

Wie Signalkomplexe die Spezifität von Kinasen beeinflussen

Diplomarbeit

Im Fach Biologie

An der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität zu Köln

Vorgelegt von

Daniel-Sebastian Karau

Aus Rheine

Köln, 26.November.2004

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 1 |
| 2 | ZUSAMMENFASSUNG..... | 1 |
| 3 | EINLEITUNG | 3 |
| 3.1 | Allgemeine Einführung | 3 |
| 3.2 | Kinasen und ihre Funktion | 3 |
| 3.3 | Der Insulinrezeptor und seine Kinasefunktion | 4 |
| 3.4 | Die Substrate des Insulinrezeptors und ihre Funktion..... | 7 |
| 3.5 | Die PTB-Domäne des IRS-1 | 9 |
| 3.6 | Bedeutung der Serinphosphorylierung innerhalb des Insulinsignalwegs | 9 |
| 3.7 | Fragestellung | 12 |
| 4 | ERGEBNISSE | 13 |
| 4.1 | Klonierung einer GST-Variante der LIRK $_{\Delta 72C}$ Mut..... | 13 |
| 4.2 | Klonierung einer dimeren PTB-Mutante GST-PTB $_{Mut}$ | 15 |
| 4.3 | Reinigung der löslichen Insulinrezeptorkinase IRKD und IRKD $_{Mut}$ | 17 |
| 4.4 | Charakterisierung der LIRK $_{wt}$ und LIRK $_{Mut}$ durch Autophosphorylierung | 18 |
| 4.5 | Substratphosphorylierung von GST-IGF $_{D \rightarrow A}$ durch die Kinasen LIRK $_{wt}$ und LIRK $_{Mut}$ | 19 |
| 4.6 | Substratphosphorylierung von GST-PTB $_{Mut}$ durch LIRK $_{wt}$ und LIRK $_{Mut}$ | 21 |
| 4.7 | Klonierung von zwei monomeren Varianten der IRS1-PTB | 24 |
| 4.8 | Substratphosphorylierung der His-PTB $_{275}$ durch LIRK $_{wt}$ und LIRK $_{Mut}$ | 26 |
| 4.9 | Kompetition der His-PTB $_{275}$ durch phosphorylierten GST-IGF $_{NT}$ | 28 |
| 4.10 | Zeitabhängige Phosphorylierung der His-PTB $_{275}$ durch unterschiedliche Kinasemengen | 30 |
| 5 | DISKUSSION..... | 32 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 5.1 | Die verwendeten PTB-Derivate | 32 |
| 5.2 | Charakterisierung der Kinasen | 33 |
| 5.3 | Änderung der Kinaseaktivität durch Bildung eines Komplexes mit der PTB-Domäne | 34 |
| 5.4 | Wie erklärt sich die duale Spezifität der Insulinrezeptorkinase mit den publizierten Röntgenstrukturdaten? | 38 |
| 5.5 | Erklärt die beobachtete duale Aktivität der Insulinrezeptor-kinase auch die duale Aktivität anderer Kinasen? | 39 |
| 5.6 | Ausblicke..... | 39 |
| 6 | MATERIAL UND METHODEN | 40 |
| 6.1 | Material..... | 40 |
| 6.1.1 | Bakterienstämme, Viren, Kulturmedien und –zusätze | 40 |
| 6.1.2 | Chemikalien..... | 40 |
| 6.1.3 | Chromatographiematerial | 42 |
| 6.1.4 | Kit-Systeme | 42 |
| 6.1.5 | Laborgeräte..... | 42 |
| 6.1.6 | Molekulargewichts- und Längenstandards | 45 |
| 6.1.7 | Nucleinsäuren | 45 |
| 6.1.8 | Proteine..... | 46 |
| 6.1.9 | Puffer und Lösungen | 47 |
| 6.1.10 | Verbrauchsmaterial | 50 |
| 6.2 | Methoden | 51 |
| 6.2.1 | Molekularbiologische Methoden | 51 |
| 6.2.2 | Baculovirusexpressionssystem | 59 |
| 6.2.3 | Proteinexpression in <i>E.coli</i> | 63 |
| 6.2.4 | Chromatographische Darstellung | 64 |
| 6.2.5 | Konzentrierung der gereinigten Proteine mittels Ultrafiltration | 67 |
| 6.2.6 | Charakterisierung von Proteinkonzentration und -Identität..... | 68 |
| 6.2.7 | Autophosphorylierung mit anschließender nativer PAGE..... | 71 |
| 6.2.8 | Substratphosphorylierung durch LIRK und ihre Varianten | 71 |
| 6.2.9 | Bestimmung des Phosphateinbaus..... | 72 |
| 6.2.10 | Phosphoaminosäure- und Nukleotidanalyse..... | 72 |
| 6.2.11 | Abspaltung des GST-Tag durch Thrombinbehandlung..... | 74 |
| 7 | LITERATURVERZEICHNIS..... | I |

| | | |
|------------|------------------------|-----------|
| 8 | ANHANG | VI |
| 8.1 | Anhang A) | VI |
| 8.2 | Anhang B) | IX |

1 Abkürzungsverzeichnis

| | | | |
|----------------|--|----------------------|---------------------------------------|
| # | Nummer | Gln, Q | Glutamin |
| # | Nummer | Glu, E | Glutamat |
| °C | Grad Celsius | Gly, G | Glycin |
| μCi | Mikrocurie | GST | Glutathion-S-Transferase |
| μg | Mikrogramm | | |
| μl | Mikroliter | H | |
| μM | Mikromolar | h | Stunde |
| A | | hIR | humaner Insulinrezeptor |
| A | Adenin | His, H | Histidin |
| Ala, A | Alanin | HPLC | High Pressure Liquid Chromatography |
| Abb. | Abbildung | I | |
| AcNPV | Autographa californica Nuclear Polyhydrosis Virus | Ig | Immunglobulin |
| AP | alkalische Phosphatase | Ile, I | Isoleucin |
| APS | Ammoniumpersulfat | IGF | Insulin-like growth factor |
| Arg, R | Arginin | IGF-1R | Insulin-like growth factor-1 Rezeptor |
| AS | Aminosäure | IR | Insulinrezeptor |
| Asn, N | Asparagin | IRKD | Insulinrezeptor-Kinasedomäne |
| Asp, D | Aspartat | IRS-1 | Insulinrezeptor-Substrat-1 |
| ADP | Adenosindiphosphat | | |
| ATP | Adenosintriphosphat | J | |
| | | JM | Juxtamembran-Domäne |
| B | | K | |
| BCIP | 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat | Kap. | Kapitel |
| BSA | Rinderserumalbumin | KD | Tyrosinkinase-Domäne |
| bzw. | beziehungsweise | | |
| C | | L | |
| ca. | Circa | Leu, L | Leucin |
| cDNA | DNA-Kopie der mRNA | Lys, K | Lysin |
| Ci | Curie | LIRK | lösliche Insulinrezeptorkinase |
| cpm | counts per minute, Zählimpuls pro Minute | M | |
| CT | C-terminale Domäne | M | mol/l |
| Cys, C | Cystein | mA | Milliampere |
| | | max. | maximal |
| D | | Met, M | Methionin |
| d.h. | das heißt | min | Minute |
| Da, kDa | Dalton, Kilodalton | min. | mindestenz |
| DMSO | Dimethylsulfoxid | ml | Milliliter |
| DNA | Desoxiribonucleinsäure | mm | Millimeter |
| DTT | Dithiothreitol | MQ | Millipore Wasser |
| | | M_r | Molekulargewicht |
| E | | ms | Millisekunde |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure | N | |
| EGFR | Epidermal growth factor Rezeptor | NBT | Nitroblautetrazoliumchlorid |
| et al. | et aliter | | |
| F | | O | |
| FGFR | Fibroplast growth factor Rezeptor | OD | optische Dichte |
| FPLC | Fast performance Liquid Chromatography | od. | oder |
| G | | P | |
| g | 1. Erdbeschleunigung, 9,81ms ⁻² 2. Gramm | p.i. | post infection |
| G | Guanin | Pi | anorganisches Phosphat |
| | | PBS | phosphate buffered saline |

