptorkinase (Beemelmans 1997) beobachtet. Die vorliegende Kristallstruktur der Insulinrezeptorkinase bietet für dieses Phänomen keine Erklärung (Hubbard 1994, 1997). Hypothetisch ist die Phosphorylierung und Dephosphorylierung durch eine Phosphotransferstelle im Enzym erklärbar, welche nach Übernahme der  $\gamma$ -Phosphorylgruppe des ATP die Verteilung der Phosphorylgruppe auf die Phosphorylierungsstellen im Enzymsubstrat oder im exogenen Substrat übernehmen könnte (Kap. 8.2.4). In Bezug auf die Serinphosphorylierung und die Tyrosinphosphorylierung exogener Substrate mit multiplen Phosphorylierungsstellen könnte eine solche „Verteilerstelle“ im Enzym zum einen die hohe Variabilität und Flexibilität in der Substraterkennung der Kinase begründen. Zum anderen würde sie eine Erklärung für die auftretende Verschiebung des Verhältnisses von Phosphotyrosin zu Gunsten von Phosphoserin bieten. Hier drängt sich ein Vergleich zu den bakteriellen Phospho-

transferase-Systemen auf, in welchen Phosphorylgruppen über ein Histidin, ein echtes Phosphoenzymintermediat, auf einen Aspartat-Rest übertragen werden können (Cozzzone 1998).

Die Untersuchungen der Autophosphorylierungsreaktion unter Pulse-Chase-Bedingungen demonstrieren, daß von einer transienten Phosphorylierung ausschließlich Tyrosinreste im Substrat oder im Enzym betroffen sind. Demnach wäre es vorstellbar, daß diese Phosphorylgruppen transientser Phosphorylierungsstellen über einen ausreichend hohen Energiegehalt verfügen könnten, um als intermediäre Phosphodonatoren für die Serinphosphorylierung zu dienen. Eine postulierte Phosphotransferasestelle könnte die energiereichen Phosphate übernehmen und auf Serinreste übertragen. Gegen dieses Modell sprechen allerdings mehrere Beobachtungen. Zunächst zeigt sich, daß die Gesamtmenge der radioaktiv markierten Phosphoserine in der Pulse-Chase Reaktion sowohl in der Kinase als auch in den untersuchten Substraten gleich bleibt (Kap. 7.22, Abb. 7.7, Kap. 7.2.4 Abb. 7.11, Kap. 7.3.2, Abb. 7.16). Ein weiteres Argument gegen einen direkten Transfer von Tyrosinphosphaten auf Serinreste ist, daß der Austausch transientser Phosphorylierungsstellen im Enzym (IRKD-Y1316/22F und IRKD-Y960/1316/22F) nicht zu einer Reduktion der Serinphosphorylierung führt. Vielmehr ergeben sich zu der IRKD vergleichbare Werte bezüglich der Initialgeschwindigkeit und in der Gesamtposphatinkorporation der Serinphosphorylierung (Kap. 5.3, Abb. 5.5). Weiterhin ist es unter den verwendeten Reaktionsbedingungen nicht möglich, ein vorphosphoryliertes Substrat als Phosphoryldonor für eine effiziente Serinphosphorylierung zu nutzen (Kap. 7.3.3). Daher ist es eher vorstellbar, daß es im Verlauf der Autophosphorylierungsreaktion zu einer realen Dephosphorylierung bestimmter Tyrosinphosphorylierungsstellen kommt. Gegen diese Hypothese sprechen zunächst die immunologischen Untersuchungen zum Phosphorylierungsstatus der Kinase mit  $\alpha$ -Phosphotyrosin-Antikörper (Kap. 7.2.1, Abb. 7.2; Matthey 1993), in welchen nach der Pulse und Chase Reaktion ein vergleichbares visuelles Signal detektiert wird. Dies könnte aber in einer zu geringen Sensitivität des Antikörpers begründet sein. Die Hypothese einer realen Dephosphorylierung wird durch die Untersuchungen von Nölle (1998) mit einer löslichen Kinase, in welcher die beiden Serinphosphorylierungsstellen gegen Aspartat substituiert wurden, gestützt. Während ihrer Autophosphorylierungsreaktion wird eine reale Abnahme der inkorporierten, radioaktiv markierten Phosphate beobachtet, welche in der Größenordnung mit der Reduktion der Tyrosinphosphorylierung in der IRKD vergleichbar ist.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob die Auto- und Substratphosphorylierung der IRKD einem prozessiven oder einem distributiven Mechanismus unterliegt. Bei einem prozessiven Mechanismus erfolgt im ersten Schritt die Anlagerung des Substrates an die Kinase und der Phosphotransfer auf die erste Phosphorylierungsstelle. Im zweiten Schritt verschiebt sich das Substrat, ohne vom Enzym zu dissoziieren, zur nächsten Phosphorylierungsstelle. Nach erneuter ATP-Bindung erfolgt die Phosphorylierung der weiteren Phosphorylierungsstelle usw., bis letztendlich alle Phosphorylakteptorstellen im Substrat vollständig besetzt sind („bind and slide“-Modell). Erst dann erfolgt die Dissoziation des Enzym-Substrat-Komplexes. Dagegen wird bei einem distributiven Mechanismus davon ausgegangen, daß es nach jedem Phosphotransfer zur Dissoziation des Enzym-Substrat-Komplexes kommt. Für die duale Map-Kinase Kinase konnten Ferrell und Bhatt (1997) demonstrieren, daß die durch dieses Enzym katalysierte Tyrosin- und Threoninphosphorylierung der Map-Kinase einem distributiven Mechanismus unterliegt. Nach der Phosphorylierung eines Tyrosinrestes in ihrem Substrat, der Map-Kinase, erfolgt die Dissoziation des Enzym-Substratkomplexes und anschließend, nach erneuter Assoziation, die Phosphorylierung eines Threoninrestes. Für die Substrat- und Autophosphorylierung der löslichen Insulinrezeptorkinase ist aufgrund der vielfältigen Phosphorylierungsstellen im Enzym eine vergleichbare Aussage nur schwer möglich. Allerdings finden sich Hinweise, daß der durch die Insulinrezeptorkinase katalysierte Phosphotransfer ebenfalls über einen distributiven Mechanismus verläuft. Zeitabhängige Untersuchungen zum Phosphorylierungsstatus einzelner Phosphorylierungsstellen der IRKD von Nölle (1998) belegen eine sequentielle Besetzung der einzelnen Phosphorylierungsstellen im Enzym. Für die Phosphorylierung der drei Tyrosinreste eines Peptidsubstrates aus der katalytischen Domäne konnte gezeigt werden, daß zunächst der Tyrosinrest Tyr<sup>1150</sup> phosphoryliert wird, bevor schrittweise die Besetzung der anderen Phosphorylierungsstellen erfolgt (Levine et al. 1991). Für die Serinauto- und Substratphosphorylierung bleibt diese Aussage allerdings spekulativ. Für einen distributiven Mechanismus könnte die geringe

Phosphorylierung von Serinresten bei hohen Substratkonzentrationen im GST-CT-Fusionsprotein, im Gab-1 oder hIRS-1 p30 sprechen. Bei einem prozessiven Mechanismus, bei dem zunächst die vollständige Besetzung aller Phosphorylierungsstellen und danach die Freisetzung des Substrates erfolgt, sollte das Verhältnis von Phosphotyrosin zu Phosphoserin gleich bleiben. Allerdings zeigen die Untersuchungen mit dem GST-CTphe-Fusionsprotein, daß das Vorhandensein der Tyrosinphosphorylierungsstellen keine Voraussetzung für eine Phosphorylierung dieses Substrates darstellt. Vielmehr verläuft die Reaktion in Bezug auf die Serinphosphorylierung mit den gleichen kinetischen Konstanten wie die des GST-CT-Fusionsproteins (Kap. 6.4.1, Abb. 6.10 und Kap. 6.4.2, Abb. 6.13). Demnach wäre es möglich, daß ein Teil der im Reaktionsansatz enthaltenen GST-CT-Fusionsproteine nur an Tyrosinresten phosphoryliert wird, während ein anderer Teil ausschließlich eine Serinphosphorylierung erhält. Für die Serinautophosphorylierung kann nicht grundsätzlich von einem distributiven Mechanismus ausgegangen werden. Der Vergleich der Initialgeschwindigkeiten der Phosphorylierung der IRKD und IRKD-Y1316/22F zeigt, daß in der Anfangsphase der Reaktion eine Besetzung der C-terminalen Tyrosinphosphorylierungsstellen erfolgt, allerdings ergeben sich für beide Enzyme in Bezug auf die Serinphosphorylierung vergleichbare kinetische Konstanten. Demnach wäre es auch in diesem Fall durchaus möglich, daß ein Teil der Moleküle eine Serinphosphorylierung im C-Terminus erhält, während in dem anderen Teil eine Tyrosinphosphorylierung erfolgt. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß weder in der Autophosphorylierungsreaktion der Kinasen noch in der Substratphosphorylierungsreaktion die rechnerisch mögliche vollständige Besetzung aller Tyrosin- und Serinreste erhalten wird. In der Insulinrezeptorkinase finden sich insgesamt 9 identifizierte Autophosphorylierungsstellen, der spezifische Phosphateinbau beträgt aber nur 4-5 mol/mol. Für das GST-CT-Fusionsprotein ergibt sich bei einer Substratkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  ein Phosphateinbau von etwa 1 mol/mol, wohingegen rechnerisch 4 mol/mol erhalten werden könnten. Dieselben Beobachtungen werden auch für die anderen Fusionsproteine erhalten, längere Reaktionszeiten, andere Konzentrationsverhältnisse oder Reaktionsbedingungen führen niemals zu einer vollständigen Besetzung aller angebotenen Phosphorylierungsstellen (Leven 1996). Möglicherweise spielt in diesem Zusammenhang die beobachtete transiente Phosphorylierung der IRKD in der Auto- und Substratphosphorylierungsreaktion eine Rolle (Kap. 8.2.3). Da im Verlauf der Substrat- bzw. Autophosphorylierungsreaktion eine permanente De- und Rephosphorylierung einzelner Tyrosinphosphorylierungsstellen beobachtet wird, könnte es durchaus möglich sein, daß sich ein Gleichgewicht zwischen phosphorylierten und unphosphorylierten Substraten ergibt.

### 8.3.3 Mögliche Bedeutung der Serinphosphorylierung

Über eine mögliche Funktion der Serinauto- und Substratphosphorylierung kann zur Zeit nur spekuliert werden. Der experimentelle Hinweis, daß die beiden *in vitro* identifizierten Serinphosphorylierungsstellen auch *in situ* nachgewiesen werden können, spricht aber für eine biologische Relevanz in der Zelle. Für den gereinigten Insulinrezeptor aus Humanplazenta konnte von Parvaresh (unveröffentlicht) gezeigt werden, daß dieser wie die lösliche Kinase bei stöchiometrischen Substratkonzentrationen eine Serinphosphorylierung des rekombinanten GST-hIRS-1 und des intakten Gab-1 Proteins katalysieren kann. Die *in vitro* beobachtete Serinsubstratphosphorylierung der löslichen Kinase sowie des Holorezeptors und die Übertragbarkeit der Serinautophosphorylierung *in vitro* auf die *in situ*-Situation impliziert daher, daß die Phosphorylierung von Serinresten in natürlichen Substraten *in situ* möglich sein sollte. Auf Enzymebene liegen bislang keine Erkenntnisse vor, daß die zusätzliche Serinphosphorylierung zu einer Modulation der Auto- bzw. der Substratphosphorylierung der löslichen Kinase oder des Insulinrezeptors führt. Der Austausch der beiden Serinreste Ser<sup>1275</sup> und Ser<sup>1309</sup> gegen Asparaginsäure, die die Serinphosphorylierung simulieren sollte, führt in der löslichen Kinase IRKD-S1275/1309D im Vergleich zur IRKD zu keinen erkennbaren kinetischen Unterschieden (Nölle 1998). Allerdings beobachten Strack et al. (1997) eine Erhöhung der Autophosphorylierung des Insulinrezeptors *in situ* nach Austausch des Serinrestes Ser<sup>1309</sup> gegen Alanin. Aufgrund der räumlichen Nähe der beiden Serinphosphorylierungsstellen zu den C-terminalen Tyrosinresten, welche als Bindungsstellen von SH2-Domänen enthaltenen Proteinen beschrieben wurden (Levy-Toleando et al. 1994, Van Horn et al. 1994, Staubs et al. 1994, Hansen et al. 1996), könnte über eine

Modulation dieser Interaktionen spekuliert werden. Erste Ergebnisse von Pavaresch (unveröffentlicht) demonstrieren, daß nach Autophosphorylierung der C-terminalen Serinphosphorylierungsstellen eine deutlich geringere Assoziation mit einer rekombinanten SH2-Domäne der p85-Untereinheit der PI-3 Kinase beobachtet wird.

Auf Substratebene wurde von verschiedenen Autoren über eine modulatorische Wirkung von Serinphosphorylierung berichtet. Mothe und Van Obberghen (1996) demonstrieren, daß der Austausch von Serinresten gegen Alanin im zentralen Bereich des IRS-1 zu einer Erhöhung der PI3-Kinaseaktivität in der Zelle führt. Die Autoren vermuten, daß Serinphosphorylierung eine verminderte Assoziation der p85-Untereinheit der PI3-Kinase hervorruft und damit eine Abschaltung des Signalweges bewirkt. Eine für die Phosphorylierungen verantwortliche Kinase konnte bislang nicht identifiziert werden. Die Beobachtung ist insofern interessant, als daß eine Serinphosphorylierung in dem rekombinanten hIRS-1 p30 beobachtet wird. Das genannte Fragment enthält den Aminosäurebereich, in welchem von Mothe und van Obberghen (1996) die Substitutionen vorgenommen wurden. Erste Ergebnisse von Khademlou (unveröffentlicht) zeigen, daß vergleichbare Aminosäureaustausche im hIRS-1 p30 ebenfalls zu einer reduzierten Serinphosphorylierung in diesem Substrat führen. Die substituierten Serinreste liegen jeweils in dem Sequenzmotiv YMXMS und sind damit in direkter Nähe zu den Tyrosinphosphorylierungsstellen lokalisiert.

Möglicherweise sind bei den beobachteten Modulationen in der Bindung von SH2-Proteinen im zellulären Kontext auch weitere Proteine für eine verminderte Assoziation verantwortlich. Für das bisher wenig charakterisierte 14-3-3 Protein konnte gezeigt werden, daß es an phosphorylierte Serinreste des IRS-1 binden kann und somit eine Interaktion mit dem Rezeptor unterbindet (Ogihara et al. 1997). Über eine mögliche Serinphosphorylierung des Adapterproteins Gab-1 liegen bislang noch keine experimentellen Daten vor. Demnach kann nur spekuliert werden, welche Auswirkung eine Besetzung solcher Phosphorylierungsstellen hat. Interessanterweise ergeben sich für dieses Protein, welchem eine Rolle in der Signalweiterleitung von Insulinrezeptor und EGF-Rezeptor zugesprochen wird (Holgado-Madruga et al. 1996), Unterschiede im Phosphorylierungsmuster, wenn die beiden Hormonrezeptoren in der Substratphosphorylierungsreaktion verwendet werden (Lehr et al., eingereicht zur Publikation). Während der Insulinrezeptor oder seine lösliche Kinase maßgeblich für die Phosphorylierung des Tyrosinrestes Tyr<sup>447</sup> im zentralen Bereich des Moleküls verantwortlich ist, findet sich bei Verwendung des EGF-Rezeptors oder seiner löslichen Kinase die Phosphorylierung des Tyrosinrestes Tyr<sup>657</sup> im C-Terminus des Moleküls. Aufgrund dieser Unterschiede werden verschiedene Signalmoleküle rekrutiert. Die durch den EGF-Rezeptor katalysierte Phosphorylierung führt zu einer Syp-vermittelten Signalweiterleitung, Insulinrezeptor-Phosphorylierung resultiert dagegen in der Aktivierung der PI3-Kinase. In der Phosphoaminosäureanalyse der rekombinanten Fragmente aus dem mittleren und C-terminalen Bereich des Gab-1-Proteins wird eine hohe Serinphosphorylierung detektiert (Kap. 6.4.4, Abb. 6.16). Bei der Betrachtung der Aminosäuresequenz dieser Bereiche fällt auf, daß hier Serinreste in einer Aminosäureumgebung lokalisiert sind, welche eine Homologie zu den identifizierten Serinautophosphorylierungsstellen des Rezeptors besitzen. Im Insulinrezeptor sind die Phosphorylierungsstellen in den Motiven: Ser<sup>1275</sup>: APESpEELE und Ser<sup>1309</sup>: DGGSSpLGFK lokalisiert. Im Gab-1 Protein finden sich die Sequenzmotive: GSVSSEELD (Aminosäureposition: 436-444) und DGGSSPMIK (Aminosäureposition: 640-648). Daher kann spekuliert werden, ob diese Serinreste, welche in direkter Nachbarschaft zu den identifizierten Tyrosinphosphorylierungsstellen lokalisiert sind, in der Phosphorylierungsreaktion durch die Rezeptorkinase besetzt werden. Möglicherweise führt eine Besetzung der genannten Serinreste zu einer verminderten Assoziation mit den entsprechenden Signalmolekülen.

Eine weitere Funktion der Serinphosphorylierung könnte auch in der Modulation der Interaktion des Substrates mit dem Katalysator selbst liegen. Paz et al. (1997) beobachten eine verminderte Assoziation von den an Serinresten phosphorylierten Signalproteine IRS-1 und IRS-2 mit dem Insulinrezeptor. In diesem Zusammenhang wird von Zhao et al. (1998) von einer Dissoziation des Grb-Sos Signalkomplexes in Folge von Serinphosphorylierung des Grb-Adapterproteins berichtet. Eine verantwortliche Kinase für diese Phosphorylierung wurde aber noch nicht identifiziert.

Möglicherweise spielen in der Signalweiterleitung auch die beobachteten kinetischen Eigenschaften der Rezeptor-katalysierten Serinphosphorylierung eine Rolle. Die Besetzung der Serinreste ist in jedem Fall der Tyrosinphosphorylierung zeitlich nachgeschaltet und zudem stark von der Substrat-

konzentration abhängig. Letztere Aussage sollte für den zellulären Kontext des Insulinrezeptor eine untergeordnete Rolle spielen, da generell die Meinung besteht, daß nach Hormonstimulierung stöchiometrische, stabile Signalprotein-Rezeptorkomplexe ausgebildet werden (White 1998). Deren Zusammensetzung ist nur von dem Vorhandensein der einzelnen Adapterproteine in der Zelle abhängig. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß der Insulinrezeptor aus *Drosophila* eine C-terminale Extension enthält, welche eine hohe Homologie zum humanen IRS-1 aufweist (Ruan et al. 1995, Fernandez et al. 1995). Dieser Befund ist ein gutes Beispiel für die Notwendigkeit der Ausbildung stöchiometrischer Signalkomplexe. Möglicherweise führt die zeitlich nachgeschaltete Serinphosphorylierung bei einer bestehenden SH2-Interaktion zu deren Dissoziation und damit im Sinne einer homologen Desensibilisierung zu der Beendigung eines bestehenden Signalweges. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß eine bestehende SH2-Protein-Interaktion nicht durch eine Dephosphorylierung des dafür verantwortlichen Tyrosinrestes unterbunden werden kann (Brunatti et al. 1998), da keine Zugänglichkeit für eine exogene Phosphatase besteht.

## 9 Methoden

### 9.1 Molekularbiologische Methoden

Folgende molekularbiologischen Methoden wurden gemäß Standardprotokollen nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt: Agarose-Gelelektrophorese, Fällung von DNA, Phenol-Chloroform-Extraktion, Restriktionsendonukleolytische Spaltung, Ligation, Klenow-Polymerase Reaktionen, Konzentrationsbestimmung von DNA.

Plasmid-"Mini"-Präparationen für Restriktionsanalysen erfolgten nach Zhou et al. (1990) bzw. mit dem Qiagen-Kitsystem nach Herstellerangaben.

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem Qiaex-Kitsystem (Quiagen) oder dem Sephaglas™ Band Prep Kit (Pharmacia Biotech).

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Methode von Sanger et al. (1977). Dabei wurde das Standardprotokoll für Sequenzierung doppelsträngiger DNA aus dem T7 Sequencing™ Kit der Firma Pharmacia Biotech verwendet. Die Sequenzierungsansätze wurden mit Hilfe eines 6 %igen Acrylamidgels (Acryl-/N,N'-Methylbisacrylamid 19:1)/ 8 M Harnstoff in einer Pharmacia Gelapparatur nach Herstelleranweisung aufgetrennt.

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

Kompetente Bakterien wurden nach Chung et al. (1989) mit TSS Puffer (85 % LB-Medium, 10 % (w/v) Polyethylenglycol, 5 % (v/v) DMSO, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6,5 ) hergestellt und bei -80 °C gelagert. Die Transformation von Bakterienzellen erfolgte durch Hitzeschock (1,5 min, 42 °C).

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

#### 9.1.1 Konstruktion der Transfervektoren pVL-IRKD-Y1316/22F und pVL-IRKD-Y1316/22T

Punktmutationen innerhalb der DNA Sequenz, die in dem Austausch der beiden C-terminalen Tyrosinphosphorylierungsstellen in der IRKD gegen Phenylalanin bzw. Threonin resultierten, wurden mit dem Transformer™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Clontech) nach dem Verfahren von Deng und Nickoloff (1992) eingeführt. Als Ausgangsvektor diente in beiden Fällen der Vektor pUC-IRKD, der die kodierende Sequenz für die cytoplasmatische Untereinheit des Insulinrezeptors trägt (Arg<sup>941</sup>-Ser<sup>1343</sup>, Tennagels 1995). Für die Generierung der Transfervektoren pVL-IRKD-Y1316/22F und pVL-IRKD-Y1316/22T wurden zwei 40 Bp lange Oligonukleotide verwendet, die der cDNA Position des kodogenen Stranges des humanen Insulinrezeptors von 4065 - 4105 entsprechen. Durch den Austausch eines oder mehrerer Nukleotide (Tyr<sup>1316</sup> → Phe: A (Position 4077) → T, Tyr<sup>1322</sup> → F: A (Position 4096) → T; Tyr<sup>1316</sup> → Thr: T (Position 4076) und A (Position 4077) gegen A und C, Tyr<sup>1322</sup> → T: (Position 4095) und A (Position 4096) gegen A und C) wird eine Änderung der Aminosäuresequenz von Tyrosin nach Phenylalanin bzw. Threonin erreicht. Ferner wird durch den Austausch des Nukleotides C (Position 4091) gegen T in einer stillen Mutation eine weitere Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease XmnI erzeugt. Für dieses Enzym sind im 4075 Bp großen Ausgangsvektor bereits zwei Schnittstellen vorhanden (Fragmentlänge nach Spaltung: 1121, 2954 Bp), die zusätzliche Schnittstelle erzeugt daher in der Restriktionsanalyse eines mutierten Plasmids ein weiteres DNA-Fragment, welches im Agarosegel eindeutig identifiziert werden kann (Fragmentlängen nach Spaltung: 1121, 835, 2119 Bp). Nach Durchführung der Mutagenesereaktion wurde die Plasmid-DNA der erhaltenen Klone hinsichtlich ihrer neuen Restriktionsschnittstelle überprüft und die Einführung der Mutationen durch DNA-Sequenzierung nach Sanger (1977) verifiziert. Die sequenzierte DNA der Klone wurde im Fall der K1018A-Mutante mit den Restriktionsenzymen XhoI und BstXI oder im Fall der IRKD-Y1316/22F und pVL-IRKD-Y1316/22T mit BstXI und PstI jeweils aus dem pUC19 Vektor

isoliert und in einen XhoI/BstXI bzw. BstXI/PstI linearisierten pUC-IRKD subkloniert. Diese Vorgehensweise ist erforderlich, da durch die Verwendung der reparaturdefekten Bakterien in dem Mutagenese-Protokoll sich die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass weitere, spontan auftretende Mutationen amplifiziert werden. Aus diesen Vektoren wurden anschließend die BamHI/PstI Fragmente, die für die IRKD-K1018A, IRKD-Y1316/22F bzw. IRKD-Y1316/22T kodieren, isoliert und in den BamHI/PstI linearisierten Transfervektor pVL1393 subkloniert.