1. Abkürzungsverzeichnis

| | | | |
|-----------------|--|---------------|---|
| PDGFR | Platelet-derived growth factor Rezeptor | TBS | Tris Buffered Saline |
| PEG | Polyethylenglycol | TEMED | N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin |
| pH | potentium hydrogenii | Thr, T | Threonin |
| Phe, F | Phenylalanin | TM | Transmembran-Domäne |
| PL | Poly-L-Lysin | Tris | Tris-(Hydroxymethyl)- aminomethan |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid | Trp, W | Tryptophan |
| Pro, P | Prolin | Tyr, Y | Tyrosin |
| pS | Phosphoserin | U | |
| pT | Phosphothreonin | U | Uracil |
| PTB | Phosphotyrosinbindende Domäne des IRS-1 | u.a. | unter anderem |
| PVDF | Polyvinylidendifluorid | UE | Untereinheit |
| pY | Phosphotyrosin | UV | Ultraviolett |
| R | | V | |
| rpm | revolutions per minute | V | Volt |
| RT | Raumtemperatur | v/v | volume/volume, ml Volumen in 100ml Gesamtvolumen |
| RTK | Rezeptor-Tyrosinkinase | Val, V | Valin |
| S | | vgl. | vergleiche |
| s. | siehe | W | |
| s.a. | siehe auch | W | Watt |
| s.o. | siehe oben | w/v | weight/volume, g Substanz in 100ml Gesamtvolumen |
| SDS | Natriumdodecylsulfat | Wt | Wildtyp |
| SDS-PAGE | SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese | X | |
| sec | Sekunde | X | beliebige Aminosäure |
| Ser, S | Serin | Z | |
| Sf9 | Spodoptera frugiperda | z.B. | zum Beispiel |
| sog. | sogenannt | | |
| spez. | spezifisch | | |
| T | | | |
| Tab. | Tabelle | | |

2 Zusammenfassung

Es wurde beobachtet, dass der Insulinrezeptor nach Stimulation durch Insulin duale Aktivität, d.h. Phosphorylierung von Tyrosinresten und Serinresten, in der Autophosphorylierung erlangt. Wird die lösliche Insulinrezeptorkinase als GST-Fusionsprotein, und damit als stetes Dimer, exprimiert, so zeigt auch diese Kinase duale Aktivität in der Autophosphorylierung. Substrate konnten bisher nur durch den Insulinrezeptor oder den verwanten IGF-Rezeptor an Serinresten phosphoryliert werden, wenn im Phosphorylierungsansatz Poly-Lysin in äquimolaren Konzentrationen vorlag.

In der vorliegenden Arbeit habe ich den Einfluss der PTB-Domäne des IRS-1 auf die Spezifität der löslichen Insulinrezeptorkinase (LIRK) untersucht.

Zur Beantwortung der Fragestellung habe ich die lösliche Insulinrezeptorkinase LIRK $_{\Delta 72C}$ Mut kloniert und erfolgreich exprimiert und gereinigt. In dieser Kinase ist das Tyrosin⁹⁶⁰ durch Phenylalanin substituiert und an Position Lysin¹²⁷² trunkiert worden. Diese Substitution ist sowohl sequenziell als auch durch Autophosphorylierungsexperimente bestätigt worden.

Für die Substratphosphorylierungen wurden die LIRK_{wt} sowie die LIRK_{Mut}, welche ebenfalls die oben erwähnte Substitution trägt, jedoch nicht trunkiert worden ist, verwendet. Diese Kinasen wurden von mir erfolgreich gereinigt und durch Auto- und Substratphosphorylierung charakterisiert. Die Phosphorylierung der Substrate erfolgte durch vorher, durch eine Autohosphorylierungsreaktion, aktivierten Kinasen ohne Zugabe von weiteren Agenzien wie Poly-Lysin.

Deweiteren wurden folgende PTB-Derivate kloniert, exprimiert und in Substratphosphorylierungsreaktionen eingesetzt:

- GST-PTB_{Mut}, dem N-terminal ein zusätzliches Tyrosin angefügt wurde. Dieses Konstrukt wurde durch die LIRK_{wt} mit $V_{\text{Initial}} = 0,29 \text{ pmol P} \times \text{pmol Kinase}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ effizient phosphoryliert. Eine Phosphorylierung durch die LIRK_{Mut} ergab eine 10fach langsamere Phosphorylierung. Signifikante Serinphosphorylierung des Substrates konnte nur durch die LIRK_{wt} erreicht werden.
- His-PTB₂₇₅, welches aus der PTB-Domäne über das Serin²⁷⁰ hinaus und einem C-terminalen His-Tag besteht. Das Substrat wurde sowohl durch die verwendeten Insulinrezeptorkinasen als auch durch die Akt-Kinase phosphoryliert. Die Initialgeschwindigkeit der LIRK_{wt} lag mit $0,03 \text{ pmol P} \times \text{pmol Kinase}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ deutlich unter der für das Substrat GST-PTB_{Mut}. Auch bei diesem Substrat wurde der Befund bestätigt, dass die LIRK_{Mut} das Substrat 10fach langsamer phosphoryliert.

Durch beide Kinasen konnte das Substrat signifikant an Serin- und Threoninresten phosphoryliert werden.

- His-PTB₂₆₃, welches der von Eck *et al.*, 1998 kristallisierten PTB-Domäne entspricht. Dieses PTB-Derivat besitzt nicht das Serin²⁷⁰ und konnte nicht durch die Akt-Kinase phosphoryliert werden. Eine Phosphorylierung durch die LIRK_{wt} war möglich, wenn auch nicht effizient ($V_{\text{Initial}} = 0,003 \text{ pmol P} \times \text{pmol Kinase}^{-1} \times \text{min}^{-1}$). Auch in diesem Substrat konnte deutliche Serin- und Threoninphosphorylierung nachgewiesen werden.

Aufgrund der von mir beobachteten Ergebnisse wird ein möglicher Mechanismus dualer Kinasen diskutiert

3 Einleitung

3.1 Allgemeine Einführung

Phosphorylierung von Proteinen ist die häufigste posttranslationale Modifikation. Die reversible Übertragung von Phosphatresten spielt eine entscheidende Rolle für die Zellkommunikation und das Überleben der Zelle. Unkontrollierte Phosphorylierung kann die Ursache oder die Konsequenz von Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Krebs oder diverser Immunerkrankungen sein (Cohen, 2002). Darüber hinaus wird die Wichtigkeit der Proteinphosphorylierung in der eukaryotischen Signalübertragung dadurch unterstrichen, dass Proteinkinasen, die für die Phosphorylierung verantwortlich sind, ungefähr 2% des gesamten Genoms ausmachen (Rubin *et al.*, 2000). Die Sequenzierung des menschlichen Genoms hat mindestens 500 verschiedene Kinasen ausgewiesen, die aufgrund ihrer strukturellen Übereinstimmungen in etwa 20 Unterfamilien eingeteilt werden können (Manning *et al.*, 2002).

Die Familie der Proteinkinasen wurde lange Zeit in zwei Klassen eingeteilt: Protein-Serin/Threonin-Kinasen (PSK), die entsprechend für Serin- und/oder Threoninreste spezifisch sind, und Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK), die Tyrosine phosphorylieren. Durch die Entdeckung von mehreren Proteinkinasen, die fähig sind, sowohl sich selbst als auch Substrate an Tyrosinresten und Serin-/Threoninresten zu phosphorylieren, wurde eine dritte Kinase-Klasse postuliert: Kinasen mit dualer Spezifität (Lindberg *et al.*, 1992).

3.2 Kinasen und ihre Funktion

Serin/Threonin-Kinasen sind bei weitem am besten untersucht. Das am besten dokumentierte Modell für eine Kinase diesen Typs ist die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA). Diese wurde als erste Kinase überhaupt 1991 kristallisiert und strukturell untersucht (Johnson *et al.*, 2001). Die PKA besitzt eine zweilappige Struktur, einen kleineren, vornehmlich aus β -Faltblättern aufgebauten N-terminalen Lappen und einem größeren, C-terminalen Lappen, der überwiegend α -helikal aufgebaut ist. Im Spalt zwischen den Lappen befinden sich sowohl die Substrat- als auch die ATP-Bindestelle. Untersuchungen zur Regulation dieser Kinase erbrachten Beweise dafür, dass die Phosphorylierung des Threonins¹⁹⁷ für die Aktivierung der Kinase verantwortlich ist, und desweiteren die Erkennung der regulatorischen Untereinheit ermöglicht.

Die Src-Kinase war die erste Tyrosinkinase, die charakterisiert wurde. Kinasen aus der Src-Familie sind unter anderem in die Signalkaskade von T-Zellen involviert. Entdeckt wurde die

Src-Kinase beim *Rous Sarcoma Virus*. Kinasen dieser Klasse bestehen aus fünf Untereinheiten, wobei die Kinase-Domäne als SH-1 bezeichnet wird. N-terminal davon befindet sich die SH2-Domäne, die Phosphotyrosine erkennen und binden kann, gefolgt von einer SH3-Domäne, die prolinreiche Sequenzen erkennt. Der N-terminale Bereich, der für die Membranverankerung verantwortlich ist, ist selbst innerhalb der Src-Kinasefamilie sehr divergent. C-Terminal von SH1 befindet sich das regulatorische Tyrosin⁵²⁷, welches nach Phosphorylierung durch die Csk (Src am C-Terminus phosphorylierende Kinase) zur Abschaltung der Kinasefunktion führt, da es mit der proteineigenen SH2-Domäne interagiert. Dabei ist zu beachten, dass die sequenzielle Umgebung des Tyrosin⁵²⁷ nicht optimal für die Erkennung durch SH2 ist und es sich bei dieser Bindung um schwache Wechselwirkungen handelt.