### 9.1.2 Konstruktion der *E. coli*-Expressionsvektoren pGST-CTphe und pGST-CTthr

Für die Generierung der *E. coli* Expressionsvektoren pGST-CTphe und pGST-CTthr wurde das QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene verwendet. Dazu wurden die unter 9.1.1 beschriebenen Oligonukleotidprimer verwendet, die zu einem Austausch der beiden C-terminalen Tyrosinphosphorylierungsstellen gegen Phenylalanin und Threonin führen. Ferner bewirkt das Einführen der stillen Mutation die Erzeugung der weiteren Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease XmnI, für die im 5417 Bp großen Ausgangsvektor bereits zwei Schnittstellen vorhanden sind (Fragmentlänge nach Spaltung: 1361, 4056 Bp), die zusätzliche Schnittstelle erzeugt daher in der Restriktionsanalyse eines mutierten Plasmids ein weiteres DNA-Fragment, welches im Agarosegel eindeutig identifiziert werden kann (Fragmentlängen nach Spaltung: 502, 859, 4056 Bp). Als Ausgangsvektor diente der Expressionsvektor pGST-CT, der die kodierende Sequenz der C-terminalen Domäne des Insulinrezeptors enthält (Asn<sup>1249</sup>-Ser<sup>1343</sup>, Goder 1995). Das Verfahren basiert auf einer PCR gestützten Mutagenese. Dazu wird der Ausgangsvektor zusammen mit den entsprechenden Oligonukleotiden in einer PCR eingesetzt und der Reaktionsansatz anschließend durch einen Restriktionsverdau mit der Endonuklease DpnI inkubiert. DpnI spaltet spezifisch methylierte und hemi-methylierte parentale DNA, nur neusynthetisierte Moleküle bleiben erhalten. Diese, die gewünschte Mutation enthaltenden einzelsträngigen, zirkulären Plasmide werden im nächsten Schritt in *E. coli* XL2-Blue ultrakompetente Zellen transformiert. Durch die niedrige Fehlerrate beim Nukleotideinbau der Pfu DNA Polymerase und eine niedrige Zyklenzahl in der PCR wird eine hohe Mutationseffizienz erreicht (bis 98 %) und gleichzeitig die Möglichkeit zufälliger Mutationen während der Reaktion verringert. Die PCR und die Transformation von *E. coli* XL2-Blue Zellen erfolgten nach den Angaben des Herstellers. Nach Durchführung der Mutagenesereaktion wurde die Plasmid-DNA der erhaltenen Klone hinsichtlich ihrer neuen Restriktionsschnittstelle überprüft und die Einführung der Mutationen durch DNA-Sequenzierung nach Sanger et al. (1977) verifiziert.

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

Zur Expression der GST-Fusionsproteine GST-CTEx20, GST-CT, GST-CTphe, GST-CTthr und GST-JM wurden die entsprechenden Expressionsvektoren verwendet und erfolgte in *E. coli* DH5 $\alpha$ . Die Anzucht der Bakterien, die Induktion der Proteinexpression und die Reinigung der GST-Fusionsproteine durch Affinitätschromatographie erfolgte nach Smith und Johnson (1988).

Benötigte Puffer:      PBS: 140 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
                           Elutionspuffer: 5 mM reduziertes Glutathion, 50 mM Tris/HCl, pH 8,0  
                           50 mM Tris/HCl, pH 7,5

### Expression der Fusionsproteine in *E. coli*

- Transformierte *E. coli* DH5 $\alpha$  in LB-Medium animpfen, über Nacht inkubieren (37 °C, 220 rpm)
- Übernachtskultur 1:10 mit LB-Medium (37 °C) verdünnen
- Inkubation 1h, bei 37 °C und 200 rpm
- Induktion mit IPTG (Endkonzentration 1 mM)
- Inkubation bei 37 °C und 200 rpm für 4 h
- Bakterien abzentrifugieren (10 min, 5.000  $\times$  g, 4 °C)

### Aufschluß der Bakterien

- Zellen mit 1/50 Kulturvolumen eiskaltem PBS waschen
- Bakterien erneut abzentrifugieren (10 min bei  $5.000 \times g$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ )
- Zellen in 1/100 Kulturvolumen eiskaltem PBS (1 mM PMSF, 10  $\mu\text{g/ml}$  Leupeptin) resuspendieren
- Aufschluß durch Ultraschall (3 x 5 sec, 100 Watt, auf Eis)
- Zugabe von Triton X-100 auf 1 % (v/v)
- Unlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugation entfernen (20 min,  $10.000 \times g$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ )

### Reinigung der Fusionsproteine durch Glutathion-Affinitätschromatographie

- Glutathion Sepharose-Säule mit 10 Bettvolumen PBS äquilibrieren
- Säule mit dem Überstand nach Zellaufschluß beladen (Flußrate: 1ml/min)
- Säule mit 10 Bettvolumen PBS waschen
- Elution mit 5 Bettvolumen Elutionspuffer
- Eluat in Mikrokonzentrator (Centricon™ C 10) einengen und in Tris/HCl, pH 7,5 umpuffern
- SDS-PAGE und Proteinbestimmung der Eluate durchführen

### **9.2.1 Proteolytische Spaltung der GST-Fusionsproteine und Reinigung der Peptide**

Die Fusionsproteine GST-CT, GST-Ex20 und GST-JM wurden für die Spaltung in einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml eingesetzt.

Spaltungspuffer: 0,1 M NaCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 50 mM Tris/HCl, pH 7,5

- Zugabe von Spaltungspuffer
- Zugabe der Protease (Faktor Xa) im Verhältnis 1:100 (w/w)
- Inkubation bei  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ : GST-CT 30 min, GST-Ex20 60 min, GST-JM 90 min
- Reaktion durch Zufügen von 1/10 Volumen 1 % Trifluoressigsäure (TFA) abstoppen
- Durchführung einer Reversed-Phase-HPLC (Säule: ET 250/8/4 Nucleosil 300-7 C<sub>8</sub> (250 x 4 mm))

Laufpuffer: Puffer A: 0,1 % TFA  
Puffer B: 0,1 % TFA, 80 %  $\text{CH}_3\text{CN}$

- Trennsäule mit 15 ml Puffer A äquilibrieren (Flußrate: 0,5 ml/min).
- Auftragen der Probe (Flußrate: 0,5 ml/min).
- Trennung des Spaltungsansatzes durch einen linearen Gradienten (0-100 % B in 50 Minuten). Die Peptide CT, Ex20 und JM wurden bei 50 %, 48 % und 55 % eluiert.
- Protein enthaltene Fraktionen (Detektion 206 nm) vereinigen und Lösungsmittel im Vakuum (Speed-Vac) abziehen.
- Hydrolysat zweimal in je 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  resuspendieren und erneut einengen.
- Peptide in Wasser aufnehmen und SDS-PAGE und Proteinbestimmung durchführen.

Die Lagerung der gereinigten Peptide erfolgte bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **9.3 Expression und Reinigung der löslichen Insulinrezeptorkinase IRKD und ihrer Varianten**

#### **9.3.1 Expression im Baculovirus-Expressionssystem**

##### **9.3.1.1 Zellkultur**

Die Kultivierung von *Spodoptera frugiperda* (Sf9) Zellen erfolgte in Grace's Insektenmedium (10 % fötales Kälberserum (hitzeinaktiviert, v/v), 50  $\mu\text{g/ml}$  Gentamycinsulfat, 2,5  $\mu\text{g/ml}$  Amphotericin B) als Suspensionskultur oder in Gewebekulturflaschen bei  $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Um eine Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml Kulturmedium zu gewährleisten, wurde dreimal pro Woche passagiert. Die Herstellung und Lagerung von gefrorenen Sf9-Zellen erfolgte nach Summers und Smith (1987). Eine aufgetaute Zell-

charge wurde nicht länger als drei Monate verwendet. Infektionen wurden ausschließlich mit Kulturen durchgeführt, deren Generationszeit 18-24 h betrug und eine Vitalität von > 97 % aufwiesen. Die Kotransfektion von Transfervektor und AcNPV-DNA, die Isolation rekombinanter Baculoviren durch Plaque-Assay, Virusamplifikation, Titerbestimmung und Bestimmung des Expressionsmaximums erfolgte nach Summers und Smith (1987) und den Herstellerangaben des verwendeten BaculoGold™ Transfection Kit (Pharmingen).

### 9.3.1.2 Infektion, Proteinexpression und Ernte von Sf9-Zellen

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

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

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

- Zellen in Aufschlußpuffer resuspendieren ( $10^7$  Zellen/ml)
- 3 x 5 sec. sonifizieren (100 Watt, auf Eis)
- im Elvehjem-Potter-Homogenisator bei 700 Umdrehungen homogenisieren
- unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation entfernen (10 min, 10000 x g)
- Überstand abnehmen (auf Eis lagern)
- Pellet in Aufschlußpuffer resuspendieren ( $10^7$  Zellen/ml) und zentrifugieren (10 min, 10000 x g)
- Überstände vereinigen und 45 min bei 120000 x g zentrifugieren
- Überstand abnehmen und Proteinbestimmung durchführen.

Das erhaltene Lysat enthielt durchschnittlich 1,5 mg Protein/ ml und wurde in Aliquots von 10 ml nach Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert oder direkt weiterverwendet.

### 9.3.2 Reinigung der löslichen Insulinrezeptorkinase

Die Reinigung der Rezeptorkinase und ihrer verschiedenen Varianten erfolgte in Anlehnung an Villalba et al. (1989) und Al-Hasani (1995). Dabei werden zwei aufeinanderfolgende chromatographische Verfahren, Anionenaustausch- und hydrophobe Interaktionschromatographie, angewandt. Die Anionenaustauschchromatographie erfolgte entweder mit MonoQ (HR 5/5) oder ResourceQ, die hydrophobe Interaktionschromatographie mit Phenyl-Sepharose Fast Flow (High Sub) in Verbindung mit einer FPLC-Apparatur (Pharmacia) oder BioLogic Chromatographieanlage (BioRad). Die Vorschrift für die nachfolgende Reinigung gilt für cytosolischen Überstand aus  $10^8$  Zellen (10 ml, ca. 15 mg Protein).

#### 9.3.2.1 FPLC-Anionenaustauschchromatographie

Chromatographie-Puffer:

Puffer A: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin

Puffer B: 50 mM Tris /HCl, pH 7,5, 1 M NaCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin

- Zell-Lysat auf 0,1 M NaCl, 1mM DTT einstellen und 5 Minuten ( $5000 \times g$ , 4 °C) zentrifugieren
- Säule (MonoQ oder Resource Q) mit 10 ml 90 % Puffer A, 10 % Puffer B äquilibrieren
- Säule mit Probe beladen, Flußrate: 0,5 ml/min (MonoQ), 2 ml (Resource Q)
- Säule waschen mit 90 % Puffer A, bis Extinktion (280 nm) auf Basislinienniveau
- linearen Gradienten anlegen: 10-30 % B in 12 ml, Flußrate wie beim Probenauftrag
- Fraktionen von 1 ml sammeln und die die Kinase enthaltenen Fraktionen vereinigen

Die löslichen Kinasen eluierten bei ca. Xy % Puffer B (0,2 M NaCl) von der Säule, die Proteinkonzentration betrug im Mittel 1-1,5 mg/ml (2-3 ml).

### 9.3.2.2 FPLC-Hydrophobe-Interaktionschromatographie mit Phenyl-Sepharose

Chromatographie-Puffer:

Puffer A: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 20 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (% Sättigung), 0,25 M NaCl, 1 mM, DTT, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin

Puffer B: 50 mM Tris /HCl, pH 7,5, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin

- Säule mit 10 ml Puffer A äquilibrieren
- Probe (aus Anionenaustausch-Chromatographie) mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  auf 20 % Sättigung einstellen
- 30 min auf Eis unter Rühren inkubieren
- 15 min bei  $10000 \times g$  zentrifugieren
- Säule mit Probe beladen, Flußrate 1 ml/min
- Stufengradient mit Puffer B anlegen (Flußrate 1 ml/min):  
3 ml 0 % B, 3 ml 50 % B, 3 ml 75 % B, 3 ml 90 % B, 5 ml 100 % B
- Fraktionen von 1 ml sammeln und die die Kinase enthaltenen Fraktionen vereinigen
- Fraktionen im Mikrokonzentrator (Centricon™ C 30) einengen und zweimal mit 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 mM DTT waschen
- auf 0,5-1 mg/ml konzentrieren und in 10 µl aliquotieren
- SDS-PAGE zur Reinheitskontrolle, Proteinbestimmung und Kinaseaktivitätstest durchführen

Die gereinigten Kinasen wurden bei -80 °C gelagert.

### 9.3.2.3 Reinigung durch FPLC-Gelfiltration mit Superose 12

Die Reinigung der IRKD-Y1316/22T durch HIC erwies sich als ungeeignet. Die Kinase eluierte bereits bei sehr hohen Ionenstärken von der Säule, was die Ausbeute an Protein in Puffer niedriger Ionenstärke wesentlich verminderte (Kap. 3.6.2). Um die Ausbeute zu erhöhen, wurden die Fraktionen aus der Anionenaustauschchromatographie, die die Kinase zu einem hohen Anteil enthielten, vereinigt und einer Gelfiltration zugeführt. Die Detektion erfolgte bei 280 nm.

Laufpuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 0,15 M NaCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin

- Säule mit Laufpuffer äquilibrieren
- Säule mit Probe (aus Anionenaustauschchromatographie) beladen, Flußrate 0,5 ml/min
- Chromatographie bei konstanter Flußrate von 0,5 ml/min durchführen
- Fraktionen von 1 ml sammeln und die die Kinase enthaltenen Fraktionen vereinigen
- Fraktionen im Mikrokonzentrator (Centricon™ C 30) einengen und zweimal mit 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 mM DTT waschen
- auf 0,5-1 mg/ml konzentrieren und in 10 µl aliquotieren und bei -80 °C lagern
- SDS-PAGE zur Reinheitskontrolle, Proteinbestimmung und Kinaseaktivitätstest durchführen

## 9.4 Protein-Biochemische Methoden

Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidelektrophoresen wurden modifiziert nach Laemmli (1970) und Wilson und Goulding (1991), Tricin (N-tris(Hydroxymethyl-)methylglycin)-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (16,5 % Acrylamid, 3 % N-N'-Methylenbisacrylamid) wurden nach Schagger und Jagow (1987) durchgeführt. Proteinbanden wurden durch Coomassie-Färbung (Färbelösung: 0,1 % Coomassie R-250 in 50 % Methanol, 10 % Essigsäure, Entfärbelösung: 50 % Methanol, 7 % Essigsäure), Peptidfärbung (Blakesley und Boezi, 1977) oder Silberfärbung (Morrissey, 1981) sichtbar gemacht.

### 9.4.1 Transfer und immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membran

Der Transfer von Proteinen erfolgte im Semi-Trockenblot-Verfahren nach der SDS-PAGE auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF, 0,22  $\mu\text{m}$ ) Membran mit kontinuierlichem Puffersystem oder durch manuellen Transfer nach Plekhanov (1996). Vor dem Proteintransfer wurde die Membran für 30 sec. in Methanol aktiviert und anschließend in Blotpuffer äquilibriert.

Blotpuffer: 50 mM Tris, 40 mM Glycin.

Im Semi-Trockenblot-Verfahren erfolgte der Transfer je nach Molekulargewicht des zu analysierenden Proteins für 15-30 min bei einer Stromstärke von 2 mA/cm<sup>2</sup>.

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

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

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

Antikörper:  $\alpha$ -GST-CT: polyklonaler Antikörper gegen GST-CT aus Kaninchen  
 $\alpha$ -PY: monoklonaler Antikörper gegen Phosphotyrosin aus der Maus  
G $\alpha$ R-AP: polyklonaler Antikörper gegen Kaninchen IgG gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase  
G $\alpha$ M-AP: polyklonaler Antikörper gegen Maus IgG gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase

- PVDF-Membran 30 min blocken in 1 % (w/v) Rinderserumalbumin (BSA) in 1 x TBS
- Membran 1 h bei RT inkubieren mit ersten Antikörper inkubieren
- 5 x 5 min mit TBST waschen
- Membran 1 h bei RT inkubieren mit zweiten Antikörper inkubieren
- 5 x 5 min in TBST waschen
- PVDF-Membran mit 5 ml Entwicklungspuffer überschichten, bis Banden sichtbar, stoppen in H<sub>2</sub>O

Entwicklungspuffer: 5 ml: 100 mM Tris/HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>  
33  $\mu\text{l}$ : NBT: 50 mg/ml in 70 % (v/v) Dimethylformamid  
17  $\mu\text{l}$ : BCIP: 50 mg/ml in 100 % (v/v) Dimethylformamid

$\alpha$ -GST-CT wurde 1:1000 in TBS mit 1 % BSA, G $\alpha$ R-AP 1 : 2000 in TBS mit 1 % BSA verdünnt.

Abweichend hierzu wurden für den  $\alpha$ -PY und den Goat-anti-Mouse Antikörper (GaM-AP) alle Lösungen mit 3 % Magermilchpulver und ohne Tween 20 angesetzt.

### 9.4.2 Proteinbestimmung

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

#### Coomassie Spot-Test:

Färbelösung: 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 10 % (v/v) Methanol,  
7 % (v/v) Essigsäure

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

- 1 µl der zu analysierenden Probe auf Filterpapier (Munktell Grade F1) pipettieren
- 1 µl der Standard-Eichreihe (BSA: 0, 1-5 µg/µl) auf Filterpapier pipettieren
- Papier trocknen und mit Färbelösung bedecken
- Papier solange entfärben, bis der Hintergrund weiß ist

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

#### Proteinbestimmung nach Bradford:

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

- 1 µl der zu analysierenden Probe in 100 µl Wasser in einer Mikrotiterplatte vorlegen
- Zugabe von 100 µl Färbelösung und 2 min inkubieren
- Messen der Färbung bei einer Wellenlänge von 595 nm (Referenzwellenlänge 405 nm)

Anhand einer Eichreihe aus 0,1-10 µg BSA/100 µl wird die Proteinkonzentration der Probe ermittelt.

### 9.4.3 Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes durch Gelfiltration

Für die Molekulargewichtsbestimmung der löslichen Kinasen durch Gelfiltration mit Superose 12 wurden die folgenden Standards zur Erstellung einer Eichkurve verwendet: Ribonuklease A (13,7 kDa), Chymotrypsinogen (25 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Rinderserumalbumin (67 kDa), Aldolase (158 kDa), Ferritin (440 kDa). Das Ausschlußvolumen der Säule ( $v_0$ ) wurde mit Dextran 2000 (2000 kDa) bestimmt. Die detektion der Proteine erfolgte photometrisch bei 280 nm. Laufpuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 0,15 M NaCl. Flußrate 0,25 ml/min. Für die Eichung wurde der Verteilungskoeffizient ( $K_{av} = (v_e - v_0) / (v_t - v_0)$ ,  $v_t$  = Gesamtvolumen der Säule,  $v_e$  = Elutionsvolumen bei halbmaximaler Peakhöhe) gegen  $\log(M_r)$  aufgetragen. Für die Analyse der IRKD und ihrer Varianten wurden jeweils 10 µg Protein in nicht oder phosphoryliertem Zustand aufgetragen. Die Phosphorylierungsreaktionen wurden dabei in Abwesenheit von Poly(Lysin) durchgeführt.

### 9.5 Phosphorylierungsreaktionen

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

1 µM Kinase, 1 µCi [ $\gamma$ - $^{32}$ P], 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 250 µM ATP, 1 µM Poly(Lysin), 50 mM Tris/HCl, pH 7,5

Die Reaktionen wurden bei Raumtemperatur durch Zugabe des Enzyms gestartet und durch Zufügen von SDS Probenpuffer beendet. Die Ansätze für Substratphosphorylierungen entsprachen den Ansätzen der Autophosphorylierung. Für die Bestimmung des ATP-Umsatzes wurde zusätzlich 1 µCi [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP eingesetzt. Bei Reaktionen in Gegenwart eines ATP regenerierenden Systems enthielten die Ansätze zusätzlich 10 µg/µl Pyruvatkinase (10 U/µg) und 4 mM Phosphoenolpyruvat.

## 9.6 Bestimmung des Phosphateinbaus

Zur Bestimmung der inkorporierten Radioaktivität nach Auto- oder Substratphosphorylierungsreaktionen wurden zwei Methoden angewendet. Die Radioaktivität des inkorporierten radioaktiven Phosphates wurde durch Messung der Cerenkov-Strahlung im Tritium-( $^3\text{H}$ ) Fenster des  $\beta$ -Szintillationszählers ermittelt.

### Dot-Blot auf Phosphozellulose-Papier (Sahal und Fujita-Yamaguchi 1987):

Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration 20 mM) beendet und 5  $\mu\text{l}$  auf Whatman P81-Papier aufgetragen. Das Papier wurde anschließend dreimal für 15 min mit eiskalter 10 %iger ortho-Phosphorsäure (w/v) und abschließend für 10 min mit Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurden die Probenfelder ausgeschnitten und die Radioaktivität durch Messung der Cerenkov-Zählung bestimmt.

### SDS-PAGE:

Die Reaktion wurde durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Die Proben wurden 5 min bei 95 °C denaturiert und danach die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde 20 min fixiert (70 % Methanol, 7 % Essigsäure) und auf einem Gelrockner zwischen einer Zellulosefolie unter Vakuum getrocknet. Durch Autoradiographie des getrockneten Gels wurden die radioaktiven Proteinbanden lokalisiert und die Banden ausgeschnitten. Die Radioaktivität der Gelstücke wurde durch Messung der Cerenkov-Strahlung bestimmt.

## 9.7 Phosphoaminosäure- und Nukleotidanalyse

### 9.7.1 Tryptische Spaltung von Proteinen im SDS-Gel

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

- Proteinbande aus dem getrockneten SDS-Gel ausschneiden
- Gelstück kurz in  $\text{H}_2\text{O}$  aufweichen und Zellulosefolie entfernen,  $\text{H}_2\text{O}$  entfernen
- Gelstück in 500  $\mu\text{l}$   $\text{CH}_3\text{CN}$  30 min dehydratisieren,  $\text{CH}_3\text{CN}$  abnehmen
- Gelstück 15 min unter Vakuum (Speed-Vac) trocknen
- Gelstück mit 10  $\mu\text{l}$  Spaltungspuffer (50 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , pH 8,3) rehydratisieren
- 10  $\mu\text{l}$  Trypsin (1 mg/ml) ins Gelstück einziehen lassen
- Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Spaltungspuffer
- Inkubation über Nacht bei 37 °C
- Zugabe von 300  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  für 1 h bei 42 °C
- Überstand abnehmen, erneut 300  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  für 1 h zusetzen und Überstände vereinigen

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

### 9.7.2 Phosphoaminosäureanalysen

Die zu analysierenden Proben aus der tryptischen Elution wurden unter Vakuum (Speed-Vac) getrocknet und einer sauren Partialhydrolyse unterworfen (6 N HCl, 1,5 h, 110 °C). Nach Entfernen der Säure unter Vakuum (Speed-Vac) wurden die Proben einmal mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und erneut getrocknet. Die Radioaktivität der getrockneten Eluate wurde im Cerenkov-Zähler bestimmt und die Proben in  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen (1000 cpm/ $\mu\text{l}$ ). Zur Analyse der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung kamen drei Methoden zur Anwendung:

### Dünnschicht-Chromatographie auf Kieselgel 60 (Munoz und Marshall, 1990):

Mobile Phase: Ethanol: 25 % (w/v) Ammoniumhydroxid (2,19:1)  
 Laufbedingungen: 3 Chromatographie-Läufe, bis das Laufmittel ca. 1 cm vom oberen Rand entfernt ist. Platte zwischen den Läufen bei 50 °C trocknen

Eindimensionale Dünnschicht-Elektrophorese auf Zellulose (Boyle et al. 1991):

Laufpuffer: Eisessig/Pyridin/EDTA/H<sub>2</sub>O (10:1:0,2:188,8), pH 3,5

Laufbedingungen: 30 min, 1000 V, 4 °C

Zweidimensionale Dünnschicht-Elektrophorese auf Zellulose (Boyle et al. 1991):

Laufpuffer: 1. Dimension: Ameisensäure 88 %/Eisessig/H<sub>2</sub>O (5:15,6:179,4), pH 1,9

2. Dimension: Eisessig/Pyridin/0,5 M EDTA/H<sub>2</sub>O (10:1:0,2:188,8),

pH 3,5

Laufbedingungen: 1. Dimension: 15 min, 1300 V, 4 °C

2. Dimension: 13 min, 1300 V, 4 °C

Zwischen den Läufen wurden die Platten bei Raumtemperatur getrocknet.