Ein klassisches Beispiel für eine Kinase mit dualer Spezifität stellt die MEK-Kinase dar. Diese phosphoryliert im MAP-Kinaseweg die MAPK-Kinase sowohl an Tyrosin¹⁸⁵ als auch an Threonin¹⁸³ in der Aktivierungsschleife und aktiviert sie somit (Johnson *et al.*, 2001).

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass der Insulinrezeptor nach Insulinstimulierung duale Aktivität in der Autophosphorylierung aufweist (Heidenreich *et al.*, 1994).

3.3 Der Insulinrezeptor und seine Kinasefunktion

Der Insulinrezeptor ist ein typischer Vertreter für Rezeptortyrosinkinasen. Er ist ein Heterotetramer ($\alpha_2\beta_2$), dessen Monomere sich ihrerseits aus zwei α - und zwei β -Untereinheiten zusammensetzen. Das apparente Molekulargewicht des Holorezeptors in der SDS-PAGE wird mit ca. 400 kDa angegeben; die Molekularmasse der α -Untereinheit beträgt ca. 130 kDa, die der β -Untereinheit ca. 90 kDa (Ullrich *et al.*, 1985). Dieser Komplex wird durch Disulfidbrücken stabilisiert. Der Rezeptor lässt sich funktionell und morphologisch in drei Bereiche untergliedern. Der extrazelluläre Bereich übernimmt die Funktion der Insulinbindung. Den Transmembrananteil bilden 23 Aminosäuren in Form einer α -Helix, die den extrazellulären und den intrazellulären

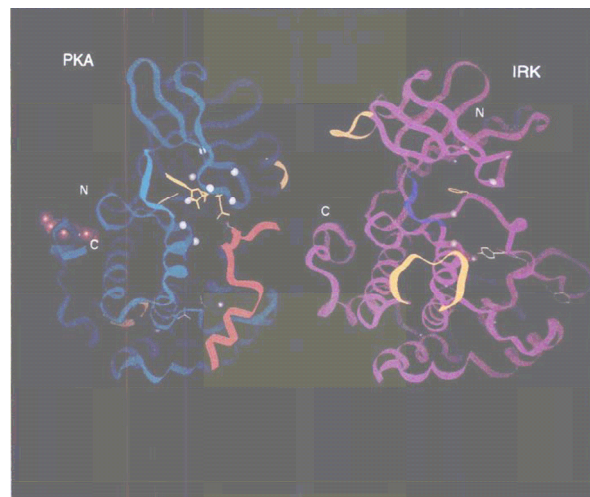


Abb 3.1. Struktur der Insulin-Rezeptorkinase (IRK) (rechts) und der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A (PKA) (links) Bändermodell der IRK von R981-E1283 sowie von der PKA von 22-312

Anteil der β -Untereinheit miteinander verbindet. Der cytoplasmatische Bereich der β -Untereinheit besteht aus 403 Aminosäuren und kann in eine Juxtamembran-, die Tyrosinkinase- (katalytische) und die C-terminale Domäne unterteilt werden.

Für mechanistische Untersuchungen des Insulinrezeptors wurde in vielen Arbeitsgruppen mit einem Kinasemodell der Insulinrezeptorkinase gearbeitet, welches den cytoplasmatischen Teil des Insulinrezeptors umfasst.

Wie bereits erwähnt entspricht die intrazelluläre (=lösliche) Insulinrezeptorkinase dem konservierten Faltungsschema von Proteinkinasen. An den Kristallstrukturen des nicht phosphorylierten (d.h. nicht aktivierten) Rezeptors und dem in der Aktivierungsschleife trisphosphorylierten und somit aktiven Rezeptors lässt sich der Aufbau der Kinase beschreiben (Hubbard *et al.*, 1994, Hubbard, 1997).

Der modulare Aufbau, der intrazellulären Kinase-Domäne, folgend als die löslichen Insulin-Rezeptorkinase (LIRK) bezeichnet, enthält zwei stark konservierte Kinasedomänen, die über einen Loop flexibel miteinander verbunden sind. Die Gesamtstruktur der Kinasedomäne ist der von Serin-/Threoninkinasen sehr ähnlich (Taylor *et al.*, 1995). 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. Die ATP-Bindungsstelle enthält einen glycinreichen Loop (zwischen Faltblatt $\beta 1$ und $\beta 2$) und ein invariantes Lysin¹⁰¹⁸ (Faltblatt $\beta 3$). Die Glycinreste 991, 993 und 996 übernehmen die Rolle der Ladungstrennung der α - und β -Phosphatreste des ATP, das invariante Lysin¹⁰¹⁸ koordiniert die beiden Phosphorylgruppen. In einem α -helikalen Abschnitt (αC) ist der invariante Glutamatrest Glu¹⁰³⁵ enthalten, der für eine zusätzliche Koordination des Mg^{2+} -ATP verantwortlich gemacht wird. Der C-terminale Lappen enthält den katalytischen Loop (HRDLAARN) mit der katalytischen Base Asp¹¹²⁰ und der Substraterkennungsequenz LAARN sowie den DFG-“Loop“, dem die Rolle eines Metall-Chelators zugesprochen wird. Beide Motive finden sich in benachbarten β -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 (Tyrosine 1146, 1150 und 1151 im IR bzw. Tyrosine 1131, 1135 und 1136 im IGF-1R.). In der nichtphosphorylierten Kinase blockiert er sowohl die ATP-Bindungstasche der N-terminalen als auch den katalytischen Loop der C-terminalen Domäne.

Das Modell, das sich für die Rezeptoraktivierung etabliert hat, basiert auf der Dimerisierung der Kinase mit anschließender Transphosphorylierung der Aktivierungsschleife. Dieser Prozess wird als Autophosphorylierung bezeichnet und überführt die Rezeptorkinase von einer Kinase mit basaler Aktivität in eine Kinase mit hoher Aktivität (Kohanski *et al.*, 1998, Baer, unveröffentlichte Versuche). Insgesamt werden außer den drei Tyrosinen in der Aktivierungsschleife (Y1146, Y1150, Y1151) noch zwei Tyrosine im C-Terminus phosphoryliert (Y1316, Y1322). Desweiteren werden wenig charakterisierte Tyrosinreste im N-Terminus phosphoryliert, obwohl im Insulinrezeptor die Phosphorylierung des Tyrosin 960 für die Ausbildung der Signalkomplexe eine wichtige Rolle spielt.

Aus der Röntgenstruktur erklärt sich die Funktion der Insulinrezeptorkinase als eine für Tyrosin spezifische Kinase (Hubbard, 1997). Dennoch wurde in unserer Arbeitsgruppe nicht nur, wie bereits erwähnt, für den Insulinrezeptor, sondern auch für die LIRK und andere lösliche Tyrosinkinase eine duale Kinase-Aktivität nachgewiesen.

Unter bestimmten experimentellen Bedingungen wie der Zugabe von Poly-Lysin autophosphoryliert sich diese Kinase an Serin¹²⁷⁵ und Serin¹³⁰⁹, die durch Sequenzierung identifiziert wurden (Al-Hasani *et al.*, 1994; Al-Hasani *et al.*, 1997). Die Bedingungen, unter denen auch in Substraten duale Phosphorylierung beobachtet wurden, wurden in der Folgezeit von Parvaresh und Noelle ausgearbeitet und konnten eine Verunreinigung durch assoziierte Serinkinasen ausschließen (Parvaresh 2000; Parvaresh *et al.*, 2002; Noelle *et al.*, 2000).