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

**9.7.3 Nukleotidanalyse**

Die Bestimmung des ATP-Umsatzes der IRKD-Autophosphorylierungsreaktion wurde durch Analyse der ATP, ADP und AMP Zusammensetzung durch Dünnschicht-Chromatographie nach Jost und Hauck (1983) durchgeführt. In der Reaktion wurde eine ein Gemisch von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ATP und [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP im Verhältnis 2:1 eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Kinase gestartet. Zu verschiedenen Zeiten wurden Aliquots entnommen. 1 µl des Ansatzes wurde zu 99 µl einer 300 µM EDTA-Lösung gegeben und auf Eis gelagert. Zum gleichen Zeitpunkt wurde die Reaktion durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Die Proteine wurden in einer SDS-PAGE getrennt und die Phosphatinkorporation durch Messung der Cerenkov-Strahlung ermittelt. (vgl. 9.6). Zur Bestimmung der einzelnen Nukleotide (ATP, ADP, AMP) wurden die in EDTA gelösten Proben verwendet. Dazu wurden 1000 cpm (1 µl) auf eine 10 x 10 cm Kieselgel 60 (HPTLC NH<sub>2</sub>F<sub>254</sub>S) Platte aufgebracht. Als Standards wurde jeder Probe je 1 µg ATP, ADP und AMP zugesetzt.

Laufmittel: 200 mM NaCl, 30 % (v/v) Ethanol/H<sub>2</sub>O

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

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

**9.8 HPLC-Analyse tryptischer Peptide der Insulinrezeptorkinase**

Durch tryptische Proteolyse lassen sich aus der cytoplasmatischen phosphorylierten Domäne der löslichen Insulinrezeptorkinase IRKD-HIS Phosphopeptide generieren, die sich durch HPLC-Anionenaustausch-Chromatographie voneinander trennen lassen (Al-Hasani et al. 1997). Die Auftrennung des Phosphopeptid-Gemisches durch HPLC-Anionenaustausch-Chromatographie (Trennsäule: Nucleogel SAX1000-8/46, 50 × 4,6 mm) mit einem zweistufigen Salzgradient führt zur Separation von 14 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 Autophosphory-

lierungsreaktionen dieser Enzyme in der identischen Besetzung der Autophosphorylierungsstellen resultiert (Tennagels 1995, Magg 1997). Das von Al-Hasani standardisierte Protokoll erlaubt demnach die Analyse des Phosphorylierungsstatus der einzelnen Phosphorylierungsstellen im Enzym. Für die Phosphopeptid-Kartierung wurden Auto- und Substratphosphorylierungsreaktionen durchgeführt (Kap. 9.5). Nach der Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE wurde das Gel getrocknet, die Proteinbande durch Autoradiographie lokalisiert und ausgeschnitten. Das Gelstück wurde durch tryptische Spaltung eluiert (Kap. 9.7.1) und die HPLC-Analyse durchgeführt. Die Probe sollte wenigstens 10000 cpm enthalten und ein Volumen von 700  $\mu$ l 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 Cerenkov-Strahlung ermitteln.

Die Phosphoaminosäure-Zusammensetzung einzelner Signalspitzen des Elutionsprofils kann durch Phosphoaminosäureanalyse ermittelt werden (Kap. 9.7.2). Dazu muß allerdings zuvor das in den Fraktionen störende Salz durch Reversed-Phase-Chromatographie mit Hilfe einer C<sub>8</sub>-Säule entfernt werden:

- vereinigte Fraktionen einer Signalspitze auf 0,1 % Trifluoressigsäure in H<sub>2</sub>O (TFA, v/v) einstellen
- C<sub>8</sub>-Säule mit 0,1 % (v/v) TFA in H<sub>2</sub>O äquilibrieren
- Probe mit Spritze auf Säule auftragen
- Säule mit 1 ml 0,1 % (v/v) TFA in H<sub>2</sub>O waschen
- Elution der Peptide mit 0,5 ml 0,1 % (v/v) TFA in Isopropanol
- Lösungsmittel unter Vakuum (Speed Vac) entfernen, Phosphoaminosäureanalyse durchführen

### **9.9 Reinigung phosphorylierter Proteine von nicht umgesetztem radioaktiv markiertem ATP**

Zur Entfernung nicht umgesetzten radioaktiv markierten ATP nach der Phosphorylierungsreaktion (Kap. 9.5) wurde der Reaktionsansatz durch Gelfiltration (Säulenpuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 0,1 M NaCl, 1 mg/ml BSA (w/v)) gereinigt.

- Superdex-G25 superfine mit 10 Bettvolumen Säulenpuffer äquilibrieren
- 1,5 ml gesetztes Gelmaterial in eine, mit einer Fritte verschlossenen 2 ml Spritze füllen, 1 ml Säulenpuffer auftragen und die so hergestellte Säule durch Zentrifugation in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß eluieren (1000  $\times$  g, Vorgang dreimal wiederholen)
- 150  $\mu$ l Säulenpuffer auftragen und Säule durch Zentrifugation eluieren (2 min, 1000  $\times$  g). Vorgang solange wiederholen, bis aufgegebenes Volumen und Elutionsvolumen übereinstimmen
- Säule ohne Auftrag von Säulenpuffer durch Zentrifugation für 2 min bei 1000  $\times$  g eluieren.
- Phosphorylierungsansatz (120  $\mu$ l) auf 0,1 M NaCl, 1 mg/ml BSA mit einem Endvolumen von 150  $\mu$ l einstellen
- Probe auf vorbereitete Säule auftragen und durch Zentrifugation bei 1000  $\times$  g für 2 min in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß eluieren.
- Eluat erneut auf eine neue, in gleicher Weise vorbereitete Gelfiltrationssäule aufgeben und Vorgang wiederholen.

Der Reinigungsverlauf wird durch SDS-PAGE und Analyse des radioaktiven Nukleotidanteils dokumentiert, mit diesem Verfahren können 90 % der eingesetzten Ausgangsradioaktivität entfernt werden.



### Immunpräzipitation:

- Überstand (aus Kap. 9.10.3) mit 200  $\mu$ l Gelmaterial (nicht mit Antikörper gekoppelt) für 1 h bei 4 °C unter Rotation inkubieren
- Gelmaterial abzentrifugieren (3000  $\times$  g, 5 min, 4 °C)
- Überstand mit 200  $\mu$ l SepharoseA Beads (gekoppelt mit  $\alpha$ -IR oder  $\alpha$ -PY Antikörper) 16 h bei 4 °C unter Rotation inkubieren
- Gelmaterial abzentrifugieren (3000  $\times$  g, 5 min, 4 °C) und Überstand verwerfen
- Gelmaterial viermal mit jeweils 1 ml eiskaltem RIPA waschen
- Gelmaterial einmal mit 1 ml TE-Puffer waschen
- Gelmaterial in 20  $\mu$ l SDS-Probenpuffer aufnehmen und für 5 min auf 95 °C erhitzen
- Probenpuffer abnehmen, Gelmaterial erneut in 20  $\mu$ l Probenpuffer aufnehmen und für 5 min auf 95 °C erhitzen
- Proben vereinigen und SDS-PAGE durchführen (7 %)

Nach Durchführen der SDS-PAGE wurde das Gel getrocknet und die  $\beta$ -Untereinheit des Insulinrezeptor durch Autoradiographie identifiziert. Zusätzlich wurde ein Teil des Immunpräzipitats durch Western-Blotting analysiert. Der immunologische Nachweis der  $\beta$ -Untereinheit erfolgte durch  $\alpha$ -PY-Antikörper oder  $\alpha$ -IR-Antikörper und Chemolumineszenz-Detektion mit dem ECL-Kit System (Amersham) nach Herstellerangaben.

### **9.11 Computeranalyse**

Für die Simulation von Restriktionsspaltungen und Ligationen verschiedener DNA-Sequenzen und Vektoren wurden das Programm Clone 3.11 (Scientific & Educational Software) verwendet. Oligonukleotid-Primer für die PCR wurden mit dem Programm Oligo entworfen und analysiert. Homologie- und Sequenzvergleiche wurden mit SIM ([www.dot.imgen.bcm.tcm.edu](http://www.dot.imgen.bcm.tcm.edu)) durchgeführt. Die in dieser Arbeit vorgestellten Graphen wurden mit dem Programm Origin (Mikrocal Software) gezeichnet. Die Bestimmung der kinetischen Konstanten  $K_m$  und  $V_{max}$  der IRKD für Auto- und Substratphosphorylierungen erfolgte mit dem Programm Hyper Kinetics. Die Bestimmung des pI und des Molekulargewichtes der Proteine erfolgte über das im Internet zugängliche Programm PROWL.

## 10 Material

### 10.1 Chemikalien

Aceton, z.A.	Merck, Darmstadt
Acetonitril, gradient grade	Merck, Darmstadt
N-Acetyl-D-glucosamin	Sigma, Deisenhofen
Acrylamid, 2x krist., p.a.	Serva, Heidelberg
Acrylamid, 4x krist., analytical grade	Serva, Heidelberg
Adenosin-5'-diphosphat (ADP), krist. Dinatriumsalz	Boehringer, Mannheim
Adenosin-5'-monophosphat (AMP), krist. Dinatriumsalz	Boehringer, Mannheim
Adenosin-5'-triphosphat (ATP), krist. Dinatriumsalz	Boehringer, Mannheim
Adenylyl-imidodiphosphat (AMP-PNP)	Boehringer, Mannheim
Agarose	Seakem, Hameln
Ameisensäure, 98- 100 %	Merck, Darmstadt
Ammoniumacetat	Fluka, Buchs/ Schweiz
Ammoniumcarbonat	Merck, Darmstadt
Ammoniumhydroxid-Lösung, 25 %	Fluka, Buchs/ Schweiz
Ammoniumper(oxodi)sulfat (APS), analytical grade	Serva, Heidelberg
Ammoniumsulfat, p.a.	Merck, Darmstadt
Bayol F Siliconöl	Serva, Heidelberg
Bind Silan A-174	LKB/ Pharmacia, Freiburg
Borsäure, p.a.	Merck, Darmstadt
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau (BPB), Natriumsalz, research grade	Serva, Heidelberg
(Coomassie Brillant) Blue G-250	Serva, Heidelberg
(Coomassie Brillant) Blue R-250	Serva, Heidelberg
2,7-Diamino-10-ethyl-9-phenyl-phenanthridiniumbromid (Ethidiumbromid)	Sigma, Deisenhofen
Di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
N, N'-Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
ε-Dinitrophenyl-L-Lysin-hydrochlorid (DNP-Lys)	Sigma, Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure, > 97 %, p.a.	Roth, Karlsruhe
Ethanol absolut, p.a.	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA, Titriplex III®), p.a.	Merck, Darmstadt
Glutathion, reduziert (GSH)	Boehringer, Mannheim
Glycerol (Glycerin)	Serva, Heidelberg
Glycin, electrophoresis grade	ICN, Aurora/ Ohio/ USA
N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure] (HEPES), analytical grade	Serva, Heidelberg
Isopropanol, p.a.	Merck, Darmstadt
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Biomol, Hamburg
Kaliumchlorid-hexahydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat, p.a.	Merck, Darmstadt
di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid, Plätzchen	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid-Hexahydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
Mangan(II)chlorid-Tetrahydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
Methanol, p.a.	Roth, Karlsruhe

N, N'-Methylenbisacrylamid, research grade	Serva, Heidelberg
Natriumacetat, wasserfrei, p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumazid, reinst	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat, wasserfrei, p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid, p.a.	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma, Deisenhofen
Natriumpyrophosphat-Decahydrat, p.a.	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydroxid, Plätzchen	Merck, Darmstadt
Natronlauge (Titrisol <sup>®</sup> )	Merck, Darmstadt
Ninhydrin, p.a.	Merck, Darmstadt
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Sigma, Deisenhofen
(PCR-) Nucleotide-Mix	Boehringer, Mannheim
Paraformaldehyd, reinst	Serva, Heidelberg
Perchlorsäure, 70 %	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen
o-Phospho-L-Serin	Sigma, Deisenhofen
o-Phospho-L-Threonin	Sigma, Deisenhofen
o-Phospho-L-Tyrosin	Sigma, Deisenhofen
o-Phosphorsäure, 99 % krist., reinst, p.a.	Merck, Darmstadt
Polyethylenglykol 8000 (PEG-8000) bzw. 6000	Serva, Heidelberg
Poly(Glu:Tyr), 4:1	Sigma, Deisenhofen
Poly-L-Lysin, Hydrobromid	Sigma, Deisenhofen
Pyridin, p.a.	Merck, Darmstadt
Repel-Silane ES Plus one	Pharmacia, Freiburg
D(+)-Saccharose, kristallin, p.a.	Roth, Karlsruhe
Salzsäure, 25 %	Merck, Darmstadt
Silbernitrat, p.a.	Merck, Darmstadt
N, N, N', N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Trichloressigsäure (TCA), kristallin	Sigma, Deisenhofen
Trifluoressigsäure (TFA), f. d. Spektr.	Merck, Darmstadt
Triton-X-100 <sup>®</sup> , p.a.	Boehringer, Mannheim
Tris[hydroxymethyl]aminomethan (TRIS)	Sigma, Deisenhofen
N-Tris[hydroxymethyl]methylglycin (Tricin)	Fluka, Buchs/ Schweiz
Tween-20 (Polyoxyethylensorbitmonolaureat)	Bio-Rad, München
Xylen-Cyanol FF (XC)	Sigma, Deisenhofen

## 10.2 Radiochemikalien

[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-Adenosin-5'-Triphosphat, > 3000 Ci/mmol	Amersham, Braunschweig
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-Adenosin-5'-Triphosphat, > 5000 Ci/mmol	Amersham, Braunschweig
[ $\alpha$ - <sup>35</sup> S]-Desoxyadenosin-5'-[ $\alpha$ -Thio]-Triphosphat,	Amersham, Braunschweig
[ <sup>32</sup> P]-Orthophosphat, 40 mCi/ml	Amersham, Braunschweig

## 10.3 Antikörper und Enzyme

### Antikörper:

G $\alpha$ R-AP (goat anti rabbit, alkalische Phosphatase konjugiert)	Boehringer, Mannheim
G $\alpha$ M-AP (goat anti mouse, alkalische Phosphatase konjugiert)	Bio-Rad, München
$\alpha$ pTyr (monoklonaler Antikörper (Maus) anti Phosphotyrosin)	Boehringer, Mannheim
$\alpha$ -GST-CT (polyklonaler Antikörper gegen GST-CT (Kaninchen))	H. Al-Hasani (1995)
$\alpha$ -IR (monoklonaler Antikörper gegen Insulinrezeptor)	K. Siddle (Cambridge)

DNA-modifizierende-Enzyme:

Ribonuclease A	USB, Cleveland/ Ohio/ USA
T4-DNA-Ligase	Boehringer, Mannheim
T7-DNA-Polymerase	Pharmacia, Freiburg
Vent <sup>®</sup> -DNA-Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach

Restriktionsenzyme

Boehringer, Mannheim

Proteasen:

Restriktionsprotease Faktor Xa (aus Rinderplasma)	Boehringer, Mannheim
Trypsin (aus Rinderpankreas)	Boehringer, Mannheim
Trypsin, Sequencing grade	Sigma, Deisenhofen

Proteine:

Eichproteine für Gelfiltration	Boehringer, Mannheim
Histon 2b, Myelin Basic Protein	Boehringer, Mannheim
Insulin ( <i>porcine monokomponent</i> )	Novo, Dänemark
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Rinderserumalbumin (BSA), Cohn fraction V, pure	Serva, Heidelberg

**10.4 Nukleinsäuren****10.4.1 Plasmidvektoren**

pGEX-3X (Bakterieller Expressionsvektor)	Pharmacia, Freiburg
pUC19	Pharmacia, Freiburg
pVL1393	Pharmingen, San Diego/ USA

**10.4.2 Oligonukleotide**Sequenzierungsprimer:

Zur Kontrolle der Mutation in IRKD-Y1316/22F, IRKD-Y1316/22T, GST-CTphe und GST-CT-thr:

CT-upper:	5'-GCACCCCAGCTTTCCAGAGG-3'
CT-lower:	5'-CCAGAGGAAAGCGAAAATGG-3'

Mutagenese-Primer für die Generierung von IRKD-Y1316/22F, IRKD-Y1316/22T, GST-CTphe und GST-CT-thr:

mutphe-upper:	5'-CAAGCGGAGCTTCGAGGAACACATTCCTTTCACACACATG-3'
mutphe-lower:	5'-CATGTGTGTGAAAGGTATGTGTTCCCTCGAAGCTCCGCTTG-3'
mutthr-upper:	5'-CAAGCGGAGCACCGAGGAACACATTCCTACCACACACATG-3'
mutthr-lower:	5'-CATGTGTGTGGTAGGAATGTGTTTCCCTCGGTGCTCCGCTTG-3'
selection primer:	5'-GAGTGCACCATGGGCGGTGTGAAAT-3'

Die in Auftrag gegebenen Oligonucleotide wurden von der Firma EUROGENTEC/Belgien oder Pharmacia/Freiburg synthetisiert.

**10.5 Chromatographie**

Chromabond C <sub>8</sub> -Säulen	Macherey & Nagel, Düren
Glutathion-Sepharose 4B	Pharmacia, Freiburg
HighTrap SP	Pharmacia, Freiburg
MonoQ/ResourceQ	Pharmacia, Freiburg
Phenylsepharose Fast Flow (High Sub)	Pharmacia, Freiburg
Nucleogel SAX 1000-8/46 (50 x 4,6 mm)	Macherey & Nagel, Düren

## 10.6 Bakterien, Zell-Linien, Viren, Kulturmedien und -zusätze

<i>Autographa californica</i> Nuclear Polyhedrosis Virus (AcNPV)	Pharmingen, San Diego/ USA
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Dr. S. Stabel, Max-Delbrück-Laboratorien, Köln
<i>E. coli</i> BMH <i>mutS</i>	Clonetech
<i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf9-Zellen)	Dr. S. Stabel, Max-Delbrück-Laboratorien, Köln
A14	Dr. A.M. Maassen, Leiden
CHO800	Dr. A.M. Maassen, Leiden
Amphotericin B	Life Technologies, Eggenstein
Ampicillin, Natriumsalz	Fluka, Buchs/ Schweiz
Fötales Kälberserum	Life Technologies, Eggenstein
Gentamycinsulfat	Life Technologies, Eggenstein
DMEM	Life Technologies, Eggenstein
DMEM (Phosphatfrei)	Life Technologies, Eggenstein
Grace's Insektenmedium	Life Technologies, Eggenstein
LB-Broth Base-Medium	Life Technologies, Eggenstein
LB-Agar	Life Technologies, Eggenstein

## 10.7 Molekulargewicht-/Längenstandards

Broad Range Marker	Bio-Rad, München
Kaleidoscope Polypeptide Standard	Bio-Rad, München
Low Range Marker (Peptidmarker)	Pharmacia, Freiburg
Prestained SDS Molecular Weight Marker	Sigma, Deisenhofen
1kb DNA Ladder	Life Technologies, Eggenstein
DNA-Längenstandard VIII	Boehringer, Mannheim
DNA-Längenstandard V	Boehringer, Mannheim

## 10.8 Kit-Systeme

Plasmid Mini Kit/Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Qiaex II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Sephaglas <sup>TM</sup> Band Prep Kit	Pharmacia, Freiburg
<sup>17</sup> Sequencing <sup>TM</sup> Kit	Pharmacia, Freiburg
Transformer <sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit	Clontech, Palo Alto
QuikChange <sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg

## 10.9 Verbrauchsmaterial

Centricon <sup>TM</sup> C 10/C 30- Microconcentrator	Amicon, Witten/ Ruhr
DC-Plastikfolien (Cellulose)	Merck, Darmstadt
Elektrodendochte, 240x 60x 1 mm	Serva, Heidelberg
Filmmaterial:	
BIOMAX <sup>TM</sup> MS (Kodak)	Amersham, Braunschweig
GBX- Developer (Kodak)	Amersham, Braunschweig
GBX- Fixer (Kodak)	Amersham, Braunschweig
Hyperfilm <sup>TM</sup> MP	Amersham, Braunschweig
Sofortbildfilm SW Typ 665/Typ 667	Polaroid, USA
X-Omat AR-Film (Kodak)	Amersham, Braunschweig
Filtermaterial:	

0,2 µm Dynagard ME Sterilfilter	Microgon, California/ USA
0.22 µm Type GS (Ø 4.9 cm)	Millipore, Bedford/ USA
0.45 µm Type GS (Ø 4.9 cm)	Millipore, Bedford/ USA
Filterpapier Munktell Grade 1F	LKB/ Pharmacia, Freiburg
HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60	Merck, Darmstadt
HPTLC-Fertigplatten NH <sub>2</sub> F <sub>254</sub> S	Merck, Darmstadt
Mikrotiterplatten Linbro	Flow Laboratories, Meckenheim
Nitrocellulosemembran, 0,45 µM	Schleicher & Schüll, Dassel
PVDF-Membran Immobilon P (0.22 µm)	Millipore, Bedford/ USA
Zellulosephosphat-Papier P 81	Whatman, Maidstone/ GB

### 10.10 Laborausstattung

#### Autoklaviergeräte:

Tischautoklav tuttnauer 2540 EL	Tuttnauer, Jerusalem/ Israel
Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik, München
β-Counter LS 6500	Beckman, München

#### Blot-Apparatur:

2117 Multiphor II Electrophoresis unit + 250 Novablot Electrophoretic transfer kit	LKB/ Pharmacia, Freiburg
Brutschrank E/B 28 und FD53	WTB Binder, Tuttlingen
Brutkühlschrank BK6160	Heraeus, Düsseldorf

#### Elektrophorese-Apparaturen:

Mupid <sup>®</sup> -2	Cosmo Bio Co.
GNA-100	Pharmacia, Freiburg
Mighty- Small II	Hoefer, San Francisco/ USA
Pharmacia LKB Macrophor	Pharmacia, Freiburg
Protean <sup>™</sup>	Bio-Rad, München
Filterereinheit für 0,22 µm-Filter	Millipore, Bedford/ USA

#### FPLC

Frac-100	Pharmacia LKB, Freiburg
REC 102	
Pharmacia LKB, Freiburg	
VWM 2141	Pharmacia LKB, Freiburg
Controller LCC-501 plus	Pharmacia LKB, Freiburg
Pump P500	Pharmacia LKB, Freiburg
Pump 1	Pharmacia LKB, Freiburg
Motorvalve MV8/MV7	Pharmacia LKB, Freiburg
Conductivity Monitor	Pharmacia LKB, Freiburg
BioLogic Chromatographieanlage	Bio-Rad, München
Geltrockner PH-t 20	Biotec Fischer, Reiskirchen
Heizblock, HB-130	Unitek

#### HPLC-Anlagen:

SCL-6B Controller	Shimadzu, Kyoto/ Japan
LC-6A Liquid Chromatograph Pumpe (2x)	Shimadzu, Kyoto/ Japan
Uvicord SD Photometer	LKB/ Pharmacia, Freiburg
2112 Redirac Fraktionssammler	LKB/ Bromma/ Schweden
System Gold <sup>®</sup> , 127 NM Solvent Module	Beckman, München
System Gold <sup>®</sup> , 166 NM Detector	Beckman, München

#### Kamerasystem:

MP4 Land Camera	Polaroid Co., USA
Bio-Rad GelDoc 1000	Bio-Rad, München

Lyophilisationssystem:

Speed Vac SC 100

RVT 4104 (Refrigerated Vapor Trap)

Vakuumpumpe RC-4

Mastercycler® 5330

MICROPLATE READER Model 550

Mikroskop Wilovert S

pH-Meter, 761, CalimaticPhosphoimager:

GS-363 Molecular Imager® System

GS-505 Sample Exposure Platform

GS-505 Screen Eraser

Molecular Imager® Screen-BI

Molecular Imager® Screen-CS

Mitsubishi Digital Colour Printer CP-D1E

Photometer:

Photometer DU 7400

Rühr- Schüttel- und Mischgeräte:

Diffusionsentfärbungs-Apparatur

Ikamag Magnetrührer mit Heizplatte

Magnetrührer Reverstir Model RS 8

Rolleninkubator RM-5 Assistent

Incubator Shaker innova 4000

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

Thermomixer 5436

Variomag Elektronikrührer

Rotoren:

HFA 12.500, 14.500, 22.50, 8074 H

Ti 45, Ti 17, Ti 70, SW 60

Schlauchpumpe Minipuls 2

Spannungsgeber:

Sterilbank LB 48 C Lamin Air®

Teflon-Glas-Homogenisator

Ultraschallgerät + Branson Sonifier Power Supply

UV-Tisch 2011 Macrovue Transilluminator

Vakuubrand, Membranvakuumpumpe

Waagen:

Analysenwaage

Feinwaage

Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q Plus

Wasserbäder:

Julabo 13A

Julabo F10

Zentrifugen:

Centrifuge 5415 C

Hettich Universal 30 RF, EBA 12R

Mikrozentrifuge Hf-120 Capsule

Variofuge 20RS, 3.0RS

XL-70 Ultrazentrifuge

Savant, Farmingdale/ USA

Savant, Farmingdale/ USA

Vacuubrand, Wertheim

Eppendorf, Hamburg

Bio-Rad, München

Hund, Wetzlar

Knick, Berlin

Bio-Rad, München

Bio-Rad, München

Bio-Rad, München

Bio-Rad, München

Bio-Rad, München

Bio-Rad, München

Beckman, München

Desaga, Heidelberg

Janke &amp; Kunkel, Staufen

Toyo Kagaku Sangyo Co., Japan

Braun Melsungen

New Brunswick Sci., Edison, USA

Janke &amp; Kunkel, Staufen

Eppendorf, Hamburg

H+P Labortechnik, München

Heraeus, Düsseldorf

Beckman, München

Gilson, Arnouville Les Gonesse, F

Pharmacia, Freiburg

Bio-Rad, München

Heraeus, Düsseldorf

Braun, Melsungen

Branson Instruments, Danbury,

USA

LKB/ Pharmacia, Freiburg

Vakuubrand, Wertheim

Sartorius, Leichlingen

Sartorius, Leichlingen

Millipore, Bedford/USA

Julabo, Seelbach

Julabo, Seelbach

Eppendorf, Hamburg

Hettich, Tuttlingen

Qualitron/ Korea

Heraeus, Düsseldorf

Beckman, München

**11 Literatur**

- Affüpper, M.** Inauguraldissertation an der Universität Köln (1997)
- Ahn, J.,** Donner, D.B. und Rosen, O.M. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 7571-7576
- Alessi, D.R.,** Andjelkovic, M. Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., Hemmings, B.A. (1996) *EMBO J.*, **15**, 6541-6551
- Al-Hasani, H.,** Eisermann, B., Tennagels, N., Magg, C. Paßlack, W., Koenen, M., Müller-Wieland, D., Meyer, H.E. und Klein, H.W. (1997) *Febs Lett.*, **400**, 65-70
- Al-Hasani, H.,** Inauguraldissertation an der Universität zu Köln (1995)
- Al-Hasani, H.,** Paßlack, W., Klein, H.W. (1994) *Febs-Letters*, **349**, 17-22
- Anderson, C.M. und Olefsky, J.M.** (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 21760-21764
- Anderson, N.G.,** Maller, J.L., Tonks, N.K. und Sturgill, T.W. (1990) *Nature*, **343**, 651-653
- Ando, A.,** Momomura, K., Tobe, K., Yamamoto-Honda, R., Sakura, H., Tamori, Y., Kaburagi, Y., Koshio, O., Akanuma, Y., Yazaki, Y., Kasuga, M. und Kadowaki, T. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 12788-12796
- Ando, A.,** Yonezawa, K., Gout, I., Nakata, T., Ueda, H., Hara, K., Kitimura, Y., Noda, Y., Takenawa, T., Hirokawa, N., Kasuga, M. (1994) *EMBO J.*, **13**, 3033-3038
- Araki, E.,** Lipes, M.A., Patti, M.E., Brüning, J.C., Haag, B., Johnson, R.S. und Kahn, C.R. (1994) *Nature*, **372**, 1186-1190
- Araki, E.,** Sun, X.J., Hagg, B.L., Chuang, L.M., Yang-Feng, T., White, M.F. und Kahn, C.R. (1993) *Diabetes*, **42**, 1041-1044
- Aretz, P.** Diplomarbeit an der Universität Köln (1994)
- Argentsinger, L.S. und Shafer, J.A.** (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 22095-22101
- Arrandale, J.M.,** Gore-Willse, A., Rocks, S., Ren, J.M., Zhu, J., Davis, A., Livingston, J.N., Rabin, D.U (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 21353-21358
- Asamoah, K.A.,** Atkinson, P.G.P., Carter, W.G. und Sale, G.J. (1995) *Biochem. J.*, **308**, 915-922
- Authier, F.,** Posner, B.I., Bergeron, J.J.M. (1996) *Clin Invest Med*, **19**, 149-160
- Baass, P.C.,** Di Guglielmo, G.M., Authier, F., Posner, B.I., Bergeron, J.J.M. (1995) *Trends Cell Biol.*, **5**, 465-470
- Backer, J.M.** Kahn, C.R., White, M.F. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 1694-1701
- Backer, J.M.,** Kahn, C.R., Cahill, D.A., Ullrich, A., White, M.F. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 16450-16454
- Backer, J.M.,** Myers, Jr., M.G., Shoelson, S.E., Chin, D.J., Sun, X.J., Margolis, B., Skolnik, Y., Schlessinger, J. und White, M.F. (1992) *EMBO J.*, **11**, 3469-3479
- Ballotti, K.,** Kowalski, A., Le Marchand-Brustel, Y. und Van Obberghen, E. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **139**, 179-185
- Baltensperger, K.,** Lewis, R.E, Woon, C.W., Vissavajhala, P. Ross, A.H. und Czech, M.P. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **89**, 7885-7889
- Barker, R.** (1971) *Organic Chemistry of Biological Compounds*, p. 57, Prentice-Hall, Englewood-Cliffs, NJ
- Baron, C.,** Kaliman, P., Gautier, N., Van Obberghen, E. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 23290-23294
- Baron, V.,** Gantier, N., Komoria, A., Hainaut, p., Scimeca, J.C., Mervic, M., Lavielle, S., DoLais-Kitabji, J. und Van Obberghen, E. (1990) *Biochemistry*, **29**, 4634-4641
- Baron, V.,** Kaliman, P., Alengrin, F., Van Obberghen, E. (1995) *Eur. J. Biochem.*, **229**, 27-34
- Beemelmans, U.** Inauguraldissertation an der Universität Köln (1997)
- Behle, B.** Diplomarbeit an der Universität Köln (1997)
- Bennecke, H.,** Flier, J.S. und Moller, D. (1992) *J. Clin. Invest.*, **89**, 243-250
- Bennet W.S. und Steitz T.A.** (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **75**, 4848-4852
- Bennet, M. und Spray, D.** (1985) Cold Spring Harbor Laboratory
- Bernier, M.,** Liotta, A.S., Kole, H.K., Shock, D.D., Roth, J. (1994) *Biochemistry*, **33**, 4343-4351
- Bevan, A.P.,** Burgess, J.W., Drake, P.G., Shaver, A., Bergeron, J.J.M., Posner, B.I. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 10784-10791

- Bevan, A.P.**, Drake, P.G., Bergeron, J.J.M., Posner, B.I. (1996) *TEM*, **7**, 13-21
- Biener, Y. und Zick, Y.** (1990) *Eur. J. Biochem.*, **194**, 243-250
- Blakesley, R.W. und Boezi, J.A.** (1977) *Anal. Biochem.*, **82**, 580-582
- Böni-Schnetzler, M.**, Rubin, J.B. Pilch, P.F. (1986) *J. Biol. Chem*, **262**, 15281-15287
- Bork, P.**, Margolis, B. (1995) *Cell*, **80**, 693-694
- Bossemeyer, D.**, Engh, R.A., Kinzel, V., Ponstingl, H. und Huber, R. (1993) *EMBO J.*, **12**, 849-854
- Bottaro, D.P.**, Bonner-Weir, S. und King, G.L. (1989) *J. Biol. Chem*, **264**, 5916-5923
- Boyle, J.W.**, van de Geer, P. und Hunter, T. (1991) *Meth. Enzymol.*, **201**, 110-149
- Bradford, M.M.** (1976) *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254
- Brunnati, A.M.**, Pinna, L.A., Bergantino, E., Ruzzene, M., Cirri, P., Ramponi, G., Donella-Deanna, D. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **243**, 700-705
- Burgess, J.W.**, Wada, I., Ling, N., Khan, M.N., Bergeron, J.J.M., Posner, B.I. (1992) *J. Biol. Chem*, **267**, 10077-10086
- Cann, A.D. und Kohanski, R.A.** (1997) *Biochemistry*, **36**, 7681-7689
- Carter, W.G.**, Asamoah, K.A und Sale, G.J. (1995) *Biochemistry*, **34**, 9488-9499
- Chardot, T.**, Shen, H., Meunier, J.C. (1995) *C R Acad Sci III*, **318**, 937-942
- Cheatham, B. und Kahn, C.R.** (1992) *J. Biol. Chem*, **267**, 7108-7115
- Cheatham, B.**, Vlahos, C.J., Cheatham, L., Wang, L., Blenis, J. und Kahn, C.R. (1994) *Mol. Cell Biol.*, **14**, 4902-4911
- Chen, D.I.**, Van Horn, D.J., White, M.F., Backer, J.M. (1995) *Mol. Cell Biol.*, **15**, 4711-4717
- Chin, J.E.**, Dickens, M., Tavare, J.M. und Roth, R.A. (1993) *J. Biol. Chem*, **268**, 6338-6347
- Chi-Ying, F.**, Yuan, C.J., Luo, S. und Graves, D.J. (1994) *Biochemistry*, **33**, 5877-5883
- Chou, C.K.**; Dull, T.J.; Russel, D.S.; Gherzi, R.; Lebwohl, D.; Ullrich, A. und Rosen, O.M. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 1842-1847
- Chung, C.T.**, Niemela, S.L. und Miller, R.H. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **86**, 2172
- Clark, S. und Konstantopoulos, N.** (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **200**, 330-337
- Cobb, M.H.**, Sang, b.C., Gonzales, R., Goldsmith, E. und Ellis, L. (1989) *J. Biol. Chem*, **264**, 18701-18706
- Coghlan, M.P. und Siddle, K.** (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **193**, 371-377
- Coghlan, M.P.**, Pillay, T.S, Tavare, J.M. und Siddle, K. (1994) *Biochem. J.*, **303**, 893-899
- Collier, E.**, Carpentier, J.L., Beitz, L., Caro, I.H.P., Taylor, S.I. und Gorden, P. (1993) *Biochemistry*, **32**, 7818-7823
- Conn, S.** (1997) Praktikumsbericht, Honours School of Biochemistry, Manchester
- Cozzone A.J.**, (1998) *Biochimie*, **80**, 43-48
- Cuatrecasas, P.** (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **69**, 319-322
- Danielsen, A.G. und Roth, R.A.** (1996) *Endocrinology*, **137**, 5326-5331
- De Meis, L.** (1993) *Arch. Biochem. Biophys.*, **268**, 14553-14556
- De Meyts, P.** (1995) *Diabetologia*, **37**, 135-148
- De Meyts, P.**, Christoffersen, C.T., Latur, J.L., Carbonelle, C., Wallach, B., Grosnkov, K., Gu, J.L., Vissing, H. und Shimko, R.M. (1993) *Exp. Clin. Endocrinol.*, **101**, 17-19
- den Hertog, J.**, Tracy, S., Hunter, T. (1994) *EMBO J.*, **13**, 3020-3032
- Deng, W.P. und Nickoloff, J.A.** (1992) *Anal. Biochem.*, **200**, 81
- Dhand, R.**, Hara, K. Hiles, I., Bax, B., Gout, I., Panayoto, G., Fry, M.J., Yonezawa, K., Kasuga, M. und Waterfield, M.D. (1994) *EMBO J.*, **13**, 511-521
- Dickens, M. und Tavare, J.M.** (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **186**, 244-250
- Drake, P.G. und Posner, B.I.** (1998) *Mol. Cell Biol.*, **182**, 79-89
- Duclos, B.**, Marcandier, S. und Cozzone, A.J. (1991) *Meth. Enzymol.*, **201**, 10-21
- Duronio, V. und Jacobs, S.** (1990) *Endocrinology*, **127**, 481-487
- Ebina, Y.**, Ellis, L., Jarnagin, K., Edery, M., Graf, L., Clauser, E., Ou, J.H., Marsiarz, F., Kann, Y.W., Goldfine, I.D., Roth, R.A., Rutter, W.J. (1985) *Cell*, **40**, 747-758
- Ebina, Y.**; Araki, E.; Taira, M.; Shimada, F.; Mori, M.; Craik, C.S.; Siddle, K.; Pierce, S.B.; Roth, R.A. und Rutter, W.J. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 704-708
- Eck, M.J.**, Dhe-Paganon, S., Trüb, T., Nolte, R.T., Shoelson, S.E. (1996) *Cell*, **85**, 695-705

- Ellis, L.**, Levitan, A., Cobb, M.H., Ramos, P. (1988) *J. Virology*, **62**, 1634-1639
- Fantl, W.J.**, Escobedo, J.A., Martin, G.A., Turck, C.W., Del Rossario, M., McCormick, F. und Williams, L.T. (1992) *Cell*, **69**, 413-423
- Fauman, E.B.**, Yuvaniyama, C., Schubert, H.L., Stuckey, J.A., Saper, M.A. (1996) *J. Biol. Chem*, **271**, 18780-18788
- Featherstone, C. und Russel, P.** (1991) *Nature*, **349**, 808-811
- Feener, E.P.**, Backer, J.M., King, G.L., Wilden, P.A., Sun, X.J., Kahn, C.R. und White, M.F. (1993) *J. Biol. Chem*, **268**, 11256-11264
- Feener, E.P.**, Shiba, T., Hu, K.Q., Wilden, P.A., White, M.F. und King, G.L. (1994) *Biochem. J.*, **303**, 43-50
- Feng, G.S.**, Hui, C.C., Pawson, T. (1993) *Science*, **259**, 1607-1614
- Ferrell, J.E. und Bhatt, R.R.** (1997) *J. Biol. Chem*, **272**, 19008-19016
- Fernandez, R.**, Tabarini, D., Frasch, M., Schlessinger, J. (1995) *EMBO J.*, **14**, 3373-3384
- Fernandez-Almonacid, R. Rosen, O.M.** (1987) *Mol. Cell Biol.*, **7**, 2718-2727
- Flores-Riveros, J.R.**, Sibley, E., Kastelic, T. und Lane, M.D. (1989) *J. Biol. Chem*, **264**, 21557-21572
- Flörke, R.-R.**, Klein, H.W., Reinhauer, H. (1990) *Eur. J. Biochem.*, **191**, 473-482
- Frantz, J.**, Giorgetti-Peraldi, S., Ottinger, E., Shoelson, S. (1997) *J. Biol. Chem*, **272**, 2659-2667
- Frattali, A.L.**, Treadway, J.L. und Pessin, J.E. (1992) *J. Biol. Chem*, **267**, 19521-19528
- Freeman, R.M.**, Plutzki, J., Neel, B.G. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **89**, 11239-11243
- Freund, G.G.**, Wittig, J.G. und Mooney, R.A. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **139**, 179-185
- Froesch, E.R. und Schoenle, E.J** (1994) Diabetes, Thieme Verlag Stuttgart
- Fromm, H.** (1979) *Meth. Enzymol.*, **63**, 42-53
- Fujita-Yamaguchi, Y. und Kathuria, S.** (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **82**, 6095-6099
- Fukami, Y. und Lipmann, F** (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **80**, 1872-1876
- George, p.**, Witonsky, R.J., Trachtman, M., Wu, C., Dowatr, W., Richman, L., Richman, W., Shuray, F. und Lentz, B. (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, **223**, 1-15
- Gerold, M.** Diplomarbeit an der Universität Köln (1995)
- Ginsberg, B.H.** (1977) in: *Biochemical Actions of Hormone*, Academic Press NY, 314-349
- Giorgetti, S.**, Pelicci, P.G., Van Obberghen, E. (1994) *Eur. J. Biochem.*, **223**, 195-202
- Goder, M.** Diplomarbeit an der Universität Köln (1995)
- Goldstein, B.J.** (1996) in: *Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text*, Lippincott Philadelphia, 174-186
- Goldstein, B.J.**, Ahmad, F., Ding, W., Li, P.M., Zhang, W.R. (1998) *Mol. Cell Biol.*, **182**, 91-99
- Graziani, Y.**, Erickson E. und Erickson, R.L. (1983) *J. Biol. Chem*, **258**, 6344-6351
- Greene, L.A. und Tischler, A.S.** (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **73**, 2424-2428
- Gronemeyer, H.** (1992) *FASEB J.*, **6**, 2524-2529
- Gruppuso, P.A.**, Boylan, M.J., Levine. B.A. und Ellis, L. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **249**, 553-556
- Gual, P.**, Baron, V., Alengrin, F., Mothe, I. und Van Obberghen, E. (1996) *Endocrinology*, **137**, 3416-3423
- Guan K.L. und Dixon, J.E.** (1990) *Science*, **249**, 553-556
- Guan, K.L. und Dixon J.E.** (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 176-26-17030
- Hanks, S.K. und Quinn, A.M.** (1991) *Meth. Enzymol.*, **200**, 38-62
- Hanks, S.K.**, Quinn, A.M. und Hunter, T. (1991) *Science*, **241**, 42-52
- Hansen, H.**, Svensson, U., Zhu, J., Laviola, L., Giorgino, F., Wolf, G., Shmith, R.J. und Riedel, H. (1996) *J. Biol. Chem*, **271**, 8882-8886
- Hara, K.**, Yonezawa, K., Sakaue, H. Ando, H., Kotani, K., Kitimura, T., Ueada, H., Stephens, L. Jacksons, T.R. Hawkins, P.T., Dhand, R., Clark, A.E., Holman, G.D., Waterfield, M.D. und Kasuga, M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**, 7415-7419
- Hara, K.**, Yonezawa, K., Sakaue, H., Kotani, k., Kojima, A., Waterfield, M.D., Kasuga, M. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **208**, 735-741

- Häring, H.U.**, Kasuga, M., White, M.F., Crettaz, M. und Kahn, C.R. (1984) *Biochemistry*, **23**, 3298-3306
- Häring, H.U.**, Kirsch, D., Obermaier, B., Ermel, B. und Machicao, F. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 1842-1847
- He, W.**, Craparo, A., Zhu, Y., O'Neill, T.J., Wang, L.M., Pierce, J.H., Gustafson, T.A. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 11641-11645
- Heasley, L.E. und Johnson, G.L.** (1992) *Mol. Cell Biol.*, **3**, 545-553
- Heidenreich, K.**, Inauguraldissertation an der Universität Düsseldorf (1995)
- Heidenreich, K.**, Paduschek, M., Mölders, M. und Klein, H.W. (1994) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **375**, 99-104
- Herrera, R. und Rosen, O.M.** (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 11980-11985
- Herrera, R.**, Leibold, D., Garcia de Herreros, A., Kallen, R.G. und Rosen, O.M. (1989) *J. Biol. Chem.*, **263**, 5560-5568
- Holgado-Madruga, M.**, Emler, D.R., Moscatello, D.K., Godwin A.K. und Wong, A.J. (1996) *Nature*, **379**, 560-564
- Holt, K.H.**, Waters, S.B., Okada, S., Yamauchi, K., Decker, S.J., Saltiel, A.R., Motto, D.G., Koretzky, G.A. und Pessin, J.E. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 8300-8306
- Hubbard, M.J. und Cohen, P.** (1993) *Trends Biochem. Science*, **18**, 172-177
- Hubbard, S.R.** (1997) *EMBO J.*, **16**, 5572-5581
- Hubbard, S.R.**, Wie, L., Ellis, L. und Hendrickson, W.A. (1994) *Nature*, **372**, 746-754
- Hubler, L.**, Gill, G. und Bertics, P.J. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 1558-1564
- Huff, K.**, End, D., Guroff, G. (1981) *J. Cell Biol.*, **88**, 189-198
- Hunter, T.** (1995) *Cell*, **80**, 225-236
- Hunter, T. und Lindberg, R.A.** (1994), *Protein Kinases*, Oxford University Press, 177-211
- Huyer, G.**, Li, Z.M., Adam, M., Huckle, W.R., Ramachandran C. (1995) *Biochemistry*, **34**, 1040-1049
- Ikebe, M. und Hartshorne, D.J.** (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 8249-8253
- Issad, T.**, Tavare, J.M., Denton, R.M. (1991) *Biochem. J.*, **275**, 15-21
- Jacobs, S. und Cuatrecasas, P.** (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 934-939
- Jost, W. und Hauck, H.E.** (1983) *Anal. Biochem.*, **135**, 120-127
- Kahn, B.B.**, (1998) *Cell*, **92**, 593-596
- Kahn, R.** (1993) *Recent Progress in Hormone Research*, Academic Press, **48**, 291
- Kallen, R.G.**, Smith, J.E., Sheng, Z., Tung, L. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **168**, 616-624
- Kasuga, M.**, Zick, Y., Blith, D.L., Karlson, F.A., Häring, H.U. und Kahn, C.R. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 9891-9894
- Kavanaugh, W.M. und Williams, L.T.** (1994) *Science*, **266**, 1862-1865
- Kayatz, P.** Diplomarbeit an der Universität Köln (1994)
- Keegan, A.D.**, Nelms, K., White, M., Wang, L.M., Pierce, J.H., Paul, W.E. (1994) *Cell*, **76**, 811-820
- Kelly, K.L.**, Ruderman, R.B. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 4391-4398
- Kemp, B.E. und Pearson** (1991) *Biochem. Biophys. Acta*, **1094**, 67-76
- Kemp, B.E.**, Graves, D.J., Benjamini, E. und Krebs, E.G. (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 4888-4894
- Kessler, D.** Diplomarbeit an der Universität Köln (1998)
- Khan, M.N.**, Baquiran, G., Brule, C., Burgess, J., Foster, B., Bergeron, J.J.M., Posner, B.I. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 12931-12949
- Khan, M.N.**, Savoie, S., Bergeron, J.J.M., Posner, B.I. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 8462-8472
- Kharitonov, A.**, Schneckenburger, J., Chen, Z., Knyazev, P., Ali, S., Zwick, E., White, M.F., Ullrich, A. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 29189-29193
- Khon, A.D.**, Kovacina, K.S., Roth, R.A. (1995) *EMBO J.*, **14**, 4288-4295
- Khune, M.R.**, Pawson, T., Lienhard, G.E., Feng, G.S. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 11479-11481
- King, M.J. und Sale G.J.** (1990) *Biochem. J.*, **266**, 251-259
- King, M.J.**, Sharma, R.P., Sale, G.J. (1991) *Biochem. J.*, **275**, 413-418
- Klein, H.H.**, Freidenberg, G.R., Matthaiei, S., Olefsky, J.M. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 10557-10567