Nachfolgend konnte durch die Klonierung und Expression von GST-Kinasen unterstrichen werden, dass durch die künstliche Dimerisierung Kinasen aktiviert werden und duale Aktivität in der Autophosphorylierung erlangen (Baer *et al.*, 2001). Weder die verfügbaren

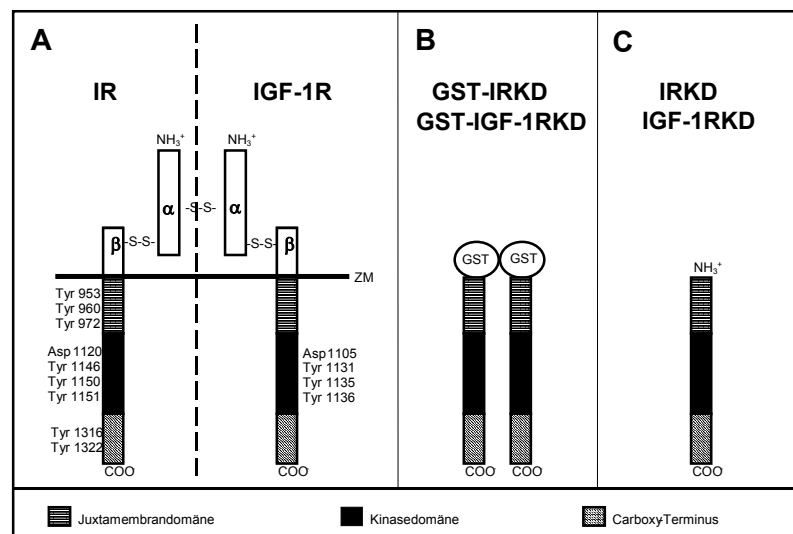


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der Untereinheiten des IR und des IGF-1R und deren Derivate.

A, IR (links; ($\alpha\beta$)-Einheit, Tyrosin-Autophosphorylierungsstellen und katalytische Base (Asp 1120) der β -UE sind angegeben) und IGF-1R (rechts; ($\alpha\beta$)-Einheit, Tyrosin-Autophosphorylierungsstellen in der Aktivierungsschleife und katalytische Base (Asp 1105) sind angegeben) Holorezeptoren (ZM=Zellmembran). **B**, die rekombinanten, dimeren Kinasen GST-IRKD und GST-IGF-1RKD. **C**, die monomeren Kinasen IRKD und IGF-1RKD. Die intrazellulären Abschnitte umfassen AS 941-1343 für IRKD (GST-IRKD) und AS 929-1337 für IGF-1RKD (GST-IGF-1RKD). Die Mutante GST-IGF-1RKDVK bzw. IGF-1RKDVK (nicht gezeigt) beinhaltet die AS 956-1256, was der „Core“-Kinasedomäne des IGF-1R entspricht. Nomenklatur nach Ullrich *et al.*, 1986.

Röntgenstrukturdaten des Insulinrezeptors (Hubbard *et al.*, 1994; Hubbard, 1997) noch die des verwandten IGF-Rezeptors, der als Fusionsprotein ebenfalls duale Aktivität aufweist (Baer *et al.*, 2001; Munshi *et al.*, 2002), geben Hinweise darauf, wie der Mechanismus dualer Kinasen zu verstehen ist.

Trotz einem unterschiedlichen Aufbau der Rezeptorkinasen unterliegen alle einem vergleichbaren Aktivierungsmechanismus, der generell eine Dimerisierung des Rezeptors erfordert. Die Rezeptoren der Insulinrezeptorfamilie unterscheiden sich jedoch von anderen Wachstumsrezeptoren wie EGF und PDGF (Schlessinger, 2000). Kinasen dieser Rezeptorklassen rekrutieren Signalproteine über Autophosphorylierungsstellen in den zytoplasmatischen Kinasedomänen. Im Gegensatz dazu rekrutiert der Insulinrezeptor seine Effektorproteine über neun potentielle Substrate, die als *docking*-Proteine von ihm an multiplen Tyrosinresten phosphoryliert werden.

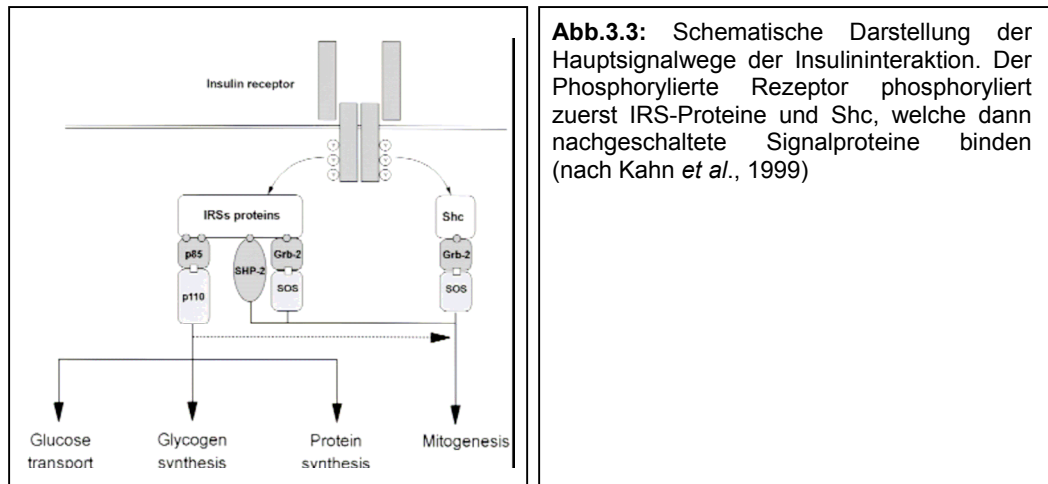
3.4 Die Substrate des Insulinrezeptors und ihre Funktion

Innerhalb des Insulinsignalweges wurden bisher neun potentielle Substrate des IR charakterisiert, die das Insulinsignal vielfältig in der Zelle weiterleiten. Hierbei handelt es sich um:

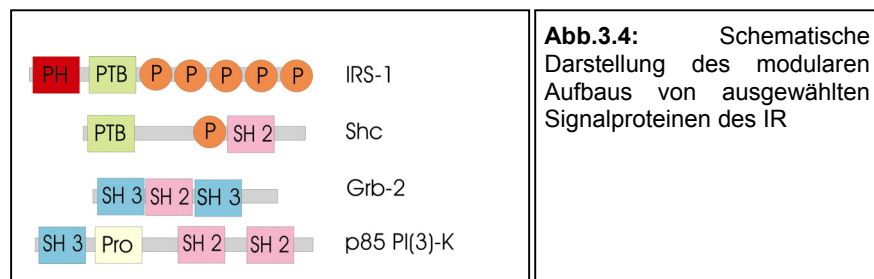
- IRS1-4
- Dok
- Grb-1
- Cbl
- APS
- Shc

Dabei ist zu beachten, dass einige dieser Substratproteine auch durch andere extrazelluläre Stimuli an Tyrosinresten phosphoryliert werden können (Ross *et al.*, 2004).

Die phosphorylierten Substrate rekrutieren dann nachgeschaltete Effektorproteine, die das eigentliche Signal weiterleiten. Zum einen ermöglicht die Verwendung gleicher Rekrutierungsproteine durch verschiedene Rezeptoren die Möglichkeit zum *Cross-Talk* zwischen verschiedenen Rezeptoren; zum anderen wird durch die Interaktion einzelner IRS-Proteine, die spezifische Signalcharakteristika aufweisen, die Anzahl der regulierbaren Signalwege erhöht. Hieraus ergibt sich die Möglichkeit der koordinierten zellulären Antwort (Lehr, 1998).



Alle Substrate des Insulinrezeptors besitzen einen ähnlichen modularen Aufbau, wobei sich die einzelnen Substratproteine in Anzahl und Aufbau ihrer Proteinmodule, wie der Plekstrin-homologen Domäne (PH), der Phosphotyrosin-bindenden Domäne (PTB) und der SH2-Domäne, unterscheiden (Abb. 4).



Die PH-Domäne ermöglicht die zelluläre Lokalisation von IRS-Proteinen an der Zellmembran, da sie mit verschiedenen Inositoltriphosphaten von Zellmembranbestandteilen interagieren kann (Salim *et al.*, 1996; Pitcher *et al.*, 1995). Die Wechselwirkung zwischen Rezeptor und seinem Substrat sowie die Ausbildung eines Signal-Komplexes erfolgt über ein Phosphotyrosin⁹⁶⁰ im Juxtamembranbereich des Rezeptors und der PTB-Domäne des Substrats. Das Substrat wird anschließend vielfach an Tyrosinresten phosphoryliert. Diese Tyrosinphosphorylierungsstellen ermöglichen die Interaktion mit SH2-tragenden Effektorproteinen.

3.5 Die PTB-Domäne des IRS-1

Unter den Insulinrezeptorsubstraten sind die Proteine IRS1 und IRS2 am besten untersucht worden. Zahlreiche Tyrosinphosphorylierungsmotive des IRS-1 ermöglichen die Interaktion mit verschiedenen Effektorproteinen, wie zum Beispiel der PI-3-Kinase (Lehr, 1998).

Die PTB-Domäne des IRS-1 interagiert mit dem phosphorylierten Tyrosinrest des Insulinrezeptors innerhalb des NPEpY⁹⁶⁰-Motivs (Wolf *et al.*, 1995).