- Knighton, D.R.**, Cadena, D.L., Zheng, J., Ten Eyck, L.F., Taylor, S., Sowadski, J.M., Gill, G.N. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**, 5001-5005
- Koch, C.A.**, Anderson, D., Moran, M., Ellis, C., Pawson, T. (1991) *Science*, **252**, 668-674
- Koch, J.** Diplomarbeit an der Universität Köln (1998)
- Kohanski, R.A.** (1993) *Biochemistry*, **32**, 5766-5772
- Kohanski, R.A.** (1993) *Biochemistry*, **32**, 5773-5780
- Kohanski, R.A. und Lane, M.D.** (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **134**, 1312-1318
- Kohanski, R.A.**, (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 20984-20991
- Kole, H.K.**, Abdel-Ghany, M. und Racker, E. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**, 5849-5853
- Kotani, K.**, Carrozi, A.J., Sakaue, h., Hara, K., Robinson, L.J., Clark, S.F., Yonezawa, K., James, D.E., Kasuga, M. (1995a) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **209**, 343-348
- Kotani, K.**, Hara, K. Kotani, K., Yonezawa, K. Kasuga, M. (1995b) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **208**, 985-990
- Kublaoui, B.**, Lee, J., Pilch, P.F. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 59-65
- Kuburagi, Y.**, Momomura, K., Yamamoto-Honda, R., Tobe, K., Tamori, Y., Sakura, H., Akanuma, Y., Yazaki, Y. und Kadowaki, T. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268 J. Biol. Chem.**, 16610-16622
- Kuhne, M.R.**, Zhao, Z.Z., Rowles, J. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 15833-15837
- Kuriyan, J. und Cowburn, D.** (1997) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **26**, 259-288
- Kwok, Y.C.**, Nemenoff, R.A. Powers A.C. und Avruch, J. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.*, **244**, 102-113
- Laemmli, U.K.** (1977) *Nature*, **227**, 680-685
- Lavan, B.E.**, Fantin, V.R., Chang, E.T., Lane, W.S., Keller, S.R., Lienhard, G.E. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 21403-21407
- Lavan, B.E.**, Lane, W.S, Lienhard, G.E. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 11439-11443
- Laviola, (1997)**
- Lazar, D.F.**, Wiese, R.J., Brady, M.J., Mastick, C.C., Waters, S.B., Yamauchi, k., Pessin, J.E., Cuatrecasas, P. Salties, A.R. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 20801-20807
- Leavy-Toleando, R.**, Taouis, M. Blaettler, D.H., Gorden, P. und Taylor, S.I. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 31178-31182
- Lechleider, R.J.**, Freeman, R.M., Neel, B.G. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 13434-13438
- Leconte, I.**, Carpentier, J.L. und Clauser, E. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 18062-18071
- Lee, C.H.**, Li, W., Nishimura, R. Zhou, R., Batzer, A.G., Myers J.R., M.G., White, M.F., Schlessinger, J. und Skolnik, E.Y (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**, 11713-11717
- Lee, T.R.**, Niu, J., Lawrence, D.S. (1994) *Biochemistry*, **33**, 4245-4250
- Lee, T.R.**, Niu, J., Lawrence, D.S. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 5375-5380
- Lefkowitz, R.J.** (1993) *Cell*, **74**,. 409-412
- Lehr, S.** Diplomarbeit an der Universität Köln (1995)
- Lemmon, M.A. und Schlessinger, J.** (1994) *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 459-463
- Lemmon, M.A.**, Bu, Z., Ladbury, J.E., Zhou, M., Pinchasi, D., Lax, I., Engelmann, D.M. und Schlessinger, J. (1997) *EMBO J.*, **16**, 281-294
- LeRoith, D.**, Lesniak, M.A., Roth, J. (1981) *Diabetes*, **30**, 70-76
- Leven, O.** (1996) Diplomarbeit an der Universität zu Köln
- Levine, B.A.**, Ellis, L. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 12369-12371
- Lewis, R.E.**, Cao, L., Perregaux, D. und Czech, M.P. (1990b) *Biochemistry*, **29**, 1807-1813
- Lewis, R.E.**, Volle, D.J. und Sanderson, S.D. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 26259-26266
- Lewis, R.E.**, Wu, G.P. MacDonald, R.G. und Czech. M.P. (1990a) *J. Biol. Chem.*, **265**, 947-954
- Li, S.L.**, Yan, P.F., Pax, I.B. und Fujita-Yamaguchi, J. (1992) *Biochemistry*, **31**, 12455-12462
- Lindberg, R.A.**, Quinn, A.M. und Hunter, T. (1992) *Trends Biochem. Sci.*, **17**, 114-119
- Liu, F. und Roth, R.A.** (1994a) *Biochem. J.*, **298**, 471-477
- Liu, F. und Roth, R.A.** (1994b) *Febs-Letters*, **352**, 389-392
- Liu, F. und Roth, R.A.** (1998) *Mol. Cell Biol.*, **182**, 73-78
- Lowenstein, E.J.**, Daly, R.J. Batzer, A.G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E.Y., Bar-Sagi, D. und Schlessinger, J. (1992) *Cell*, **70**, 431-442

- Lu, K. und Guidotti, G.** (1996) *Mol. Biol. Cell*, **7**, 679-691
- Lu, K.,** Guidotti, G. (1997) *Mol. Cell Biol.*, **7**, 679-691
- Lundgren, K.,** Walworth, N., Booher, R., Dembski, M., Kirschner, M., und Beach, D. (1991) *Cell*, **64**, 1111-1112
- Maddux, B.A. und Goldfine, I.D.** (1991) *J. Biol. Chem*, **266**, 6731-6736
- Madhusudan, E.A.,** Xuong, N.H., Adams, J.A., Ten Eyck, L.F., Taylor, S. und Sowadski, J.M. (1994) *Protein Sci.*, **16**, 977-989
- Maegawa, H.,** McClain, D.A., Freidenberg, G., Olefski, J.M., Napier, M., Lipari, T., Dull, T.J., Lee J. und Ullrich, A. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 8912-8917
- Magg, C.** (1994) Diplomarbeit an der Universität zu Köln
- Magg, C.** Inauguraldissertation an der Universität Köln (1997)
- Marin, O.,** Meggio, F., Perich, J.W., Pinna, L.A. (1996) *Int J Biochem Cell Biol*, **28**, 999-1005
- Martin, B.L.,** Wu, D., Jakes, S. und Graves, D.J. (1990) *J. Biol. Chem*, **265**, 7108-7111
- Massague, J.,** Czech, M.P. (1982) *J. Biol. Chem*, **257**, 6729-6738
- Matschinsky, F** (1990) *Diabetes*, **39**, 647-652
- Matthey, U.** Diplomarbeit an der Universität Köln (1993)
- McClain, D.A.;** Maegawa, H.; Lee, J.; Dull, T.J.; Ullrich, A. und Olefsky, J.M. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 14663-14671
- Meagawa, H.,** McClain, D.A., Freidenberg, G., Olefsky, J.M., Napier, M., Lipari, T., Dull, T.J., Lee, J. und Ullrich, A. (1988) *J. Biol. Chem*, **263**, 8912-8917
- Meagawa, H.,** Ugi, S., Ishibashi, O. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **194**, 208-214
- Mendelow, M.,** Prorok, M., Salerno, A., Lawrence, D.S. (1993) *J. Biol. Chem*, **268**, 12289-12296
- Mendez, R.,** Myers Jr, M.G., White, M.F., Rhoads, R.E. (1996) *Mol. Cell Biol.*, **16**, 2857-2864
- Metzler, D.E.** (1979) *Biochemistry: Chemical Reactions of the Living Cell*, p. 728, Academic Press
- Minamide L.S. und Bamburg, J.R.** (1990) *Anal. Biochem.*, **190**, 66-70
- Mölders, M.** (1991) Diplomarbeit an der Universität Düsseldorf
- Moller, W.,** Bos, J.L. (1992) *Hormon Metab Res*, **24**, 214-218
- Morrissey, J.H** (1981) *Anal. Biochem.*, **117**, 307-310
- Mortensen, E.R,** Drachman, J.G. und Guidotti, G. (1991) *Biochem. J.*, **273**, 49-56
- Mortensen, E.R.,** Drachman, J.G. und Guidotti, G. (1991) *Biochem. J.*, **273**, 49-56
- Mosthaf, L.** Vogt, B., Häring, H.U. und Ullrich, A. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **88**, 4728-4730
- Mosthaf, L.,** Grako, K., Dull, T.J., Coussens, L., Ullrich, A. McClain, D.A. (1990) *EMBO J.*, **9**, 2409-2413
- Mothe, I. und Van Obberghen, E.** (1996) *J. Biol. Chem*, **271**, 11222-11227
- Moule, S.K.,** Edgell, N.J., Welsh, G.I., Diggle, T.A., Foulstone, E.J., Heesom, K.J., Proud, G.C. Denton, R.M. (1995) *Biochem. J.*, **311**, 595-601
- Muller, G.,** Rouveyre, N., Upshon, C., Bandlow, W. (1998) *Biochemistry*, **37**, 8705-8713
- Müller, H.K.,** Kellerer, M., Ermel, B., Mühlhofer, A., Obermaier-Kusser, B., Vogt, B. und Häring, H.U. (1991) *Diabetes*, **40**, 1440-1448
- Müller, J.** Diplomarbeit an der Universität Köln (1997)
- Munoz, G. und Marshall S.H.** (1990) *Anal. Biochem.*, **190**, 233-237
- Murakami, M.S. und Rosen, O.M.** (1991) *J. Biol. Chem*, **266**, 22653-22660
- Muroya, K.,** Hattori, S. und Nakamura, S. (1992) *Oncogene*, **7**, 277-281
- Myers Jr, M.G.,** Cheatham, B., Fischer, T.L., Jachna, B.R., Kahn, C.R., Backer, J.M., White, M.F. (1996) *Ann. NY Acad. Sci.*, **766**, 369-387
- Myers Jr., M.G.,** Backer, J.M., Siddle K. und White, M.F. (1991) *J. Biol. Chem*, **266**, 10616-10623
- Myers, M.G. und White, M.F.** (1995) *TEM*, **6**, 209-215
- Myers, M.G. und White, M.F.** (1996) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **36**, 615-658
- Nakielny, S.,** Campbell, D.G. und Cohen, P. (1992) *Febs-Letters*, **308**, 183-189
- Noghuchi, T.,** Matozaki, T., Horita, K., Fujioka, Y., Kasuga, M. (1994) *Mol. Cell Biol.*, **14**, 6674-6682
- Nölle, V.** (1998) Inauguraldissertation an der Universität zu Köln
- Nölle, V.** Diplomarbeit an der Universität Köln (1996)

- O'Brien R.M. und Granner** (1992) *Biochem. J.*, **278**, 609-619
- O'Hare, T.**, Pilch, P.F. (1990) *Biochemistry*, **27**, 5693-5700
- O'Neill, T.**, Rose, T., Pillay, T., Hotta, K., Olefsky, J., Gustafson, T. (1996) *J. Biol. Chem*, **271**, 22506-22513
- O'Neill, T.J.**, Zhu, Y. und Gustafson, T.A. (1997) *J. Biol. Chem*, **272**, 100-35-10040
- Obermaier, A.**, Bradshaw, R.A., Seedorf, K., Choidas, A., Schlessinger J. und Ullrich, A. (1994) *EMBO J.*, **13**, 1585-1590
- Ogihara, T.**, Isobe, T., Ichimura, T., Taoka, M., Funaki, M., Sakoda, H., Onishi, Y., Inukai, K., Anai, M., Fukushima, Y., Kikuchi, M., Yazaki, Y., Oka, Y., Asano, T. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 25267-25274
- Olefsky, J.M.** (1990) *Diabetes*, **39**, 1009-1016
- Ouwen, D.M.**, van der Zon, G.C.M., Pronk, G.J., Bos, J.L., Möller, W., Cheatham, B., Kahn, C.R., Maassen, J.A. (1994) *J. Biol. Chem*, **269**, 33116-33122
- Paduschek, M.** (1992) Diplomarbeit an der Universität zu Köln
- Pang, D.T.**, Sharma, B.R. und Shafer, J.A. (1985) *J. Biol. Chem*, **260**, 7131-7136
- Pang, L.**, Milarski, K.L., Ohmichi, M., Takata, Y., Olefsky, J.M., Saltiel, A.R (1994) *J. Biol. Chem*, **269**, 10604-10608
- Parker, L.L.**, Atherton-Fessler, S., Lee, M.S., Ogg, S., Falk, J.L., Swenson, K.I. und Piwnica-Worms, H. (1991) *EMBO J.*, **10**, 1255-1263
- Parvaresch, S.** (1996) Diplomarbeit an der Universität zu Köln
- Patti, M.E.**, Sun, X.J., Bruening, J.C., Araki, E., Lipes, m.A., White, M.F., Kahn, C.R. (1995) *J. Biol. Chem*, **270**, 24670-24673
- Pawson, T.** (1993) *Developmental Genetics*, **14**, 333-338
- Pawson, T.** (1995) *Nature*, **373**, 573-580
- Payne, D.M.**, Rossomando, A.J., Martino, P., Erickson, A.K., Her, J.H., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Weber, M.J. und Sturgill, T.W. (1991) *EMBO J.*, **10**, 885-892
- Paz, K.**, Hemi, R., LeRoith, D., Krasik, A., Elhanany, E., Kanety, H., Zick, Y. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 29911-29918
- Perlman, R.**, Bottaro, D.P., White, M.F., Kahn, C.R. (1989) *J. Biol. Chem*, **264**, 8946-8950
- Petruzelli, L.M.**, Herrera, R. und Rosen, O.M. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **81**, 3327-3331
- Pike, L.J.**, Eakes, A.T. und Krebs, E.G. (1986) *J. Biol. Chem*, **261**, 3282-3789
- Pike, L.J.**, Kuenzel, E.A., Casnellie, J.E. und Krebs, E.G. (1984) *J. Biol. Chem*, **261**, 9913-9921
- Pillay, T.S. und Siddle, K.** (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **179**, 962-971
- Pillay, T.S.**, Whittaker, J., Lammers, R., Ullrich, A. und Siddle, K. (1991) *Febs-Letters*, **288**, 206-211
- Plekhanov, A.Y.** (1996) *Anal. Biochem.*, **239**, 110-111
- Quentmaier, A.**, Daneschmad, H., Klein, H., Unthan-Fechner, K. und Probst, I. (1993) *Biochem. J.*, **289**, 549-555
- Quirk, P.G.**, Keane, N.E., Levine, B.A., Wie, L. und Ellis, L. (1995) *Biochem. Trans. Soc.*, **23**, 188
- Quon, M.J.**, Chen, H., Ing. B.R., Liu, M.L., Zarnowski, M.J., Yonezawa, K., Kasuga, M., Cushman, S.W., Taylor, S.I. (1995) *Mol. Cell Biol.*, **15**, 5403-5411
- Rajapopalan, M.**, Herbert, L., McClain, D.A. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **211**, 714-718
- Rapuano, M. und Rosen, O.M.** (1991) *J. Biol. Chem*, **266**, 12902-12907
- Richert, N.D.**, Blithe, D.L. und Pastan, I. (1982) *J. Biol. Chem*, **257**, 7143-7150
- Rickles, R.J.**, Botfield, M.C., Wenig, Z., Taylor, J.A., Green, O.M., Brugge, J.S. und Zoller, M.J. (1994) *EMBO J.*, **13**, 5598-5604
- Ringer, D.P** (1991) *Meth.Enzymol.*, **201**, 3-27
- Roberts, T.M.** (1992) *Nature*, **360**, 534-535
- Rodnick, K.J.**, Slot, J.W., Studelska, D., Hampeter, D.R., Robinson, L.J., Greuze, H.J. und James, D.E (1992) *J. Biol. Chem*, **267**, 6278-6285
- Rosen, O.M. und Lebwohl, D.E.** (1988) *Febs-Letters*, **231**, 397-401
- Rosen, O.M.**, Herrera, R., Olowe, Y., Petruzelli, R.M. und Cobb, M.H. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **80**, 3237-3240

- Rosenfeld, J., Capdeville, J., Guillemot, J.C., Ferrera, P. (1992) *Anal. Biochem.*, **203**, 173-179
- Ruan, J., Chen, C., Cao, Y., Garofalo, R.S. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 4236-4243
- Rylatt, D.B. und Parish, C.R (1982) *Anal. Biochem.*, **121**, 213-214
- Sadowsky, I., Stone, J.E., Pawson, T. (1986) *Mol. Cell Biol.*, **6**, 4396-4408
- Sahal, D. und Fujita-Yamaguchi, Y. (1987) *Anal. Biochem.*, **167**, 23-30
- Sakaue, M., Bowtell, D., Kasuga, M. (1995) *Mol. Cell Biol.*, **15**, 379-388
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und maniatias, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**, 5463
- Sasaoka, T., Draznin, B., Leitner, J.W., Langlois, W.J., Olefsky, J.M. (1996) *J. Biol. Chem.*, **269**, 10734-10738
- Sasaoka, T., Rose, D.W., Jhun, B.H. Saltiel, A.R., Draznin, B., Olefsky, J.M. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 13689-13694
- Satoh, T., Fantl, W.J., Escobedo, J.A., Williams, L.T. und Kaziro, Y. (1993) *Mol. Cell Biol.*, **13**, 3706-3713
- Sawka-Verhelle, D., Tatare-Deckert, S. White, M.F., Van Obbhergen, E. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 5980-5983
- Schägger, H. und Jagow, G. (1987) *Anal. Biochem.*, **166**, 368-379
- Schmidt, S. (1991) Diplomarbeit an der Universität Düsseldorf
- Schmidt, S. Diplomarbeit an der Unversität Düsseldorf (1991)
- Seino, S. und Bell, G.I (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **159**, 312-316
- Seino, S., Seino, M., Bell, G.I. (1990) *Diabetes*, **39**, 129-133
- Seino, S., Seino, M., Nishi, S., Bell, G.I. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **86**, 114-118
- Shoelson, S.E, Chatterjee, S., Chaudhuri, M. und White, M.F. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **89**, 2027-2031
- Shoelson, S.E., Böni-Schnetzler, M., Pilch, P.F. und Kahn, C.R. (1991) *Biochemistry*, **30**, 7740-7746
- Shoelson, S.E., Böni-Schnetzler, M., Pilch, P.F. und Kahn, R. (1988) *J. Biol. Chem.*, **268**, 4085-4091
- Shoelson, S.E., White, M.F. und Kahn, C.R. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 7831-7836
- Siemeister, G., Al-Hasani, H., Klein, H.W., Keller, S., Streicher, R., Krone, W. und Müller-Wieland, D., (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 4870-4874
- Smith, D.B. und Johnson, K.S. (1988) *Gene*, **67**, 31-40
- Smith, D.M., King M.J. und Sale, M.J. (1988) *Biochem. J.*, **250**, 509-519
- Smith-Hall, J., Pons, S., Patti, M.E., Burcks, D.J., Yenush, L., Sun, X.J., Kahn, C.R., White, M.F. (1997) *Biochemistry*, **36**, 8304-8310
- Songyang, Z., Carraway, K.L., Eck, M.J., Harrison, S.C., Feldman, R.A, Mohammadi, M., Schlessinger, J., Hubbard, S.R., Smith, D.P., Eng, C. et al. (1995) *Nature*, **373**, 536-539
- Stadtmauer, L. und Rosen, O.M. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 10000-10005
- Staubs, P.A., Reichart, D.R., Saltiel, A.R. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 27186-27192
- Strack, V., Stoyanov, B., Bossenmaier, B., Mosthaf, L., Kellerer, M. und Häring, H.U. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **239**, 235-239
- Straus, D.S (1984) *Endoc. Rev.*, **5**, 356
- Summers, M.D. und Smith, G.E. (1987) in: *A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures*, Texas Agricultural Experiment Station, Bulletin No. 1555
- Sun, X.J, Rothenberg, P., Kahn, C.R., Backer, J.M., Araki, E., Wilden, P.A., Cahill, D.A., Goldstein, B.J. und White, M.F. (1991) *Nature*, **352**, 73-77
- Sun, X.J., Crimmins, D.L., Myers, M.G., Miralpeix, M. und White, M.F. (1993) *Mol. Cell Biol.*, **13**, 7418-7428
- Sun, X.J., Rothenberg, p., Myers, M.G., Glasheen, E.M., Backer, J.M., Kahn, C.R. und White, M.F. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 22662-22672
- Sun, X.J., Wang, L.M., Zhang, Y. (1995) *Nature*, **377**, 173-177
- Sun, X.J., Whang, L.M., Zhang, Y., Yenush, L., Myers, M.G., Glasheen, E., Lane, W.S., Pierce, J.H., White, M.F. (1995) *Nature*, **377**, 173-177
- Swarup, G., Dasgupta, D.J. und Garbers, D.L. (1984) *Adv. Enzym. Regul.*, **22**, 267-288

- Sweet, L.J., Morrison, B.D. und Pessin, J.E. (1987) *J. Biol. Chem*, **262**, 6939-6942
- Takata, Y., Webster, N.J.G. und Olefsky, J.M. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 9135-9139
- Takata, Y., Webster, N.J.G., Olefsky, J.M. (1992) *J. Biol. Chem*, **267**, 9065-9070
- Takayama, S., White, M.F. und Kahn, C.R. (1988) *J. Biol. Chem*, **263**, 3440-3447
- Tanti, J.F., Gremeaux, T., Van Obbhergen, E. und Le Marchand.Brustel, Y. (1994) *J. Biol. Chem*, **269**, 6051-6057
- Tauer, T.J., Volle, D.J., Rhode, S.L. und Lewis, R.E. (1996) *J. Biol. Chem*, **271**, 331-336
- Tavare, J.M. und Denton, R.M. (1988) *Biochem. J.*, **252**, 607-615
- Tavare, J.M. und Dickens, M. (1991) *Biochem. J.*, **274**, 173-179
- Tavare, J.M., O'Brien, R.M., Siddle, K. und Denton, R.M. (1988) *Biochem. J.*, **253**, 783-788
- Tavare, J.M., Ramos, P., Ellis, L. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **188**, 86-93
- Tavare, J.M., Zhang, B., Ellis, L. und Roth, R.A. (1991) *J. Biol. Chem*, **266**, 21804-21809
- Taylor, S.S., Radzio-Andselm, R. und Hunter, T. (1995) *Faseb J.*, **9**, 1255-1266
- Tennagels, N. (1995) Diplomarbeit an der Universität zu Köln
- Thies, R.S., Ullrich, A. und McClain, D.A. (1989) *J. Biol. Chem*, **264**, 12820-12825
- Tornqvist, H.E., Pierce, M.W., Frackelto, A.R., Nemenoff, r.A. und Avruch, J. (1987) *J.Biol. Chem.*, **262**, 10212-10219
- Torrosian, K., Nower, P., Schwartz, T. und Fauntus, I.G. (1993) *Biochem. J.*, **290**, 151-158
- Tranissijevik, M., Myers Jr, M.G., Thomas, R.S., Crimmons, D., White, M.F., Sacks, D. (1993) *J. Biol. Chem*, **268**, 18157-18166
- Traverse, S., Gomez, N., Paterson, H., Marshall, C. und Cohen, P. (1992) *Biochem. J.*, **288**, 351-355
- Treadway, J.L., Morrison, B.D. Soos, M.D., Siddle, K., Olefsky, J., Ullrich, A., McClain, D.A. und Pessin J.E. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **88**, 214-218
- Ugi, S., Meagawa, H., Olefsky, J.M., Shigeta, Y., Kashiwagi, A. (1994) *Febs-Letters*, **340**, 216-220
- Ullrich, A. und Schlessinger, J. (1990) *Cell*, **61**, 203-212
- Ullrich, A., Bell, J.R., Chen, E.Y, Herrera, R., Petruzzelli, L.M., Dull, T.J., Gray, A, Coussens, L., Liao, Y.C., Tsubokawa, M., Mason, A., Seeburg, P.H., Grunfeld, C., Rosen, O.M. und Ramachandran, J. (1985) *Nature*, **313**, 756-761
- Ullrich, A., Gray, A, Tam, a.W., Yang-Peog, T., Tsubokawa, M., Collis, C., Hezel, W., Bon, T.L., Kathuria, S., Chen, E., Jacob, S., Franche, U., Ramachandran, J. und Fujita-Yamaguchi, Y (1986) *EMBO J.*, **5**, 2503-2512
- Van Horn, D.J., Myers Jr, M.G., Backer, J.M. (1994) *Biochem. J.*, **269**, 29-32
- Vicario, P.P., Saperstein, R. und Bennun, A. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.*, **261**, 336-345
- Villalba, M., Wentte, S.R., Russell, D.S, Ahn, J., Reichelderfer, C.F. und Rosen, O.M. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **86**, 7848-7852
- Vogt, B., Carrascosa, J.M., Ermel, B. Ullrich, A. und Häring, H.U. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **177**, 1013-1018
- Vogt, B., Carrascosa, J.M., Ermel, B., Ullrich, A. und Häring, H.U. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **117**, 1013-1018
- Walker, D.H., Kuppusswamy, D., Visvanathan, A. und Pike, L.J. (1987) *Biochemistry*, **26**, 1428-1433
- Walter, S. (1992) Diplomarbeit an der Universität zu Köln
- Wang, L.M., Keegan, A.D., Li, W., Lienhard, G.E., Pacini, S., Gutkind, J.S., Myers, m.G., Sun, X.J., White, M.F., Aaronson, S.A., Paul, E.E. und Pierce, J.H. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**, 40-32-4036
- Wang, Z.X., Moran, M.F. (1996) *Science*, **272**, 1935-1939
- Waters, S.B., Yamauchi, K., Pessin, J.E. *J. Biol. Chem*, **268** 22231-22234
- Waugh, S.M. und Pilch, P.F. (1989) *Biochemistry*, **28**, 2722-2727
- Wei, L., Hubbard, S.R., Hendrickson, W.A. und Ellis, L. (1995) *J. Biol. Chem*, **270**, 8122-8130
- Whang, B., Balba, Y., Knutson, V.P. (1996) *BBRC*, **227**, 27-34
- White, M.F (1998) *Mol. Cell Biol.*, **182**, 3-11
- White, M.F, Häring, H.U., Kasuga, M., Kahn, C.R (1984) *J. Biol. Chem*, **259**, 255-265
- White, M.F, Maron, R. und Kahn, C.R (1985) *Nature*, **318**, 183-186
- White, M.F. (1988) *Mol. Cell Biol.*, **182**, 3-11

- White, M.F.**, Liningston, J.N., Backer, J.M., Lauris, V., Dull, T.J., Ullrich, A. und Kahn, C.R. (1988) *Cell*, **54**, 641-649
- White, M.F.**, Maron, R. und Kahn, C.R. (1985) *Nature*, **318**, 183-186
- Wieber, A.** (1998) Diplomarbeit an der Universität zu Köln
- Wilden, P.A.**, Siddle, K. Haring, E., Backer, J.M., White, M.F. und Kahn, C.R. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 13719-13722
- Wilson, K. und Goulding, K.H.** (1991) in: Methoden der Biochemie, 3. Auflage, Thieme-Verlag
- Wirth, A.** Diplomarbeit an der Universität Köln (1998)
- Wolf, G.**, Grub, T, Ottinger, E. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 27407-47410
- Xu, W.**, Harrison, S.C., Eck, M.J. (1997) *Nature*, **385**, 595-601
- Yamaguchi, Y.**, Flier, J.S., Yokota, A., Benecke, H., Backer, j.M, Moller, D.E. (1991) *Endocrinology*, **129**, 2058-2066
- Yamamoto-Honda, R.**, Kadowaki, T., Momomura, K., Tobe, K., Tamori, Y., Shibasaki, Y., Mori, Y., Kaburagi, Y., Koshio, O., Akanuma, Y., et al. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 16859-16865
- Yamao, T.**, Matozaki, T., Amano, K., Matsuda, Y., Takahashi, N., Ochi, F., Fujioka, Y., Kasuga, M. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **231**, 61-67
- Yamauchi, K.**, Milarski, K.L., Saltiel, A.R., Pessin, J.E. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **92**, 664-668
- Yan, P-F**, Li, S.L., Liang, S.J., Giannini, S. und Fujita-Yamaguchi, Y. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 22444-22449
- Yang-Feng, T.L.**, Franke, U. und Ullrich, A. (1985) *Science*, **228**, 728-731
- Yarden, Y.**; Ullrich, A. (1988) *Ann. Rev. Biochem.*, **57**, 443-478
- Yenush, L.**, Makati, k.J., Ishibashi, O., Myers, M.G., White, M.F. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 24300-24308
- Yoon, M.Y. und Cook, P.F.** (1987) *Biochemistry*, **26**, 4118-4125
- Yuan, C.J.**, Huang, C.Y, Graves, D.J. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 17683-17686
- Zawalich, W.S. und Rasmussen** (1990) *Mol. Cell Endokrinol.*, **70**, 119-137
- Zhang, B.**, Tavare, J.E., Ellis, L., Roth, R.A. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 990-996
- Zhang, J.**, Zhang, F., Ebert, D., Cobb, M.H. und Goldsmith, E.J. (1995) *Structure*, **3**, 299-307
- Zhang, Z.Y.**, Wang, Y., Wu, l., Fauman, E.B., Stuckey, J.A., Schubert, H.L., Saper, M.A. und Dixon, J.E. (1994) *Biochemistry*, **33**, 15266-15270
- Zhao, H.**, Okada, S., Pessin., J.E. Koretzky, J.A (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 12061-12067
- Zheng, J.**, Knighton, D.R., Ten eyck, l.F., Karlson, r., Xuong, R., Taylor, S. und Sodwadski J.M. (1993) *Biochemistry*, **32**, 2154-2161
- Zhou, C.**, Yang, Y. und Jong, A.Y. (1990) *Biotechniques*, **8**, 172-173
- Zick, Y.**, Grunberger, G., Podskalny, J.M., Moncada, J.M., Taylor, S.I., Gorden P. und Roth, J. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **116**, 1129-1135

## 12 Anhang

## 12.1 Experimentelle Daten zu Kapitel 4: Charakterisierung der gereinigten IRKD

Tab. I.1

Me <sup>2+</sup> -Ion	Konzentration [mM]	Phosphateinbau [cpm]	Phosphateinbau [pmol]	Phosphateinbau [mol/mol]
in Anwesenheit von 5mM MnCl <sub>2</sub>				
	0	29380	37,33	3,73
	2,5	32122	40,82	4,08
Mg <sup>2+</sup>	5	28577	36,31	3,63
	7,5	15516	19,72	1,97
	10	13572	17,25	1,73
in Anwesenheit von 5mM MgCl <sub>2</sub>				
	0	33305	42,32	4,23
	2,5	33085	42,04	4,2
Mn <sup>2+</sup>	5	29284	37,21	3,72
	7,5	27466	34,90	3,49
	10	15449	19,63	1,96

spezifische Radioaktivität: 787 cpm/pmol ATP

**Tab. I.1: Experimentelle Daten zu Abb. 4.3: Abhängigkeit der Autophosphorylierungsreaktion vom eingesetzten Ionenverhältnis.** Reaktionsbedingungen: variierende Me<sup>2+</sup>-Ionenkonzentrationen des einen Metallions bei einer konstanten Konzentration von 5 mM des anderen Metallions, 1 µM Poly(Lysin), 250 µM [γ-<sup>32</sup>P]ATP, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 µM IRKD. Reaktionszeit 20 Minuten bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE

Tab. I.2

spezifische Radioaktivität [cpm/pmol ATP]	ATP [µM]	Phosphateinbau [cpm/min]	Initialgeschw. [pmol/min]	1/ V [min/pmol]
2045	10	2338		
		3904	0,76 ± 0,28	1,4 ± 0,5
668	50	1724		
		2054	2,84 ± 0,36	0,36 ± 0,04
364	100	1462		
		1466	4,02 ± 0,01	0,25 ± 0
159	150	816		
		898	5,4 ± 0,36	0,19 ± 0,01
76	250	620		
		572	7,84 ± 0,44	0,13 ± 0,01

**Tab. I.2: Experimentelle Daten zu Abb. 4.4: Phosphateinbau in der Autophosphorylierungsreaktion der IRKD in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration.** Reaktionsbedingungen: variierende [γ-<sup>32</sup>P]ATP-Konzentrationen, 1 µM Poly(Lysin), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 µM IRKD. Reaktionszeit 0,5 und 1 Minuten bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE.

Tab. I.3

P(K) [µM]	Phosphateinbau [cpm]	Phosphateinbau [cpm]	Phosphateinbau [cpm]	Phosphateinbau [pmol]	Phosphateinbau [mol/mol]
0	917	1243	1080 ± 230	3,88 ± 0,83	0,39 ± 0,08
0,25	8743	10927	9835 ± 1544	35,38 ± 5,55	3,54 ± 0,56
0,5	10646	11118	10882 ± 333	39,14 ± 1,20	3,91 ± 0,12
1	11328	12514	11921 ± 838	42,88 ± 3,02	4,29 ± 0,30
2,5	8466	9240	8853 ± 547	31,85 ± 1,97	3,18 ± 0,20
5	8752	8601	8677 ± 106	31,21 ± 0,38	3,12 ± 0,04
10	7840	8967	8403 ± 797	30,23 ± 2,87	3,02 ± 0,29

spezifische Radioaktivität: 278 cpm/pmol ATP

**Tab. I.3: Experimentelle Daten zu Abb. 4.5 A: Initialgeschwindigkeit der Phosphatinkorporation der IRKD in Abhängigkeit von der Poly(Lysin)-Konzentration.** Reaktionsbedingungen: variierende Poly(Lysin)-Konzentrationen, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 µM IRKD. Reaktionszeit: 0,5 Minuten bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE.

Tab. I.4	H2b [ $\mu$ M]	Phosphateinbau [cpm]	Einbau [pmol]	Einbau [mol/mol]	Phosphateinbau [cpm]	Einbau [pmol]	Einbau [mol/mol]
	1 min			20 min			
	0	2632	5,37	0,54	9852	20,11	2,01
	0,1	3188	6,51	0,65	13804	28,17	2,82
	0,5	2764	5,64	0,56	16448	33,57	3,36
	1	4848	9,89	0,99	15984	32,62	3,26
	5	9848	20,10	2,01	14612	29,82	2,98
	10	9340	19,06	1,91	13536	27,62	2,76
	20	7100	14,49	1,45	11671	23,82	2,38
	25	6212	12,68	1,27	9908	20,22	2,02

spezifische Radioaktivität: 490 cpm/pmol ATP

**Tab. I.4: Experimentelle Daten zu Abb. 4.5 B: Initialgeschwindigkeit der Phosphatinkorporation der IRKD in Abhängigkeit von der H2b-Konzentration.** Reaktionsbedingungen: variierende H2b-Konzentrationen, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1  $\mu$ M IRKD. Reaktionszeit 1 und 20 Minuten bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE.

Tab. I.5	IRKD [ $\mu$ M]	Phosphateinbau [cpm]	Phosphateinbau [pmol]	Phosphateinbau [mol/mol]
		0,25	8370	2,11
	0,5	14840	3,74	0,748
	1	25202	6,35	0,636
	2	60445	15,24	0,762
	3	80040	20,18	0,673
	4	119971	30,25	0,756

spezifische Radioaktivität: 3966 cpm/pmol ATP

**Tab. I.5: Experimentelle Daten zu Abb. 4.6 A: Konzentrationsabhängigkeit der Initialgeschwindigkeit der IRKD-Autophosphorylierung.** Reaktionsbedingungen: variierende IRKD-Konzentrationen, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 mg/ml Rinderserum-Albumin (BSA) als Stützprotein, 1  $\mu$ M IRKD. Reaktionszeit 1 Minute bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE.

Tab. I.6	Konzentrations- verhältnis [pmol]	IRKD	IRKD-K1018A	IRKD	IRKD-K1018A
		Phosphateinbau [cpm]	Phosphateinbau [cpm]	Phosphateinbau [pmol]	Phosphateinbau [pmol]
	1	4179	-	1,06	-
	1 : 9	2862	1845	0,73	0,47
	5	18835	-	4,78	-
	5 : 5	13955	6583	3,54	1,67
	9	27854	-	7,07	-
	9 : 1	25757	3437	6,53	0,87

spezifische Radioaktivität: 3942 cpm/pmol ATP

**Tab. I.6: Experimentelle Daten zu Abb. 4.6 B: Konzentrationsabhängigkeit der Initialgeschwindigkeit der IRKD-Autophosphorylierung.** Reaktionsbedingungen: variierende Verhältnisse von IRKD-HIS und IRKD-K1018A, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5. Reaktionszeit 1 Minute bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE.

**Tab. I.7 (nächste Seite): Experimentelle Daten zu Abb. 4.7 A: Abhängigkeit der maximalen Phosphatinkorporation der IRKD von der Temperatur.** Reaktionsbedingungen: variierende Reaktionstemperaturen, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1  $\mu$ M IRKD. Reaktionszeit 1 Minute bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE. Bestimmung der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung der Phosphoaminosäuren durch Phosphoimager-Analyse.

**Tab. I.7**

Temperatur [°C]	Phosphateinbau [cpm]	Phosphateinbau [pmol]	Phosphateinbau [mol/mol]	P-Ser [%]	P-Ser [mol/mol]
5	5789	14,66	1,47	-	-
10	13373	33,86	3,39	23,94	0,81
20	16504	41,78	4,18	26	1,09
25	13771	34,86	3,49	20,7	0,72
30	11490	29,09	2,91	25,2	0,73
35	10669	27,01	2,70	24	0,65
40	8707	22,04	2,20	9	0,20
50	7870	19,92	1,99	-	-
spez. Aktivität: 395 cpm/pmol ATP					

**Tab. I.8**

pH	Phosphateinbau [cpm]	Phosphateinbau [pmol]	Phosphateinbau [mol/mol]	P-Ser [%]	P-Ser [mol/mol]
5	4491	9,83	0,98	0,7	0,01
5,5	4624	10,12	1,01	1,8	0,02
6	6293	13,77	1,38	3,1	0,04
6,5	8960	19,61	1,96	6,1	0,12
7	10128	22,16	2,22	17,0	0,38
7,5	17968	39,32	3,93	23,9	0,94
8	19771	43,26	4,33	22,6	0,98
8,5	15045	32,92	3,29	18,9	0,62
spez. Aktivität: 457 cpm/pmol ATP					

**Tab. I.8: Experimentelle Daten zu Abb. 4.7 B: Abhängigkeit der maximalen Phosphatinkorporation der IRKD von dem pH-Wert.** Reaktionsbedingungen: variierender pH-Wert, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 0,1 M Ka-Acetat, 0,05 M Tris, 0,05 M BisTris. Reaktionszeit 1 Minute bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE. Bestimmung der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung nach dünn-schichtchromatographischer Auftrennung der Phosphoaminosäuren durch Phosphoimager-Analyse.

## 12.2 Experimentelle Daten zu Kapitel 5: Die Duale Aktivität der Insulinrezeptorkinase in der Autophosphorylierung

**Tab. II.1**

spez. Aktivität [cpm/pmol ATP]	ATP [µM]	Phosphateinbau [cpm]	Phosphateinbau [pmol]	Phosphateinbau [mol/mol]	P-Ser [%]	P-Ser [mol/mol]
2045	10	23067	11,28	1,13	20,39	0,23
668	50	9245	13,84	1,38	18,06	0,25
364	100	6872	18,88	1,89	22,78	0,43
159	150	4388	27,6	2,76	21,38	0,59
76	250	3301	43,44	4,34	24,63	1,07
37	500	1548	41,84	4,18	24,38	1,02
15	1000	520	34,72	3,47	29,09	1,01

**Tab. II.1: Experimentelle Daten zu Abb. 5.3 A: Abhängigkeit der IRKD-Serinphosphorylierung von der ATP-Konzentration.** Reaktionsbedingungen: variierende [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP-Konzentrationen, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1µM IRKD. Reaktionszeit 20 Minuten bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE. Bestimmung der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung nach dünn-schichtchromatographischer Auftrennung der Phosphoaminosäuren durch Phosphoimager-Analyse.

**Tab. II.2 (nächste Seite): Experimentelle Daten zu Abb. 5.3 D: Abhängigkeit der IRKD-Serinphosphorylierung von der Poly(Lysin)-Konzentration.** Reaktionsbedingungen: variierende Poly(Lysin)-Konzentrationen, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 250 µM [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1µM IRKD. Reaktionszeit 20 Minuten bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE. Bestimmung der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung nach dünn-schichtchromatographischer Auftrennung der Phosphoaminosäuren durch Phosphoimager-Analyse.

**Tab. II.2**

Poly(Lysin) [µM]	Phosphateinbau [cpm]	Phosphateinbau [pmol]	Phosphateinbau [mol/mol]	P-Ser [%]	P-Ser [mol/mol]
0	5891	21,19	2,12	2,5	0,05
0,25	10072	36,23	3,62	25,5	0,92
0,5	11267	40,53	4,05	23,3	0,95
1	11712	42,13	4,21	22,2	0,94
2,5	9952	35,80	3,58	18,2	0,65
5	9274	33,36	3,34	8,0	0,27
10	7281	26,19	2,62	6,0	0,16

spezifische Radioaktivität: 278 cpm/pmol ATP

**Tab. II.3**

	Zeit [min]	Phosphateinbau [cpm]	Phosphateinbau [pmol]	Phosphateinbau [mol/mol]	P-Ser [%]	P-Ser [mol/mol]
Mn <sup>2+</sup>	1	26212	30,9	3,09	2,59	0,08
10mM	5	31425	37,0	3,7	6,49	0,24
	20	31254	36,8	3,68	23,1	0,85
Mg <sup>2+</sup>	1	28185	33,2	3,32	8,13	0,27
10 mM	5	35876	42,3	4,23	27,2	1,15
	20	35742	42,1	4,21	46,8	1,97

spezifische Radioaktivität: 849 cpm/pmol ATP

**Tab. II.3: Experimentelle Daten zu Abb. 5.4: Abhängigkeit der IRKD-Serinphosphorylierung von der verwendeten Metallionensorte.** Reaktionsbedingungen: 10mM MnCl<sub>2</sub> oder 10mM MgCl<sub>2</sub>, 250 µM [γ-<sup>32</sup>P]ATP, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1µM IRKD. Reaktion bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE. Bestimmung der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung der Phosphoaminosäuren durch Phosphoimager-Analyse. Experimentelle Daten für 5 mM MnCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub> s. Tabelle II.4.

**Tab. II.4**

Zeit	Phosphateinbau* [cpm]	Phosphateinbau** [cpm]	Phosphateinbau [pmol]	PE [mol/mol]	P-Ser [%]	P-Ser/ Kinase [mol/mol]
+ Poly(Lysin)						
0,5	23051	18498	36,23 ± 1,09	3,62	2	0,07
1	25403	19206	38,75 ± 0,47	3,88	3,8	0,15
2,5	27388	20204	41,28 ± 1,22	4,13	7,7	0,32
5	29643	22152	44,95 ± 0,92	4,495	12,5	0,56
10	29858	23148	46,11 ± 0,26	4,61	20,9	0,96
20	29413	21653	44,28 ± 1,37	4,43	27,5	1,21
30	29160	21150	43,58 ± 1,81	4,36	28	1,22

\* spezifische Radioaktivität: 650 cpm/pmol ATP

\*\* spezifische Radioaktivität: 500 cpm/pmol ATP 500

- Poly(Lysin)						
0,5	11861	4860	5,76 ± 0,35	0,58	2,01	0,01
1	22210	9501	11,02 ± 1	1,10	-	-
2,5	26572	8232	11,25 ± 1,54	1,13	-	-
5	30371	13870	15,61 ± 2,14	1,56	-	-
10	42690	14110	18,62 ± 3,5	1,86	-	-
20	41540	16680	19,94 ± 0,92	1,99	-	-
30	43414	23579	20,86 ± 0,98	2,09	5,0	0,1

\* spezifische Radioaktivität: 2154 cpm/pmol ATP

\*\* spezifische Radioaktivität: 810 cpm/pmol ATP

**Tab. II.4: Experimentelle Daten zu Abb. 5.5 A und 5.5 B: Zeitverlauf der Autophosphorylierung der IRKD.** Reaktionsbedingungen: 1 µM/ kein Poly(Lysin), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 250 µM [γ-<sup>32</sup>P]ATP, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1µM IRKD. Reaktion bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE. Bestimmung der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung der Phosphoaminosäuren durch Phosphoimager-Analyse.

Zeit	Phosphateinbau* [cpm]	Phosphateinbau** [cpm]	Phosphateinbau [pmol]	PE [mol/mol]	P-Ser [%]	P-Ser/ Kinase [mol/mol]
+ Poly(Lysin)						
0,5	35766	24566	19,7 ± 0,14	1,97	4	0,08
1	41980	29404	23,3 ± 0,14	2,33	7	0,16
2,5	47412	31024	25,9 ± 1,56	2,59	15	0,39
5	57100	32752	28,9 ± 3,82	2,89	22	0,64
10	54320	36948	29,8 ± 0,57	2,98	29	0,86
20	47630	41420	29,7 ± 4,67	2,97	38	1,13
30	52070	37762	29,5 ± 0,99	2,95	39	1,15

\* spezifische Radioaktivität: 3610 cpm/pmol ATP

\*\* spezifische Radioaktivität: 1253 cpm/pmol ATP

- Poly(Lysin)						
0,5		8095	2,99	0,299	3,5	0,01
1		10782	3,99	0,399	-	-
2,5		14384	5,32	0,53	-	-
5		14871	5,499	0,55	-	-
10		14060	5,199	0,52	-	-
20		18682	6,91	0,69	-	-
30		24070	8,9	0,89	7,1	0,063

\*\* spezifische Radioaktivität: 2704 cpm/pmol ATP

**Tab. II.5: Experimentelle Daten zu Abb. 5.5 C und 5.5 D: Zeitverlauf der Autophosphorylierung der IRKD-Y1316/22F.** Reaktionsbedingungen: 1 µM/ kein Poly(Lysin), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 250 µM [γ-<sup>32</sup>P]ATP, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1µM IRKD-Y1316/22F. Reaktion bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE. Bestimmung der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung der Phosphoaminosäuren durch Phosphoimager-Analyse.

Zeit	Phosphateinbau [cpm]	Phosphateinbau [pmol]	PE [mol/mol]	P-Ser [%]	P-Ser/ Kinase [mol/mol]
0,5	46636	19,52	1,95	3,1	0,06
1	53755	22,5	2,25	4,3	0,1
2,5	55547	23,25	2,33	13	0,30
5	51963	21,75	2,18	25,2	0,55
10	50172	21,0	2,1	29	0,61
20	48379	20,25	2,03	42	0,85

spezifische Radioaktivität: 2389 cpm/pmol ATP

**Tab. II.6: Experimentelle Daten zu Abb. 5.5 E: Zeitverlauf der Autophosphorylierung der IRKD-Y960/1316/22F.** Reaktionsbedingungen: 1 µM Poly(Lysin), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 250 µM [γ-<sup>32</sup>P]ATP, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1µM IRKD-Y960/1316/22F. Reaktion bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE. Bestimmung der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung der Phosphoaminosäuren durch Phosphoimager-Analyse.

**Tab. II.7 (nächste Seite): Experimentelle Daten zu Abb. 5.5 F: Zeitverlauf der Autophosphorylierung der IRKD-Y1316/22T.** Reaktionsbedingungen: 1 µM/ kein Poly(Lysin), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 250 µM [γ-<sup>32</sup>P]ATP, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1µM IRKD-Y1316/22T. Reaktion bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE. Bestimmung der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung der Phosphoaminosäuren durch Phosphoimager-Analyse.

**Tab. II.7**

Zeit	Phosphateinbau* [cpm]	Phosphateinbau** [cpm]	Phosphateinbau [pmol]	PE [mol/mol]	P-Ser [%]	P-Ser [mol/mol]
+ Poly(Lysin)						
0,5	13661	23056	9,26 ± 3,17	0,93	-	-
1	14425	23456	9,55 ± 3,04	0,96	-	-
2,5	19025	26025	11,33 ± 2,22	1,13	-	-
5	17650	24886	10,73 ± 2,36	1,07	-	-
10	20009	25446	11,44 ± 1,65	1,14	-	-
20	20499	26938	11,76 ± 1,75	1,18	-	-
* spezifische Radioaktivität: 1949 cpm/pmol ATP						
** spezifische Radioaktivität: 2013 cpm/pmol ATP						
- Poly(Lysin)						
0,5		4964	1,32	0,13	-	-
1		6636	1,77	0,18	-	-
2,5		9764	2,6	0,26	-	-
5		10924	2,92	0,29	-	-
10		13654	3,64	0,36	-	-
20		11516	3,06	0,31	-	-
** spezifische Radioaktivität: 2013 cpm/pmol ATP						

Tab. II.8

IRKD-K1018A [μM]	spezifische Radioaktivität [pmol ATP/cpm]	Zeit [min]	Phosphateinbau [cpm/min]	Phosphateinbau [pmol/min]	1/Phosphateinbau [min/pmol]
1	2,197 × 10 <sup>-3</sup>	0,5	870		
		1	337	1,33 ± 0,83	0,937 ± 0,585
2	2,14 × 10 <sup>-3</sup>	0,5	1211		
		1	987	2,35 ± 0,34	0,43 ± 0,062
3	2,44 × 10 <sup>-3</sup>	0,5	1718		
		1	1981	4,51 ± 0,45	0,223 ± 0,022
4	2,64 × 10 <sup>-3</sup>	0,5	2471		
		1	2289	6,28 ± 0,34	0,159 ± 0,008
5	2,61 × 10 <sup>-3</sup>	0,5	2691		
		1	2318	6,54 ± 0,69	0,154 ± 0,016
7,5	2,67 × 10 <sup>-3</sup>	0,5	2779		
		1	2159	6,59 ± 1,17	0,154 ± 0,027

**Tab. II.8: Experimentelle Daten zu Abb. 5.11 Die Substratphosphorylierung der kinaseinaktiven Variante IRKD-K1018A.** Reaktionsbedingungen: 1 μM Poly(Lysin), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 250 μM [γ-<sup>32</sup>P]ATP, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, variierenden Konzentrationen von IRKD-K1018A, 1 μM IRKD. Die IRKD wurde für 5 Minuten vorphosphoryliert. Reaktion bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die IRKD-K1018A durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE.