Dieses Motiv findet sich im Juxtamembranbereich des IR. Eine Substitution dieses Tyrosins durch Phenylalanin führt *in vivo* zu einem Verlust der Insulin-induzierten Signalweiterleitung (White *et al.*, 1988, Kaburagi *et al.*,

1993). Erst durch Überexpression von IRS-1, und somit zu einer Konzentrationserhöhung der PTB, konnte die zelluläre Antwort auf den Insulinstimulus wieder hergestellt werden. (Chen *et al.*, 1995). Dies lässt vermuten, dass das Tyrosin⁹⁶⁰ für die Bindung und anschließende Phosphorylierung des IRS-1 zwar essentiell zu sein scheint, aber, wie der Versuch mit der Phenylalanin-Mutante des IR zeigt, durch Überexpression die Interaktion von Rezeptor und Substrat dennoch möglich ist.

Die PTB-Domäne ist eine in sich geschlossene Domäne und ähnelt in ihrer Struktur sehr der PH-Domäne (Abb.5). Sie besteht aus einem durch sieben β -Faltblätter geformten Kern, in den der N-Terminus eingebettet ist. Eine einzelne lange α -Helix am C-Terminus bildet eine Art „Deckel“ über dem β -Sandwich und ist für die Erkennung des NPXpY-Motives verantwortlich (Eck *et al.*, 1996).

3.6 Bedeutung der Serinphosphorylierung innerhalb des Insulinsignalwegs

In der Vergangenheit sind mehr und mehr Beweise dafür gefunden worden, dass die Serinphosphorylierung des Insulinrezeptors oder des IRS1 die Signalkaskade inhibiert. Obwohl diesem regulatorischen Weg äußerste Wichtigkeit beigemessen wird, ist es schwer, den zugrunde liegenden Mechanismus zu entschlüsseln. Allein die Substrate IRS-1 und IRS-2 enthalten jeweils über 30 Serin-/Threonin-Phosphorylierungsstellen in Konsensussequenzen für verschiedene Serin-/Threoninkinasen (Johnston *et al.*, 2003). Ferner scheint die Phosphorylierung an Serin-/Threoninresten ein genereller Abschaltmechanismus der

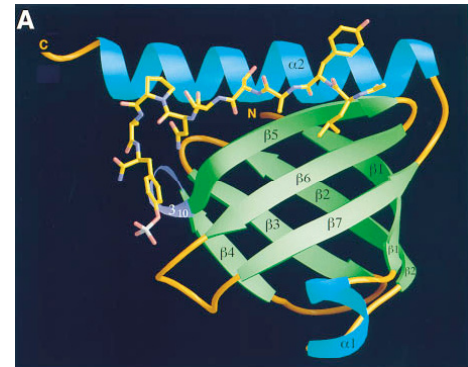


Abb.3.5 Struktur der IRS-1 PTB-Domäne (Carson 1991).

Die Struktur ist 0,29Å aufgelöst und mit einem gebundenen Insulinrezeptorpeptid dargestellt (Ac-LYASSNPpY-NH₂) Nach Eck, 1996

Insulinsignalkaskade zu sein, da Immunopräzipitate von durch Insulin stimulierten Zellen verstärkt Serin-/Threoninphosphorylierung zeigen (Paz *et al.*, 1997).

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

Die oben beschriebene starke Phosphorylierung des IRS-1 an Serin- und Threoninresten konnte sowohl in Zellkultur als auch *in vivo* nachgewiesen werden und zeigte, dass diese Art der Phosphorylierung mit einer verminderten Antwort auf das Insulinsignal einhergeht (Hotamisligil *et al.*, 1996). Es wird angenommen, dass dieser Mechanismus sowohl zu akuter als auch zu chronischer Insulinresistenz beiträgt.

Wie Tabelle 1 verdeutlicht, kommt der Suche nach Kinasen, die IRS-1 an Serin-/Threoninresten phosphorylieren können, verstärkte Bedeutung zu (Johnston *et al.*, 2003).

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

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

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

^cnicht bekannt.

Die Anzahl der Kinasen, die IRS-1 phosphorylieren, für sich genommen macht es wahrscheinlich, dass jede Kinase einen Teil zum Gesamtphosphorylierungsstatus des IRS-1 beiträgt. Durch einen *Yeast-tri-hybrid*-Versuch konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des C-terminal zur PTB-Domäne liegenden Serin³¹² des humanen IRS-1

durch die Stressinduzierte JNK1 (c-Jun N-terminal Protein Kinase) die Interaktion der PTB mit der katalytischen Untereinheit des Insulinrezeptors unterbricht. Ein möglicher Mechanismus für die beobachtete Unterbrechung der Interaktion der PTB mit dem phosphorylierten NPEpY⁹⁶⁰- Motiv des Insulinrezeptors wurde von Ogihara *et al.* (1997) publiziert.

3.7 Fragestellung

Wie bereits erwähnt, konnte unsere Arbeitsgruppe für den Insulinrezeptor nach Insulin-Stimulierung duale Spezifität in der Autophosphorylierung nachweisen (Heidenreich *et al.*, 1994). Die lösliche Kinasedomäne hingegen zeigt nur dann duale Aktivität in der Autophosphorylierung, wenn Poly-Lysin zugegen ist. Die Serinreste die in dieser Phosphorylierungsreaktion modifiziert werden, befinden sich mit Serin¹²⁷⁵ und Serin¹³⁰⁹ im C-Terminus der Kinase. Wie weiterhin in *in-situ*-Experimenten gezeigt werden konnte, wurden diese Serine auch durch den Insulinrezeptor nach Hormonstimulus phosphoryliert (Parvaresh, 2002). Während der aktivierte Insulinrezeptor aufgrund seiner dimeren Struktur ohne weitere Additiva duale Aktivität besitzt, erfüllt die lösliche Kinase diese Funktion nur, wenn Poly-Lysin als „Vernetzer“ fungiert. Durch die Expression als GST-Fusionsprotein, wobei zu erinnern ist, dass GST als natürliches Homo-Dimer vorliegt, konnte in der LIRK auch ohne Poly-Lysin Autophosphorylierung der oben genannten Serinreste beobachtet werden.

Da die natürliche duale Spezifität von Kinasen nicht nur die Auto- sondern auch die Substratphosphorylierung betrifft, war es ein wesentlicher Fortschritt, als in unserer Arbeitsgruppe die Bedingungen für die duale Spezifität in der Substratphosphorylierung gefunden wurden (Parvaresh, 2000). Allerdings verlangt auch diese Serinphosphorylierung die Anwesenheit von Poly-Lysin und das Vorliegen von 1:1-Komplexen zwischen Kinase und Substrat.

So wie die künstliche Dimerisierung durch die Verwendung von GST Poly-Lysin substituieren konnte, so liegt im IRS-1 mit der PTB-Domäne eine natürlich vorkommende Dimerisierungsdomäne vor. Wie bereits erwähnt besitzen alle Insulinrezeptorkinasen diese Domäne.

Es ist deshalb von Interesse zu untersuchen, ob sich die Spezifität der Tyrosinkinase in dem Komplex aus Insulinrezeptorkinase und PTB-Domäne des IRS-1 zu einer dualen Spezifität erweitert.

4 Ergebnisse

4.1 Klonierung einer GST-Variante der LIRK $_{\Delta 72C}$ Mut

Im ersten Teil meiner Arbeit wurde eine Mutante der löslichen Insulinrezeptorkinase (LIRK) von Arginin⁹⁴¹ bis Lysin¹²⁷¹ in einen GST-Tragenden Zielvektor pAC-G2T kloniert. Diese verkürzte Variante besitzt an Position 1272 anstelle eines Alanins ein Stopcodon sowie die Substitution Cystein⁹⁶⁹ durch Alanin (C969A). Das Tyrosin⁹⁶⁰, welches für die Interaktion mit der IRS-1 mit dem Insulinrezeptor eine zentrale Rolle spielt, wurde durch Phenylalanin (Y960F) ersetzt (Wieber, 1998). Abbildung 4.1 zeigt schematisch die GST-LIRK $_{\Delta 72C}$ Mut.

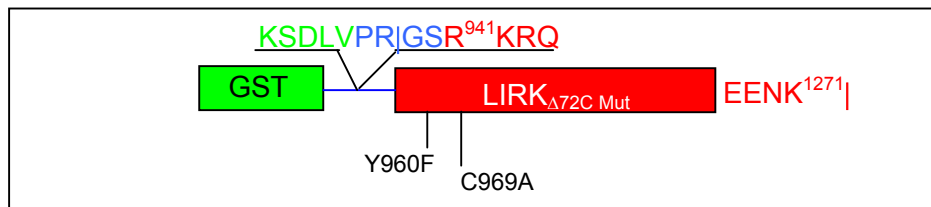


Abb. 4.1 : Schematische Darstellung der GST-LIRK $_{\Delta 72C}$ Mut

Das Konstrukt enthält einen GST-Tag (grün), eine Thrombinschnittstelle (blau), sowie die Kinasesequenz von R941 bis K1271. Die Sequenz enthält zwei Aminosäureaustausche: Y960→F sowie C969→A. Die vollständige Sequenz ist in Anhang A angegeben.

Nach Thrombinspaltung bleiben die Aminosäuren Glycin und Serin am N-Terminus der Kinase zurück.

Die Klonierung ermöglicht eine alternative Aufreinigungsmethode dieser Kinase über Affinitätschromatographie. Desweiteren führt der GST-Tag zu einer stets als Dimer vorliegende Kinase.

Die DNA der Kinase wurde mit Hilfe der Primer aus Tabelle 6.1 per PCR (siehe 6.2.1.6) amplifiziert, mit den Restriktionsenzyemen *Bam*HI und *Eco*RI geschnitten und mit dem gleichbehandelten Vektor pAC-G2T ligiert. Mit dem Ligationsansatz wurden *E.coli* DH5 α -Zellen transformiert, die Transformanden in Über-Nacht-Kulturen vermehrt und ihre DNA durch Restriktionshydrolyse mit den Enzymen BamHI und EcoRI auf die Kinasesequenz hin untersucht. Eine Sequenzierung des Vektors bestätigte, dass keinerlei Mutationen vorlagen (6.2.1.6.2). Die DNA-Sequenz ist in Anhang A vollständig angegeben. Der die Kinasesequenz enthaltende Vektor pAc-LIRK $_{\Delta 72C}$ Mut wurde durch DNA-Midipräparation (6.2.1.5.2) in ausreichender Menge und Reinheit gewonnen, und mit ihm wurden *Sf9*-Zellen transfiziert. Die GST-LIRK $_{\Delta 72C}$ Mut wurde für 48h exprimiert, die Zellen geerntet und lysiert (6.2.2.7). Anschließend wurde die GST-LIRK $_{\Delta 72C}$ Mut über Gluthation-Sepharose-Affinitätschromatographie gereinigt (6.2.4.1). In Abbildung 4.2 ist die Aufreinigung als 12%

SDS-PAGE (6.2.6.3) dokumentiert. Aufgetragen wurden die pelletierte Fraktion; das Kinase enthaltende Lysat, welches über die Affinitätsmatrix gegeben wurde; die einzelnen Waschfraktionen; sowie eine Eluatfraktion. Im Eluat (E) ist deutlich die Kinasebande von 65kda zu erkennen. Jedoch ist auch freies GST enthalten. Die Eluate wurden mit 50mM Tris pH 7,5 gewaschen und über Ultrafiltration auf 2µg/µl konzentriert.

Durch diese Aufreinigungsmethode wurde eine Reinheit der Kinase von ca.

80% erreicht. Eine weitere Aufreinigung erfolgte nicht, da die gesamte Kinasefraktion anschließend durch Thrombin-Behandlung vom GST-Tag abgetrennt werden sollte (6.2.11).

In Abbildung 4.3 ist die Aufreinigung der monomeren Kinase, wie sie nach Thrombinspaltung vorlag, auf einer 12% SDS-PAGE dargestellt. In Spur 1 ist eine Probe des Spaltungsansatzes aufgetragen, in Spur 2 eine Probe des Durchflusses nach Affinitätschromatographie. Es ist zu erkennen, dass sich die monomere Kinase wie erwartet (36kDa) im Durchfluss

befindet, während der abgetrennte GST-Tag auf der Säule zurückbleibt. Die LIRK_{Δ72C Mut} wurde auf eine Reinheit von über 90% geschätzt. Dimere Kinase ist im Ansatz nicht zu erkennen. (Abb. 4.3).

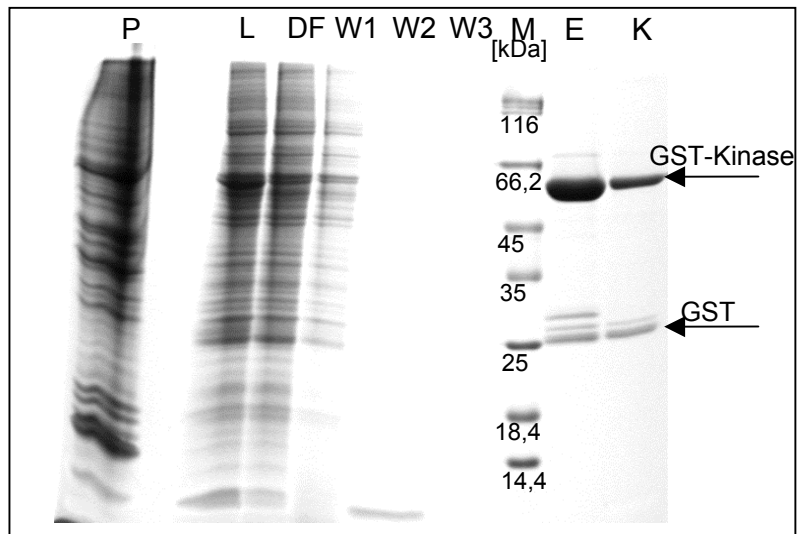


Abb. 4.2: Reinigungsverlauf durch Affinitäts-chromatographie von GST-LIRK_{Δ72C Mut}, dokumentiert auf kolloidal gefärbtem 12% SDS-Gel

M= Marker; P= Pellet; L= Lysat; DF= Durchfluss; W1= Waschschrift 1xPBS; W2= Waschschrift 1M NaCl; W3= Waschschrift 1xPBS; E= Eluate GST-LIRK_{Δ72C Mut}; K= GST-LIRK_{Δ72C}
Die Kinase (63kDa) liegt nur zu 80% rein vor.

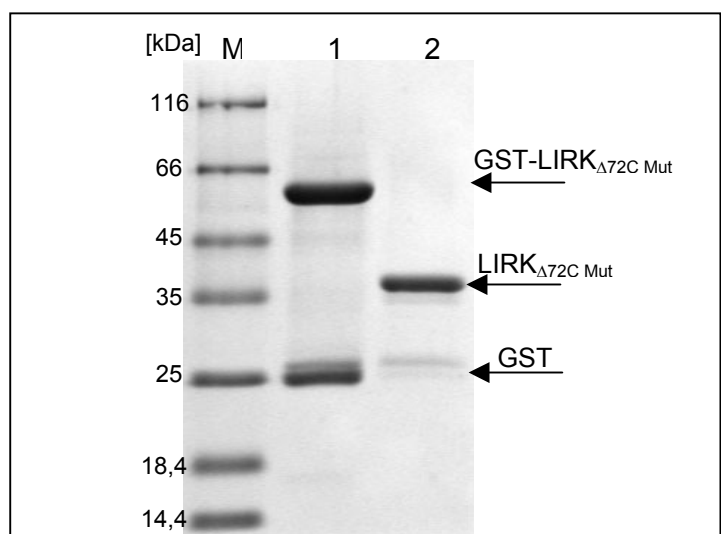
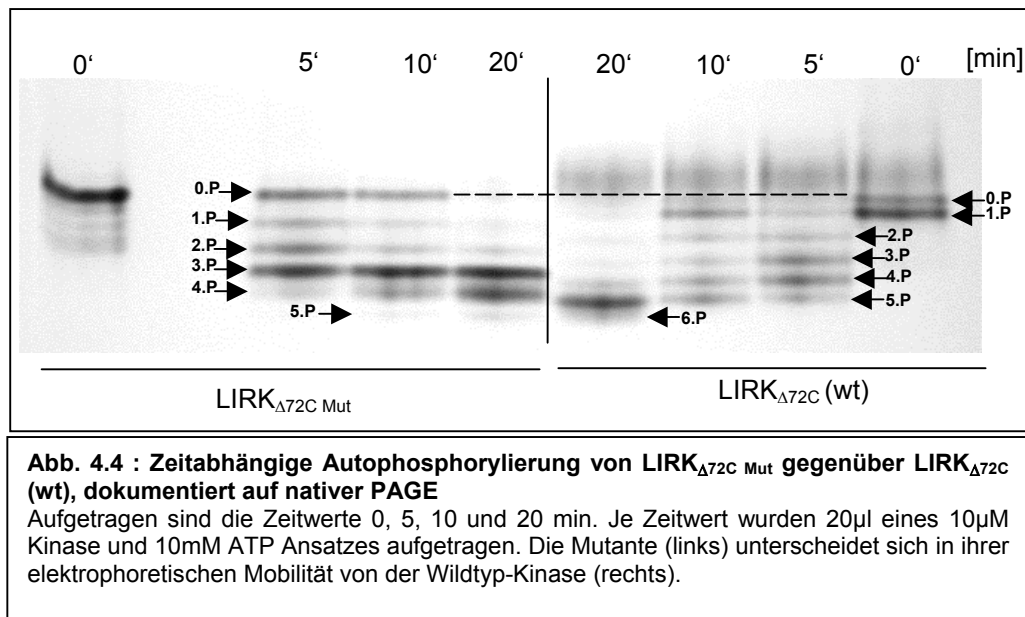


Abb. 4.3 : Dokumentation der Thrombinspaltung von GST-LIRK_{Δ72C Mut} mit anschließender Aufreinigung durch GST-Chromatographie

M= Marker; 1= Ansatz ohne Thrombin; 2= geschnittene Kinase nach Aufreinigung über Gluthation-Sepharose-Chromatographie
Die monomere Kinase (36kda) lag in einer Reinheit von über 90% vor. Dimere Kinase ist im Ansatz nicht zu erkennen.