**Tab. II.9**

IRKD-K1018A [μM]	Kinase	Phosphateinbau [cpm]	Phosphateinbau [pmol]	PE [mol/mol]	P-Ser [%]	P-Ser [pmol]
9	HIS	5768	5,90	0,59	5,6	0,33
	K1018A	176108	180,25		2,6	4,7
2,5	HIS	37996	38,89	3,89	11,55	4,49
	K1018A	87488	89,55		19,23	17,2
0,25	HIS	55664	56,97	5,70	20,75	11,82
	K1018A	15716	16,09		31,54	5,1
	IRKD	37152	46,5	4,65	15,8	7,33
	IRKD-HIS	37752	47,3	4,73	20,8	9,81

spez. Aktivität 799 cpm/pmol ATP

**Tab. II.9: Experimentelle Daten zu Abb. 5.12: Substratphosphorylierung der IRKD-K1018A durch die IRKD-HIS in Abhängigkeit von der Substratkonzentration.** Reaktionsbedingungen: 1 μM Poly(Lysin), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 250 μM [γ-<sup>32</sup>P]ATP, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, variierende IRKD-K1018A Konzentrationen, 1 μM IRKD. Reaktionszeit 20 Minuten bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE. Bestimmung der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung nach dünn-schichtchromatographischer Auftrennung der Phosphoaminosäuren durch Phosphoimager-Analyse.

**Tab. II.10**

	Zeit	Phosphateinbau [cpm]	Phosphateinbau [pmol]	PE [mol/mol]	P-Ser [%]	P-Ser [mol/mol]
+ Poly(Lysin)						
IRKD-HIS	1	3595	5,23	0,523	17,3	0,09
10 pmol	2,5	8258	12,01	1,201	18,2	0,22
	5	13532	19,69	1,969	17,3	0,34
	10	20850	30,33	3,033	20,95	0,64
	20	27827	40,48	4,048	25,8	1,04
IRKD-K1018A	1	10042	14,61	0,58	12,9	0,07
20 pmol	2,5	17408	25,32	1,01	18,1	0,23
	5	26070	37,92	1,52	18,5	0,28
	10	43580	63,39	2,54	20,7	0,53
	20	58420	84,97	3,399	23,9	1,02
spezifische Radioaktivität: 687 cpm/pmol ATP						
- Poly(Lysin)						
IRKD-HIS	1	7038	1,05	0,21	-	-
5 pmol	2,5	15720	2,34	0,47	-	-
	5	21218	3,16	0,63	-	-
	10	36120	5,38	1,08	-	-
	20	59490	8,86	1,77	4,9	0,44
IRKD-K1018A	1	1860	0,28	0,03	-	-
10 pmol	2,5	4128	0,62	0,06	-	-
	5	6900	1,03	0,10	-	-
	10	11278	1,68	0,17	-	-
	20	14124	2,10	0,21	5,2	0,11

spezifische Radioaktivität: 6711 cpm/pmol ATP

**Tab. II.10: Experimentelle Daten zu Abb. 5.13: Zeitverlauf der IRKD-K1018A Substratphosphorylierung durch die IRKD-HIS in An- oder Abwesenheit von 1  $\mu$ M Poly(Lysin).** Reaktionsbedingungen: 1  $\mu$ M/ kein Poly(Lysin), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 250  $\mu$ M [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 2,5  $\mu$ M IRKD-K1018A, 1  $\mu$ M IRKD. Reaktion bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE. Bestimmung der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung nach dünnenschichtchromatographischer Auftrennung der Phosphoaminosäuren durch Phosphoimager-Analyse.

### 12.3 Experimentelle Daten zu Kapitel 6: Die duale Aktivität der IRKD in der Substratphosphorylierung

Die experimentelle Daten für die Bestimmung der kinetischen Konstanten der Substratphosphorylierung der IRKD (Tab. 6.1) sind den Diplomarbeiten von J. Müller (1997), M. Goder (1995) und S. Lehr (1995) entnommen. Die kinetischen Konstanten für die Gab-1 Phosphorylierung (Tab 6.2) finden sich in Lehr et al. 1998: Phosphorylation of recombinant Human Gab-1 protein Domains by EGF-Receptor and human Insulin receptor in vitro, JBC eingereicht zur Publikation.

Tab. III.1	GST-CT [µM]	Phosphateinbau* [cpm]	Phosphateinbau** [cpm]	Einbau [pmol]	Einbau [mol/mol]	Ser-P [%]	Ser-P [pmol]
IRKD							
	0	8189 ± 335	17997 ± 532	41,5 ± 11,33	4,15	23 ± 0,4	9,4
	0,1	-	17456 ± 123	48,09	4,81	20 ± 4,1	9,4
	0,5	9135 ± 114	13700 ± 1168	37,59 ± 0,21	3,76	22 ± 2,5	8,2
	1	8373 ± 487	13203 ± 484	35,34 ± 1,45	3,53	18 ± 1,7	6,4
	5	5628 ± 96	12078 ± 972	28,17 ± 7,22	2,82	18 ± 1,7	5,0
	10	4838 ± 38	12490 ± 818	27,12 ± 10,31	2,71	13 ± 1,1	3,6
	15	5596 ± 50	-	22,93	2,29	8 ± 1,5	1,8
	25	4694 ± 83	9533 ± 696	22,75 ± 4,97	2,28	5 ± 2,2	1,1
	50	3416 ± 709	-	13,99	1,399	2 ± 1	0,3
GST-CT							
	0,1	-	3106 ± 814	8,56	-	29,4	2,52
	0,5	2246 ± 104	4634 ± 139	10,99 ± 2,52	-	24,5 ± 1,4	2,69
	1	4553 ± 253	7103 ± 820	19,11 ± 1,11	-	24,9 ± 0,1	4,76
	5	10349 ± 6	26349 ± 5822	57,50 ± 21,34	-	17,5 ± 0,7	10,1
	10	27451 ± 217	44521 ± 2552	117,58 ± 7,17	-	7,88 ± 0,9	9,26
	15	17198 ± 361	-	70,48	-	-	-
	25	33616 ± 3432	52194 ± 14675	140,77 ± 4,19	-	8,53 ± 1,1	12,01
	50	40335 ± 5301	-	165,31	-	7,5	12,39

\* spezifische Radioaktivität: 244 cpm/pmol ATP

\*\* spezifische Radioaktivität: 363 cpm/pmol ATP

**Tab. III.1: Experimentelle Daten zu Abb. 6.4 A: Einfluß der Substratkonzentration (GST-CT) auf die Autophosphorylierungsreaktion der IRKD.** Reaktionsbedingungen: 1 µM Poly(Lysin), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 250 µM [γ-<sup>32</sup>P]ATP, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, variierende GST-CT Konzentrationen, 1µM IRKD. Reaktionszeit 20 Minuten bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE. Bestimmung der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung der Phosphoaminosäuren durch Phosphoimager-Analyse.

Tab. III.2	IRS-1 p30 [µM]	Phosphateinbau* [cpm]	Phosphateinbau** [cpm]	Einbau [pmol]	Einbau [mol/mol]	Ser-P [%]	Ser-P [pmol]
IRKD							
	0	12504	39030	63,88 ± 14	5,41	24	15,3
	0,5	11996	-	51,93	5,19	26	13,5
	1	11592	-	50,18	5,02	25	12,5
	5	9009	-	39,00	3,9	23	9,0
	10	7785	14340	30,44 ± 5	3,37	19	5,8
	25	4888	13273	23,10 ± 3	2,12	10	2,3
	50	-	8051	15,19	1,52	11	1,7
hIRS-1 p30							
	0,5	2402	-	10,4		38,5	4,0
	1	2303	-	10,0		35,9	3,6
	5	8583	-	37,5		32,65	12,2
	10	22655	27420	74,9 ± 33		29,56	22,1
	25	37600	83633	160,3 ± 4		14,96	27,2
	50	-	147075	277,5		9,8	30,5

\* spezifische Radioaktivität: 231 cpm/pmol ATP

\*\* spezifische Radioaktivität: 530 cpm/pmol ATP

**Tab. III.2 : Experimentelle Daten zu Abb. 6.4 B: Einfluß der Substratkonzentration (hIRS-1 p30) auf die Autophosphorylierungsreaktion der IRKD.** Reaktionsbedingungen: 1 µM Poly(Lysin), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 250 µM [γ-<sup>32</sup>P]ATP, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, variierende hIRS-1 p30 Konzentrationen, 1µM IRKD. Reaktionszeit 20 Minuten bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE. Bestimmung der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung der Phosphoaminosäuren durch Phosphoimager-Analyse.

**Tab. III.3**

H2b [ $\mu$ M]	Phosphateinbau* [cpm]	Phosphateinbau** [cpm]	Einbau [pmol]	Einbau [mol/mol]	Ser-P [%]	Ser-P [mol/mol]
IRKD						
0,5	11750	-	46,82	4,68	25,4	1,19
1	10108	-	40,27	4,03	26	1,05
5	8080	-	32,19	3,22	24,6	0,79
10	8540	-	34,02	3,4	22,8	0,78
50	-	13300	26,65	2,67	10,13	0,27
100	-	13313	26,68	2,67	10,51	0,28
200	-	12151	24,35	2,44	7,8	0,19
250	-	10940	21,92	2,19	3,4	0,07
H2b						
0,5	493		1,96		-	
1	1814		7,225		-	
5	12189		48,56		-	
10	31198		124,295		-	
50		87375	175,1		-	
100		189370	379,5		-	
200		307370	615,97		-	
250		338050	677,45		-	

\* spezifische Radioaktivität: 251 cpm/pmol ATP

\*\* spezifische Radioaktivität: 499 cpm/pmol ATP

**Tab. III.3: Experimentelle Daten zu Abb. 6.4 C: Einfluß der Substratkonzentration (Histon 2b) auf die Autophosphorylierungsreaktion der IRKD.** Reaktionsbedingungen: 1  $\mu$ M Poly(Lysin), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 250  $\mu$ M [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, variierende H2b Konzentrationen, 1 $\mu$ M IRKD. Reaktionszeit 20 Minuten bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE. Bestimmung der Phosphoamino-säure-Zusammensetzung nach dünn-schichtchromatographischer Auftrennung der Phosphoamino-säuren durch Phosphoimager-Analyse.

**Tab. III.4**

MBP [ $\mu$ M]	Phosphateinbau* [cpm]	Phosphateinbau** [cpm]	Einbau [pmol]	Einbau [mol/mol]	Ser-P [%]	Ser-P [mol/mol]
IRKD						
0,5	13153	-	32,6	3,26	29	0,94
1	16207	-	40,1	4,01	27	1,08
5	15766	-	39,0	3,9	28	1,09
10	15958	-	39,5	3,95	28	1,11
50	-	32880	34,4	3,44	19	0,65
100	-	30045	31,4	3,14	17	0,53
250	-	28302	29,6	2,96	14	0,41
400	-	24015	25,1	2,51	8	0,20
MBP						
0,5	150	-	0,37	-	-	-
1	245	-	0,61	-	-	-
5	328	-	0,81	-	-	-
10	1490	-	3,69	-	-	-
50	-	2875	9,01	-	-	-
100	-	4689	14,70	-	-	-
250	-	21573	67,63	-	-	-
400	-	67180	210,60	-	-	-

\* spezifische Radioaktivität: 404 cpm/pmol ATP

\*\* spezifische Radioaktivität: 319 cpm/pmol ATP

**Tab. III.4: Experimentelle Daten zu Abb. 6.4 D: Einfluß der Substratkonzentration (Myelin Basic Protein) auf die Autophosphorylierungsreaktion der IRKD.** Reaktionsbedingungen: 1  $\mu$ M Poly(Lysin), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 250  $\mu$ M [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, variierende MBP Konzentrationen, 1 $\mu$ M IRKD. Reaktionszeit 20 Minuten bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE. Bestimmung der Phosphoamino-säure-Zusammensetzung nach dünn-schichtchromatographischer Auftrennung der Phosphoamino-säuren durch Phosphoimager-Analyse.

Tab.  
III.5

Zeit [min]	Phosphateinbau* [cpm]	Phosphateinbau** [cpm]	Einbau [pmol]	Einbau [mol/mol]	Ser-P [%]	Ser-P [pmol]
IRKD						
0,5	4219	7883	23,45 ± 10,7	2,34 ± 1,07	3,8	0,9 ± 0,4
1	7696	7768	29,76 ± 1,17	2,98 ± 0,12	4,8	1,4 ± 0,1
2,5	10778	7710	35,44 ± 7,19	3,54 ± 0,72	8,5	3,0 ± 0,6
5	7695	8291	30,79 ± 2,63	3,08 ± 0,26	8,4	2,6 ± 0,2
10	7299	8591	30,63 ± 4,51	3,06 ± 0,45	9,2	2,8 ± 0,4
20	8481	8956	33,57 ± 2,39	3,36 ± 0,24	14,7	4,9 ± 0,4
5 µM GST-CT						
0,5	2253	2667	9,49 ± 1,43	-	-	-
1	10153	6165	31,22 ± 9,83	-	-	-
2,5	19099	9580	54,76 ± 24,10	-	7,21	3,95 ± 0,87
5	15342	11062	50,61 ± 9,99	-	13,33	6,75 ± 1,33
10	17464	11986	56,42 ± 13,06	-	16,56	9,34 ± 2,16
20	18309	13103	60,21 ± 12,19	-	17,5	10,54 ± 2,13

\* spezifische Radioaktivität: 266 cpm/pmol ATP

\*\* spezifische Radioaktivität: 254 cpm/pmol ATP

Zeit [min]	Phosphateinbau* [cpm]	Phosphateinbau* * [cpm]	Einbau [pmol]	Einbau [mol/mol]	Ser-P [%]	Ser-P [pmol]
IRKD						
0,5	446	299	1,39 ± 0,17	0,14 ± 0,02	-	-
1	1057	654	3,18 ± 0,57	0,32 ± 0,06	-	-
2,5	1535	1015	4,75 ± 0,64	0,48 ± 0,06	-	-
5	2475	1550	7,48 ± 1,29	0,75 ± 0,13	-	-
10	4095	2629	12,51 ± 1,94	1,25 ± 0,19	3	0,3
20	4427	3378	14,66 ± 0,49	1,47 ± 0,05	5	0,7
50 µM GST-CT						
0,5	-	260	1,1	-	-	-
1	756	768	2,9 ± 0,5	-	-	-
2,5	1938	1989	7,5 ± 1,3	-	2,8	0,21
5	6682	6509	25,1 ± 3,5	-	5,7	1,43
10	19062	18803	72,1 ± 10,6	-	6,1	4,40
20	40916	46572	168,0 ± 41,5	-	7,6	12,77

\* spezifische Radioaktivität: 295 cpm/pmol ATP

\*\* spezifische Radioaktivität: 236 cpm/pmol ATP

**Tab. III.5: Experimentelle Daten zu Abb. 6.9: Zeitabhängigkeit der Substratphosphorylierung des GST-CT Fusionsproteins durch die IRKD.** Reaktionsbedingungen: 1 µM Poly(Lysin), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 250 µM [γ-<sup>32</sup>P]ATP, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 5 bzw. 50 µM GST-CT, 1µM IRKD. Reaktion bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE. Bestimmung der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung der Phosphoaminosäuren durch Phosphoimager-Analyse.

Tab.  
III.6

Zeit [min]	Phosphateinbau* [cpm]	Phosphateinbau** [cpm]	Einbau [pmol]	Einbau [mol/mol]	Ser-P [%]	Ser-P [pmol]
IRKD						
0,5	10638	7930	26,59 ± 3,18	2,66 ± 0,32	-	-
1	12961	8077	29,51 ± 0,20	2,95 ± 0,02	1,3	0,4
2,5	14606	9099	33,26 ± 0,24	3,33 ± 0,02	4,9 ± 1,5	1,6
5	15441	8929	33,90 ± 2,03	3,39 ± 0,20	8,7 ± 2,2	2,9
10	16248	9544	35,94 ± 1,75	3,59 ± 0,18	15,0 ± 4	5,4
20	15381	-	35,20	3,52	17,4	6,1
5 µM GST-CTphe						
0,5	1112	540	2,25 ± 0,41	-	41	0,9
1	2003	818	3,78 ± 1,14	-	50	1,9
2,5	3717	2388	8,59 ± 0,13	-	69	5,9
5	6858	3481	14,18 ± 2,15	-	73	10,3
10	8318	5200	18,97 ± 0,09	-	77	14,
20	11506	5086	22,41 ± 5,54	-	72	16,2

\* spezifische Radioaktivität: 437 cpm/pmol ATP

\*\* spezifische Radioaktivität: 275 cpm/pmol ATP

Zeit [min]	Phosphateinbau* [cpm]	Phosphateinbau** [cpm]	Einbau [pmol]	Einbau [mol/mol]	Ser-P [%]	Ser-P [pmol]
IRKD						
0,5	1927	2694	1,03 ± 0,47	0,10 ± 0,05	0,4 ± 0,1	-
1	4367	5606	2,21 ± 0,88	0,22 ± 0,09	1,0	0,02
2,5	16701	15534	6,97 ± 1,27	0,70 ± 0,13	-	-
5	46428	31184	12,30 ± 0,77	1,23 ± 0,08	1,7 ± 0,4	0,28
10	31511	26714	12,50 ± 1,46	1,25 ± 0,15	5,6 ± 0,1	0,70
20	-	28818	14,60	1,46	7,5 ± 0,3	1,09
50 µM GST-CTphe						
0,5	273	494	0,19 ± 0,09	-	42	0,08
1	330	1174	0,37 ± 0,31	-	43	0,16
2,5	955	1588	0,62 ± 0,26	-	56	0,35
5	4905	5220	2,46 ± 0,26	-	73	1,80
10	9860	15674	6,26 ± 2,38	-	82	5,13
20	-	20118	10,19	-	80	8,15

\* spezifische Radioaktivität: 2155 cpm/pmol ATP

\*\* spezifische Radioaktivität: 1974 cpm/pmol ATP

**Tab. III.6: Experimentelle Daten zu Abb. 6.12: Zeitabhängigkeit der Substratphosphorylierung von GST-CTphe.** Reaktionsbedingungen: 1 µM Poly(Lysin), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 250 µM [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 5 bzw. 50 µM GST-CTphe, 1µM IRKD. Reaktion bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE. Bestimmung der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung der Phosphoaminosäuren durch Phosphoimager-Analyse.

Tab.  
III.7

GST-CTphe [µM]	Zeit [min]	Phosphateinbau [cpm/min]	Phosphateinbau [pmol/min]	1/ Phosphateinbau [min/pmol]
1	0,5	3808		
	1	2047	4,32 ± 1,84	0,254 ± 0,108
5	0,5	8694		
	1	3887	9,29 ± 5,02	0,126 ± 0,068
10	0,5	8205		
	1	4353	9,28 ± 4,02	0,119 ± 0,052
25	0,5	10470		
	1	5945	12,12 ± 4,73	0,089 ± 0,035
50	0,5	11677		
	1	6371	13,33 ± 5,54	0,082 ± 0,034

spezifische Radioaktivität: 677 cpm/pmol ATP

**Tab. III.7 (vorherige Seite): Experimentelle Daten zu Abb. 6.13: Substratphosphorylierung von GST-CTphe durch die IRKD.** Reaktionsbedingungen: 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM  $\text{MnCl}_2$ , 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, variierende GST-CTphe Konzentrationen, 1 $\mu\text{M}$  IRKD. Die Reaktion erfolgte mit für 5 Minuten vorphosphoryliertem Enzym. Reaktion bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE. Bestimmung der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung nach dünn-schichtchromatographischer Auftrennung der Phosphoaminosäuren durch Phosphoimager-Analyse.

**Tab. III.8**

Zeit [min]	Phosphat einbau [cpm]	Einbau [pmol]	Einbau [mol/mol]	Ser-P/Thr-P [%]	Ser-P/Thr-P [mol/mol]
IRKD					
1	66813	38,75	3,88	3,4	0,13
2,5	65590	38,05	3,80	4,6	0,18
5	65585	38,04	3,80	8,3	0,32
10	71820	41,66	4,17	8,6	0,36
20	68720	39,86	3,99	9,5	0,38
5 $\mu\text{M}$ IRS-1 p30					
1	49436	28,7		5,3	1,5
2,5	65790	38,2		10,4	3,97
5	77366	44,9		16,2	7,3
10	71100	41,2		32,4	13,4
20	73560	42,7		32,5	13,9

spez. Aktivität: 1724 cpm/pmol ATP

**Tab. III.8: Experimentelle Daten zu Abb. 6.15: Zeitverlauf der Substratphosphorylierung von hIRS-1 p30 durch die IRKD.** Reaktionsbedingungen: 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM  $\text{MnCl}_2$ , 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 5  $\mu\text{M}$  hIRS-1 p30, 1 $\mu\text{M}$  IRKD. Reaktion bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE. Bestimmung der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung nach dünn-schichtchromatographischer Auftrennung der Phosphoaminosäuren durch Phosphoimager-Analyse.

**Tab. III.9**

Peptid [ $\mu\text{M}$ ]	Phosphateinbau (1 min) [cpm]	Phosphateinbau (20 min) [cpm]	Phosphateinbau (1 min) [pmol]	Phosphateinbau (20 min) [pmol]	Ser-P (20 min) [%]
IRKD					
10		91616		41,68	23
50		119244		54,25	25
100		118124		53,74	24
250		116328		52,92	26
500		81512		37,08	23
Peptid Ser1309					
10	408	1488	0,19	0,68	-
50	912	3384	0,41	1,54	-
100	1016	5872	0,46	2,67	-
250	1080	17224	0,49	7,84	-
500	1112	27344	0,51	12,44	-

spez. Aktivität: 2198 cpm/pmol ATP

**Tab. III.9: Experimentelle Daten zu Abb. 6.17 Substratphosphorylierung des synthetischen Peptids Ser1309 durch die IRKD.** Reaktionsbedingungen: variierende Peptidkonzentrationen, 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM  $\text{MnCl}_2$ , 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 $\mu\text{M}$  IRKD. Reaktion bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE. Bestimmung der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung nach dünn-schichtchromatographischer Auftrennung der Phosphoaminosäuren und Phosphoimager-Analyse.

**Tab. III.10 (nächste Seite): Experimentelle Daten zu Abb. 6.18 Substratphosphorylierung des synthetischen Peptids Ser1078 durch die IRKD.** Reaktionsbedingungen: variierende Peptidkonzentrationen, 1  $\mu\text{M}$  Poly(Lysin), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM  $\text{MnCl}_2$ , 250  $\mu\text{M}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 $\mu\text{M}$  IRKD. Reaktion bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE. Bestimmung der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung nach dünn-schichtchromatographischer Auftrennung der Phosphoaminosäuren und Phosphoimager-Analyse.