Die Charakterisierung der Kinase erfolgte über zeitabhängige Autophosphorylierung (6.2.7). Als Referenz wurde mir die monomere LIRK_{Δ72C} von Ina Lauinger zur Verfügung gestellt. Diese Kinase ist ebenfalls am Lysin¹²⁷² trunkiert, enthält jedoch keine weiteren Substitutionen. Im Ansatz wurden die Kinasen in einer Konzentration von 10μM bei RT bis zu 20 min mit 10mM ATP inkubiert. Zu jedem Zeitpunkt wurden 20μl der Ansätze entnommen, die Phosphorylierungsreaktion wurde mit EDTA gestoppt und die Ansätze unter nicht denaturierenden (nativen) Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt.



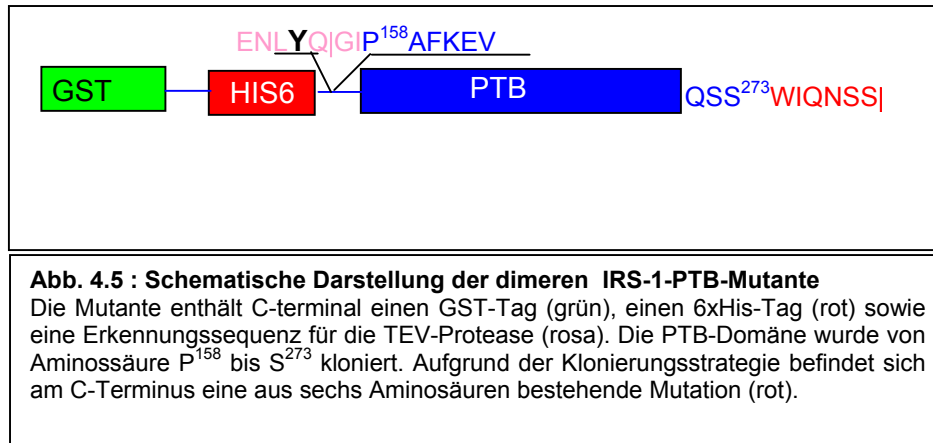
In Abbildung 4.4 ist zu erkennen, dass sich die Kinasen in ihrer elektrophoretischen Mobilität unterscheiden. Eine Auszählung der Banden zeigt fünf Phosphorylierungsstufen für die LIRK_{Δ72C} Mut und sechs für die LIRK_{Δ72C}. Das Ergebnis der Autophosphorylierung stimmt mit der Substitution der einen Phosphorylierungsstelle im Juxtamembranbereich überein.

4.2 Klonierung einer dimeren PTB-Mutante GST-PTB_{Mut}

Ein weiteres Ziel meiner Diplomarbeit bestand darin, Fusionsproteine aus GST-PTB sowie Teilen der IRS1-p30 Region zu generieren. Als Ausgangsvektor wurde ein modifizierter pGEX-3X-Vektor verwendet, welcher nach dem GST-Tag einen zusätzlichen His-Tag sowie eine Erkennungssequenz für die TEV-Protease besitzt (Anhang A). Der zusätzliche His-Tag sollte eine Aufreinigung der PTB-Domäne auch dann ermöglichen, wenn das Protein nur unter denaturierenden Bedingungen isoliert werden kann (z.B. Vorliegen von Einschlusskörpern). Desweiteren enthält die Erkennungssequenz für die TEV-Protease ein Tyrosin, welches ein potentielles Substrat für die LIRK darstellt. Um die Teilstücke der IRS1-p30 in den Vektor zu klonieren, musste eine *Bam*HI-Schnittstelle innerhalb des Vektors

verschoben werden. Dies wurde durch zwei aufeinander folgende ortsgerichtete Mutagenese-PCRs erreicht (6.2.1.6).

Als Konsequenz der Verschiebung ergab sich eine abweichende Aminosäure-Sequenz am C-Terminus der PTB. Abbildung 4.5 zeigt eine schematische Darstellung der GST-PTB_{Mut}.



Versuche, Fusionsproteine aus der GST-PTB_{Mut} und Teilstücken der IRS1-p30 Region zu exprimieren, blieben ohne Erfolg. Die Konstrukte erwiesen sich als nicht faltungsstabil und wurden in *E. coli* nur schlecht exprimiert. Versuche, die Expressionsrate zu steigern, zeigten, dass diese Proteine nur in Einschlusskörpern vorliegen und sich auch nicht unter denaturierenden Bedingungen aufreinigen lassen.

Die GST-PTB_{Mut} wurde in DH5 α -Zellen exprimiert (6.2.3) und über eine Gluthation-Sepharose-Chromatographie aufgereinigt. Abbildung 4.6 zeigt die Dokumentation der Aufreinigung auf 12% SDS-PAGE. Aufgetragen wurden nicht induzierte Zellen. Von induzierten Zellen wurden nach der Lyse die pelletierte Fraktion sowie das Lysat aufgetragen. Außerdem sind Proben des Durchflusses, der einzelnen Waschfraktionen und zwei Eluatfraktionen aufgetragen. Auffällig ist, dass der Großteil des Zielproteins in der pelletierten Fraktion zurückbleibt. Aus dem Lysat konnte die GST-PTB_{Mut} mit einer Reinheit von 90% aufgereinigt werden. Der direkte Größenvergleich mit GST-PTB ohne zusätzliche Modifikationen (zur Verfügung gestellt von Dr. Parvaresh) zeigt, dass die mutierte PTB etwa 2kDa größer ist als die Wildtyp-PTB. Das Protein wurde mit 50mM Tris pH 7,5 gewaschen und über Ultrafiltration auf eine Konzentration von 1,5 μ g/ μ l eingestellt.

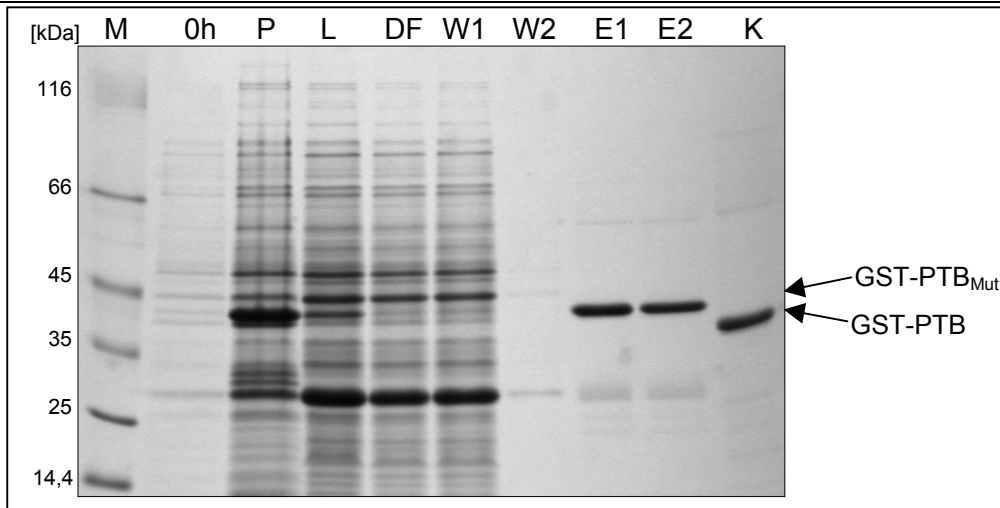


Abb. 4.6: Reinigungsverlauf von GST-PTB_{Mut}, dokumentiert auf 12% SDS-PAGE

M = Marker; 0h = nicht induzierte Zellen; P = Pellet; L = Lysat; DF = Durchfluss; W1 = Waschschrift 1xPBS; W2 = Waschschrift 1M NaCl E1-E2 = Eluate GST-PTB_{Mut}; K = Kontrolle GST-PTB

Die größte Proteinmenge der GST-PTB_{Mut} ist in der pelletierten Fraktion zu finden. Der lösliche Anteil wurde mit einer Reinheit von 90% aufgereinigt. Die GST-PTB_{Mut} ist ca. 2kDa größer als die GST-PTB.