**Tab. III.10**

Peptid [μM]	Phosphateinbau (1 min) [cpm]	Phosphateinbau (20 min) [cpm]	Phosphateinbau (1 min) [pmol]	Phosphateinbau (20 min) [pmol]	Ser-P (20 min) [%]
IRKD					
10	-	104088	-	47,36	22
50	-	126616	-	57,61	25
100	-	137200	-	62,42	26
250	-	120992	-	55,05	24
500	-	93972	-	42,75	21
Peptid Ser1309					
10	102	1232	0,05	0,56	-
50	512	3768	0,23	1,71	-
100	704	6680	0,32	3,04	-
250	1016	13616	0,46	6,19	-
500	1408	29224	0,64	13,30	-

spez. Aktivität: 2198 cpm/pmol ATP

**12.4 Experimentelle Daten zu Kapitel 7: Die transiente Phosphorylierung der IRKD**

Die experimentelle Daten zur Untersuchung des ATP-Umsatzes der Phosphotransferase-Reaktion (Kap. 7.1, Abb. 7.1) sind der Diplomarbeit von J. Koch (1998) entnommen.

**Tab. IV.1**

	Konzentration [μM]	Phosphateinbau [cpm]	Phosphateinbau [pmol]	Phosphateinbau [mol/mol]
	0	38834	39,39	3,94
	50	36170	36,68	3,67
	100	32707	33,17	3,32
ATP	250	29242	29,66	2,97
	500	21143	21,44	2,14
	1000	18493	18,76	1,88
	2500	18659	18,92	1,89
	0	38834	39,39	3,94
	50	38762	39,31	3,93
	100	38072	38,61	3,86
ADP	250	37525	38,06	3,81
	500	38218	38,76	3,88
	1000	36130	36,64	3,66
	2500	34560	35,05	3,51

spezifische Radioaktivität: 986 cpm/pmol ATP

ATP	10 mM	22589	18,10	1,81
ADP	10 mM	32959	26,41	2,64

spezifische Radioaktivität: 1248 cpm/pmol ATP

**Tab. IV.1: Experimentelle Daten zu Abb. 7.4: Pulse-Chase-Reaktion der IRKD in Abhängigkeit der ATP und ADP-Konzentration.** Das Enzym wurde für 20 Minuten vorphosphoryliert (Reaktionsbedingungen s. Anhang II. Tab. II.4) und anschließend eine Chase-Reaktion durchgeführt. Reaktionsbedingungen Chase-Reaktion: variierende ATP oder ADP Konzentrationen, 1 μM Poly(Lysin), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 μM IRKD. Reaktionszeit 20 Minuten bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE.

**Tab. IV.2: Experimentelle Daten zu Abb. 7.5 A (nächste Seite): Zeitverlauf der transienten Phosphorylierung der IRKD unter Pulse-Chase Bedingungen.** Das Enzym wurde für 20 Minuten vorphosphoryliert (Reaktionsbedingungen s. Anhang II. Tab. II.4) und anschließend eine zeitabhängige Chase-Reaktion durchgeführt. Reaktionsbedingungen Chase-Reaktion: 2,5 mM ATP, 1 μM Poly(Lysin), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 μM IRKD. Reaktion bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE.

Tab.  
IV.2

Zeit [min]	Phosphat einbau [cpm]	Einbau [pmol]	Einbau [mol/mol]
P5	50436	42,9	4,29
5,5	43299	36,8	3,68
6	43338	34,7	3,47
7,5	31026	26,4	2,64
10	24863	21,1	2,11
20	24696	21,0	1,66
P20	46439	39,5	3,95

spezifische Radioaktivität: 1176 cpm/pmol ATP

Tab.  
IV.3

Zeit [min]	Phosphat einbau [cpm]	Einbau [pmol]	Einbau [mol/mol]
IRKD (Pulse)			
0,5	11401	38,21	3,82
1	13228	44,34	4,43
2,5	12808	42,9	4,29
5	13673	45,8	4,58
10	13201	44,25	4,42
20	13448	45,1	4,51
30	13389	44,9	4,49

spezifische Radioaktivität: 298,1 cpm/pmol ATP

IRKD (Hot Chase)			
5,5	1033	4,7	0,47
6	1821	8,2	0,82
7,5	3854	17,4	1,74
10	4497	20,3	2,03
20	5003	22,6	2,26
30	5034	22,76	2,28

spezifische Radioaktivität: 221,1 cpm/pmol ATP

**Tab. IV.3: Experimentelle Daten zu Abb. 7.5 B: Zeitverlauf der transienten Phosphorylierung der IRKD unter Pulse-Hot Chase Bedingungen.** Das Enzym wurde für 5 Minuten phosphoryliert (Reaktionsbedingungen s. Anhang II. Tab. II.4), nach 5 Minuten [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP zugefügt anschließend die Reaktion zeitabhängig verfolgt. Reaktion bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE.

Tab.  
IV.4

Zeit [min]	Phosphat einbau [cpm]	Einbau [pmol]	Einbau [mol/mol]	Ser-P [%]	Ser-P [pmol]
+ regenerierendes System					
0,5	16682	35,57	3,56	2,53	0,09
1	19263	41,07	4,11	3,65	0,15
2,5	19746	42,10	4,21	7,6	0,32
5	19655	41,91	4,19	9,07	0,38
10	19536	41,65	4,17	9,59	0,40
30	16448	35,07	3,51	11,68	0,41
60	8738	18,63	1,86	22,04	0,41
- regenerierendes System					
0,5	18691	39,85	3,99	2	0,08
1	19660	41,92	4,19	3,8	0,16
2,5	20283	43,25	4,32	7,7	0,33
5	20453	43,61	4,36	12,5	0,55
10	19383	41,33	4,13	20,9	0,86
30	19591	41,77	4,18	27,5	1,15
60	19001	40,51	4,05	28	1,13

spezifische Radioaktivität: 469 cpm/pmol ATP

**Tab. IV.4: Experimentelle Daten zu Abb. 7.6: Zeitverlauf der IRKD-Autophosphorylierung in Anwesenheit eines ATP-regenerierenden Systems.** Das Enzym wurde in Ab- oder Anwesenheit eines ATP-regenerierenden Systems phosphoryliert (1  $\mu$ M Poly(Lysin), 250  $\mu$ M [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10  $\mu$ g/ $\mu$ l Pyrovatkinase (10 U/ $\mu$ g), 4 mM Phosphoenolpyrovat, 1  $\mu$ M IRKD, Raumtemperatur). Bestimmung des Phosphateinbaus durch Messung der Cerenkov-Strahlung nach SDS-PAGE. Phosphoaminosäure-Analyse nach dünnstschichtchromatographischer Auftrennung und Phosphoimager-Analyse.

**Tab. IV.5**

Zeit [min]	Phosphat einbau [cpm]	Einbau [pmol]	Einbau [mol/mol]	Ser-P [%]	Ser-P [pmol]
Pulse-Chase					
P1	16990	10,09	1,01	-	-
C20	8240	4,90	0,49	-	-
P2,5	18780	11,16	1,12	-	-
C20	9021	5,36	0,54	-	-
P5	21459	12,75	1,28	-	-
C20	10152	6,03	0,6	-	-
P10	21610	12,84	1,28	-	-
C10	10581	6,29	0,63	-	-
spezifische Radioaktivität: 1683 cpm/pmol ATP					
Pulse					
0,5	25437	12,64	1,26	-	-
1	25878	12,86	1,29	-	-
2,5	28712	14,26	1,43	-	-
5	27456	13,64	1,36	-	-
10	28074	13,95	1,39	-	-
20	29720	14,76	1,48	-	-
Pulse-Hot Chase					
20,5	3560	1,77	0,18	-	-
21	6075	3,02	0,30	-	-
22,5	9442	4,69	0,47	-	-
25	13737	6,82	0,68	-	-
30	14199	7,05	0,71	-	-
40	13944	6,93	0,69	-	-

spezifische Radioaktivität: 2013 cpm/pmol ATP

**Tab. IV.5: Experimentelle Daten zu Abb. 7.9 A, B: Zeitverlauf Autophosphorylierung der IRKD-Y1316/22T unter Pulse-Chase und Pulse-Hot Chase Bedingungen.** Reaktionsbedingungen Chase: s. Tab. IV.2 Reaktionsbedingungen Hot Chase: s. Tab. IV.3. Reaktion bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphat-einbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE. Bestimmung der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung nach dünn-schichtchromatographischer Auftrennung der Phosphoaminosäuren und Phosphoimager-Analyse.

**Tab. IV.6**

Zeit [min]	Phosphat einbau [cpm]	Einbau [pmol]	Einbau [mol/mol]	Ser-P [%]	Ser-P [pmol]
Pulse-Chase					
P10	24024	30,14	3,01	29,0	0,87
C20	17533	22,00	2,20	37,7	0,83
spezifische Radioaktivität: 797 cpm/pmol ATP					
P20	69206	29,47	2,95	38	1,1
C20	52232	22,25	2,22	44,1	0,98
spezifische Radioaktivität: 2384 cpm/pmol ATP					
Pulse-Hot Chase					
20,5	3396	2,71	0,27	-	-
21	4448	3,55	0,36	11	0,04
22,5	6503	5,19	0,52	17,3	0,09
30	8545	6,82	0,68	23,5	0,16
40	10826	8,64	0,86	24,4	0,21
50	12054	9,62	0,96	35,4	0,34

spezifische Radioaktivität: 1253 cpm/pmol ATP

**Tab. IV.6: Experimentelle Daten zu Abb. 7.9 C, D: Zeitverlauf Autophosphorylierung der IRKD-Y1316/22F unter Pulse-Chase und Pulse-Hot Chase Bedingungen.** Reaktionsbedingungen Chase: s. Tab. IV.2 Reaktionsbedingungen Hot Chase: s. Tab. IV.3. Reaktion bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphat-einbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE. Bestimmung der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung nach dünn-schichtchromatographischer Auftrennung der Phosphoaminosäuren und Phosphoimager-Analyse.

Zeit [min]	Phosphateinbau* [cpm]	Phosphateinbau** [cpm]	Einbau [pmol]	Einbau [mol/mol]	Ser-P [%]	Ser-P [pmol]
IRKD-HIS						
0,5	745	1905	1,56 ± 1,13	0,16	8,65	0,14
1	1214	7331	2,68 ± 2,04	0,27	9,08	0,24
2,5	-	6007	7,46	0,75	8,63	0,64
5	-	9325	11,58	1,16	10,48	1,21
10	12156	12326	13,88 ± 2,03	1,39	11	1,53
20	14876	-	15,23	1,52	12,5	1,90
IRKD-K1018A						
0,5	2030	5535	4,48 ± 3,39	-	6,45	0,29
1	3781	9583	7,89 ± 5,68	-	9,05	0,71
2,5	-	16992	21,11	-	9,23	1,95
5	-	25344	31,48	-	10,36	3,26
10	40043	32735	40,83 ± 0,23	-	11,94	4,87
20	45738	-	46,81	-	12,90	6,04

spezifische Radioaktivität: 977 cpm/pmol ATP\*

spezifische Radioaktivität: 805 cpm/pmol ATP\*\*

**Tab. IV.7: Experimentelle Daten zu Abb. 7.12: Zeitverlauf der Substratphosphorylierung der IRKD-K1018A durch die IRKD-HIS unter Pulse-Hot-Chase Bedingungen.** Reaktionsbedingungen Hot Chase: s. Tab. IV.3. Der Ansatz enthielt zusätzlich 2,5 µM IRKD-K1018A. Reaktion bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE. Bestimmung der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung nach dünn-schichtchromatographischer Auftrennung der Phosphoaminosäuren und Phosphoimager-Analyse.

**Tab. IV.8**

		Phosphat einbau [cpm]	Einbau [pmol]	Einbau [mol/mol]	Ser-P [%]	Ser-P [pmol]
5 µM GST-CTmut						
	P20	36843	40,18	4,02	15,5	6,23
IRKD	C20	25158	27,43	2,74	21,5	5,9
	P40	35020	38,17	3,82	18,3	6,99
	P20	53435	58,27	-	16	9,32
GST-CT	C20	34743	37,89	-	24,8	9,39
	P40	53590	58,44	-	18	10,51
spezifische Radioaktivität: 917 cpm/pmol ATP						
25 µM GST-CTmut						
	P10	17233	14,00	1,4	3,2	0,44
IRKD	C10	12960	10,53	1,05	4,0	0,42
	P20	26965	21,90	2,19	5,1	1,17
	P10	55920	45,43	-	2,6	1,19
GST-CT	C10	55472	45,06	-	2,5	1,13
	P20	162480	131,99	-	7,5	9,89

spezifische Radioaktivität: 1231 cpm/pmol ATP

**Tab. IV.8: Experimentelle Daten zu Abb. 7.14 A: Substratphosphorylierung des GST-CT Fusionsproteins unter Pulse-Chase Bedingungen.** Reaktionsbedingungen Chase: s. Tab. IV.2. Der Ansatz enthielt zusätzlich die angegebenen Substrat-Konzentrationen. Reaktion bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE. Bestimmung der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung nach dünn-schichtchromatographischer Auftrennung der Phosphoaminosäuren und Phosphoimager-Analyse.

**Tab. IV.9**

Protein	Zeit [min]	Phosphat einbau [cpm]	Einbau [pmol]	Einbau [mol/mol]	Ser-P [%]	Ser-P [pmol]
5 $\mu$ M GST-Ex20						
	P20	32126	45,25	4,53	13,24	0,60
IRKD	C20	24654	34,72	3,47	16,0	0,55
	P40	28944	40,77	4,08	12,3	0,50
	P20	18823	26,51	-	0	-
GST-Ex20	C20	18594	26,19	-	0	-
	P40	17733	24,98	-	0	-
25 $\mu$ M GST-Ex20						
	P20	12357	17,40	1,74	6,5	0,09
IRKD	C20	12892	18,16	1,82	5,02	0,09
	P40	12987	18,29	1,83	7,1	0,12
	P20	76986	108,43	-	0	-
GST-Ex20	C20	76593	107,88	-	0	-
	P40	77206	108,74	-	0	-

spezifische Radioaktivität: 710 cpm/pmol ATP

**Tab. IV.9: Experimentelle Daten zu Abb. 7.15 A: Substratphosphorylierung des GST-Ex20 Fusionsproteins unter Pulse-Chase Bedingungen.** Reaktionsbedingungen Chase: s. Tab. IV.2. Der Ansatz enthielt zusätzlich die angegebenen Substrat-Konzentrationen. Reaktion bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphat-einbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE. Bestimmung der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung der Phosphoaminosäuren und Phosphoimager-Analyse.

**Tab. IV.10**

Protein	Zeit [min]	Phosphat einbau [cpm]	Einbau [pmol]	Einbau [mol/mol]	Ser-P [%]	Ser-P [pmol]
5 $\mu$ M GST-JM						
	P20	34940	49,21	4,92		
IRKD	C20	29271	41,23	4,12		
	P40	33267	46,85	4,69		
	P20	34940	42,15	-		
GST-JM	C20	29271	42,25	-		
	P40	33267	46,74	-		
25 $\mu$ M GST-JM						
	P20	10219	14,39	1,44		
IRKD	C20	9260	13,04	1,3		
	P40	32034	22,64	2,26		
	P20	10219	26,09	-		
GST-JM	C20	9260	28,01	-		
	P40	32034	171,63	-		

spezifische Radioaktivität: 710 cpm/pmol ATP

**Tab. IV.10: Experimentelle Daten zu Abb. 7.15 B: Substratphosphorylierung des GST-JM Fusionsproteins unter Pulse-Chase Bedingungen.** Reaktionsbedingungen Chase: s. Tab. IV.2. Der Ansatz enthielt zusätzlich die angegebenen Substrat-Konzentrationen. Reaktion bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphat-einbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE. Bestimmung der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung der Phosphoaminosäuren und Phosphoimager-Analyse.

Tab.  
IV.11

Zeit [min]	Phosphateinbau* [cpm]	Phosphateinbau ** [cpm]	Einbau [pmol]	Einbau [mol/mol]	Ser-P [%]	Ser-P [pmol]
IRKD						
0,5	156386	-	30,78	3,08	2,51	0,77
1	167840	287180	34,11 ± 1,52	3,41 ± 0,15	4,93	1,68
2,5	176960	294640	35,47 ± 0,90	3,55 ± 0,09	6,13	2,17
5	181160	292760	35,77 ± 0,15	3,58 ± 0,01	8,9	3,18
10	205900	316540	39,66 ± 1,23	3,97 ± 0,12	12,89	5,11
20		327320	40,11	4,01	-	-
30	191572	283580	36,23 ± 2,10	3,62 ± 0,21	17	6,16
40	-	291500	35,72	3,57	-	-
50	-	288000	35,29	3,53	-	-
60	175920	276020	34,23 ± 0,57	3,42 ± 0,06	22,56	7,72
GST-IRS-1 p30						
0,5	76872	-	15,13	-	0,41	0,06
1	74596	180460	18,40 ± 5,25	-	3,83	0,70
2,5	96976	213880	22,65 ± 5,03	-	8,52	1,93
5	113860	242800	26,08 ± 5,19	-	12,93	3,37
10	127428	246440	27,64 ± 3,62	-	15,10	4,17
20	-	260300	31,90	-	-	-
30	126840	241220	27,26 ± 3,25	-	20,89	5,70
40	-	234210	28,70	-	-	-
50	-	232660	28,51	-	-	-
60	119572	223860	25,48 ± 2,75	-	28,59	7,29
+ ATP regenerierendes System						
IRKD						
0,5	114510	-	22,54	2,25	2,36	0,53
1	166880	229680	30,50 ± 3,33	3,05 ± 0,33	2,67	0,81
2,5	188320	283520	35,91 ± 1,65	3,59 ± 0,16	2,9	1,04
5	190120	270180	35,27 ± 3,05	3,53 ± 0,31	4,2	1,48
10	-	253120	32,65 ± 2,31	3,26 ± 0,23	5,11	1,67
20	174146	212460	26,03	2,60	-	-
30	71313	162480	16,97 ± 4,15	1,70 ± 0,42	11,1	1,88
40	-	150740	18,47	1,85	-	-
50	-	136680	16,75	1,67	-	-
60	45656	101830	10,73 ± 2,47	1,07 ± 0,25	21,73	2,33
GST-IRS-1 p30						
0,5	53854		10,60	-	-	-
1	86088	112130	15,34 ± 2,27	-	1,74	0,27
2,5	105910	149870	19,61 ± 1,76	-	3,82	0,75
5	111010	153970	20,36 ± 2,11	-	5,05	1,03
10	94072	138010	17,71 ± 1,14	-	10,61	1,88
20	-	109530	13,42	-	-	-
30	43956	80153	9,24 ± 0,83	-	22,03	2,03
40	-	67006	8,21	-	-	-
50	-	56620	6,94	-	-	-
60	30411	39700	5,43 ± 0,79	-	29,88	1,62

spezifische Radioaktivität: 5080 cpm/pmol ATP\*

spezifische Radioaktivität: 8161 cpm/pmol ATP\*\*

Zeit [min]	Phosphat einbau [cpm]	Einbau [pmol]	Einbau [mol/mol]
+ ATP regenerierendes System + 100 $\mu$ M ADP			
IRKD			
6	252280	31,3	3,13
7,5	223100	27,68	2,77
10	215960	26,79	2,68
20	186210	23,10	2,31
30	172240	21,37	2,14
40	135560	16,82	1,68
50	119250	14,79	1,48
60	101360	12,57	1,26
GST-IRS-1 p30			
6	133780	16,39	-
7,5	119690	14,67	-
10	111150	13,62	-
20	85353	10,46	-
30	81573	10,00	-
40	59515	7,29	-
50	51350	6,29	-
60	46564	5,71	-

spezifische Radioaktivität: 8161cpm/pmol ATP

**Tab. IV.11: Experimentelle Daten zu Abb. 7.17: Substratphosphorylierung von hIRS-1 p30 durch die IRKD in Anwesenheit eines ATP regenerierenden Systems.** Reaktionsbedingungen s. Tab. IV.4. Der Ansatz enthielt zusätzlich 5  $\mu$ M GST-hIRS-1 p30. Reaktion bei Raumtemperatur. Bestimmung des Phosphateinbaus in die Proteinbanden durch Messung der Cerenkov-Strahlung der erhaltenen Gelbanden nach SDS-PAGE. Bestimmung der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung der Phosphoaminosäuren und Phosphoimager-Analyse.

ATP [ $\mu$ M]	Zeit [min]	Phosphateinbau IRKD [cpm]	Phosphateinbau hIRS-1 p30 [cpm]
	0	2429	10511
	0,2	1692	10836
0	1	2132	12084
	10	2268	10788
	0,2	1692	9668
1	1	1972	10622
	10	3360	9558
	0,2	1850	8506
10	1	2362	8842
	10	7158	4100
	0,2	2298	7744
100	1	2586	5558
	10	1730	1486
	0,2	2732	8746
1000	1	2546	5720
	10	1772	1720

**Tab. IV.12: Experimentelle Daten zu Abb. 7.19: Zeitverlauf der transienten Phosphorylierung des vorphosphorylierten hIRS-1 p30.** Die Reaktionsansätze enthielten 2,5  $\mu$ l des vorphosphorylierten Enzym-Substrat Gemisches (Kap. 7.3.3, Tab. 7.3), 1  $\mu$ M Poly(Lysin), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1  $\mu$ M IRKD und variierende ATP-Konzentrationen. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Kinase gestartet und zu den angegebenen Zeitpunkten durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Im Anschluß daran erfolgte die Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE und die Bestimmung der inkorporierten Radioaktivität.

## 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 Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

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

## Teilpublikationen:

M. Affüpper, U. Beemelmans, C. Fried, C. Magg, N. Tennagels und H.W. Klein (1996)

Is the insulin receptor unique among receptor tyrosine kinases?

Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 377, 154

und

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

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

Characterisation of the intrinsic serine phosphorylation of the insulin receptor

Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 377, 154

und

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

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

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

Diabetes, 46, suppl. 1, 384

H. Al-Hasani, B. Eisermann, N. Tennagels, C. Magg, W. Paßlack, M. Koenen, D. Müller-Wieland, H.E. Meyer, H.W. Klein (1997)

Identification of Ser-1275 and Ser-1309 as autophosphorylation sites of the insulin receptor.

FEBS Letters 400, 65-70

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

The insulin receptor kinase phosphorylates substrates on serine residues

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

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

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

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

N. Tennagels (1997)

Mechanisms of soluble receptor kinases

Seminar der Kölner Biochemie in der Medizinischen und Naturwissenschaftlichen Fakultät, Universität zu Köln

N.Tennagels (1998)

The insulin receptor kinase

From Insulin Receptor to Diabetic Complication, International Symposium of SFB 351 and the Diabetes Research Institute; University of Düsseldorf

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

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

Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 379, PS1/28

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

Mutational analysis of the soluble insulin receptor kinase

Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 379, PS1/27

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

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. H.W. Klein für die Überlassung des interessanten Themas, die unzähligen Stunden der wissenschaftlichen Diskussion, die kontinuierliche und großzügige finanzielle Unterstützung aber insbesondere für das mir entgegengebrachte Vertrauen und das freundschaftliche Verhältnis sowie für die vielen Anregungen und die ständige Hilfsbereitschaft.

Herrn Dr. J.A. Maassen und Darryl Telting (Universität Leiden) möchte ich für ihre Gastfreundschaft und die Hilfe bei den *in situ-Experimenten* danken.

Herrn Prof. Dr. Müller-Wieland, Dr. J. Kotzka und Herrn Dipl. Biol. Stefan Lehr danke ich für die Überlassung der rekombinanten IRS-1 und Gab-1 Proteine.

Meinen Kollegen Melanie Affüpper, Hadi Al-Hasani, Kristin Bähr, Ulrike Beemelmans, Barbara Behle, Shanti Conn, Theresa Corona, Cora Fried, Daniela Kessler, Joachim Koch, Sima Khadamlou, Marlies Koenen, Oliver Leven, Claudia Magg, Jörg Müller, Volker Nölle, Susan Parvaresh, Waltraud Paßlack, Felicitas Priboth, Alexander Wieber, Angela Wirth und Birgit Manze danke ich für die gute Zusammenarbeit, das angenehme Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft.

Insbesondere gilt dies für Melanie, Claudia und Volker.

An dieser Stelle sei auch allen guten Geistern des Biochemischen Instituts gedankt, die mich niemals verlassen haben: Martina Fischer, Khamis Jacob, Gerhild Jugert, Manfred Kreikler, Michael Lohmer, Uwe Otto, Gunter Pillunat, Herr Pyschny und Fritz Schmitz.