4.3 Reinigung der löslichen Insulinrezeptorkinase IRKD und IRKD_{Mut}

In dieser Arbeit wurden für die Substratphosphorylierung die Vollängen-Kinasekonstrukte LIRK_{wt} sowie LIRK_{Mut} (Noelle, 2000) verwendet. Die LIRK_{Mut} unterscheidet sich durch fünf ausgetauschte Aminosäuren von der LIRK_{wt}. Diese betreffen das Tyrosin⁹⁶⁰ im NPEY-Motiv innerhalb des Juxtamembranbereichs sowie die Tyrosine 1316/22 am C-Terminus der Kinase, die durch Phenylalanin substituiert wurden. Desweiteren wurden zwei reaktive Cysteine (C969; C1296) durch Alanine ersetzt.

Für die Reinigung beider Kinasen wurden zwei aufeinander folgende chromatographische Verfahren angewendet: eine Anionen-Austauscherchromatographie (6.2.4.3) mit anschließender Aufreinigung durch Gelfiltration (6.2.4.4). In Abbildung 4.7 wird exemplarisch die Aufreinigung der LIRK_{wt} durch die Chromatogramme der FPLC und eine SDS-PAGE der Gelfiltrationsfraktionen dokumentiert. Aus der Abbildung wird deutlich, dass die Kinase bei einem Salzgehalt von 21mM NaCl von der Anionenaustauschermatrix eluiert wird. In der Gelfiltrations-FPLC trennt sich die Kinase nach 20min von den anderen Proteinen. Wie die SDS-PAGE zeigt, ist in den Fraktionen 6-9 die Kinase mit einem Molekulargewicht von 46kDa enthalten, wobei Fraktion 8 die Kinase mit den geringsten Verunreinigungen enthält.

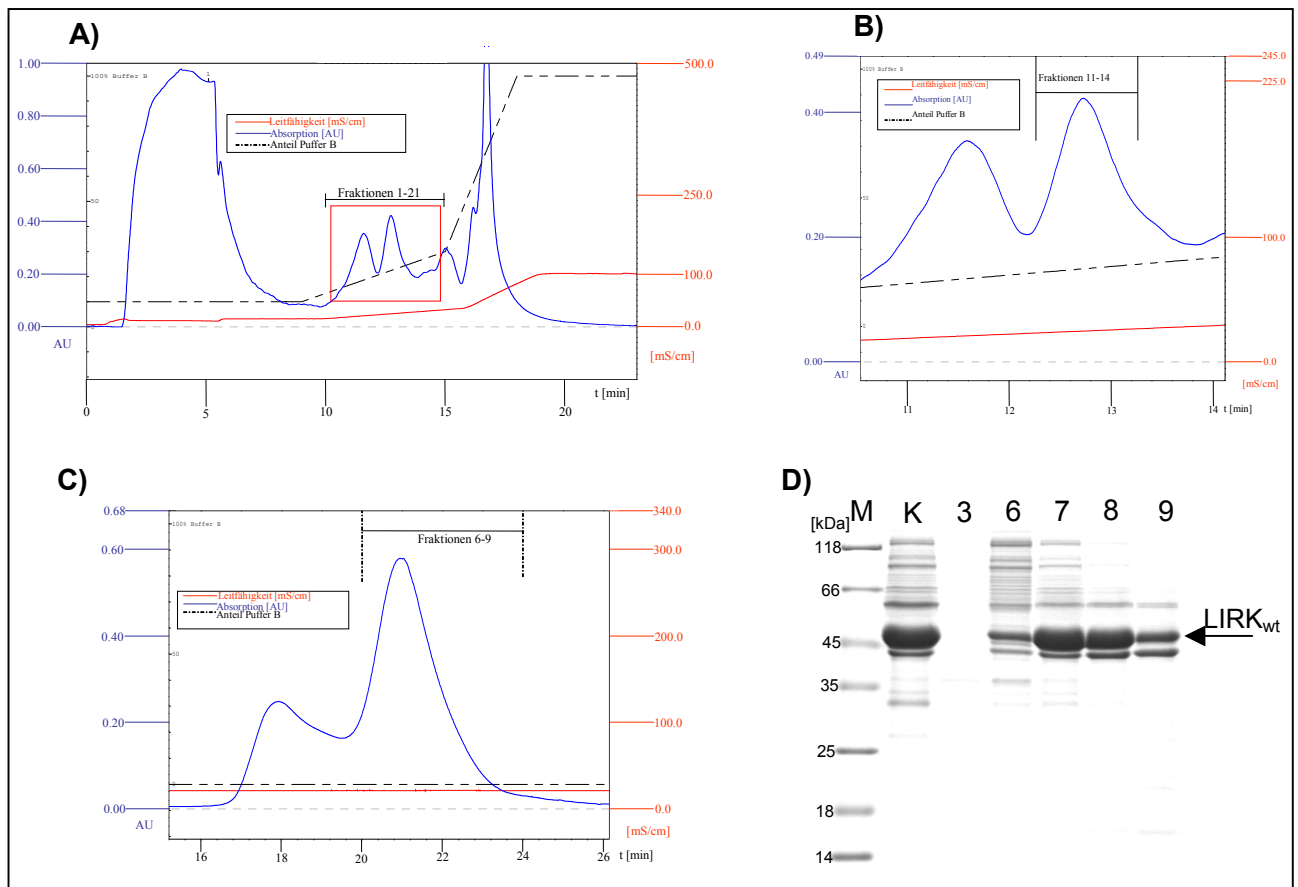
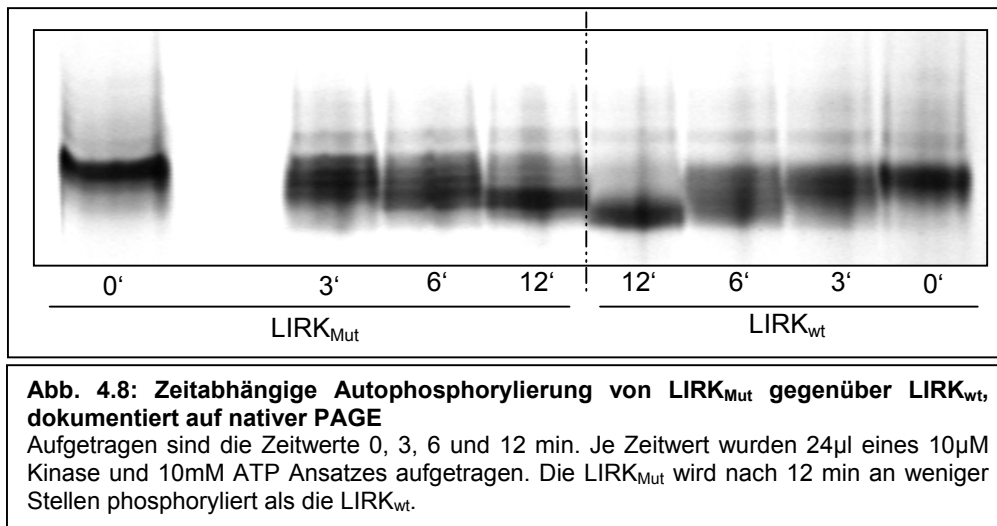


Abb. 4.7: Dokumentation der Aufreinigung der LIRK_{wt} durch Anionenaustauscher- und Gelfiltrations-FPLC
 A) Chromatogramm der Anionenaustauscher-FPLC; Ausschnitt ist rot markiert und in B) vergrößert dargestellt.
 B) Ausschnitt aus dem Gesamtchromatogramm mit dem die Kinase enthaltenden Peak; die Kinase wird bei 21% Puffer B von der Säule eluiert.
 C) Chromatogramm der Gelfiltrations-FPLC; Markiert sind die fraktionen die Kinase enthalten
 D) 12% SDS-PAGE mit den die Kinase enthaltenden Fraktionen 6-9 aus der Gelfiltrations-FPLC; K= Kontrolle LIRK_{wt}. Die Fraktionen enthalten die Kinase mit zunehmender Reinheit

4.4 Charakterisierung der LIRK_{wt} und LIRK_{Mut} durch Autophosphorylierung

Eine erste Charakterisierung der Kinasen sollte zeigen, ob die substituierten Aminosäuren in der LIRK_{wt} die Funktionen der Kinase in bezug auf die Fähigkeit zur Autophosphorylierung beeinflussen.



Die Abbildung 4.8 zeigt die zeitabhängige Autophosphorylierung der LIRK_{wt} und LIRK_{Mut}, dokumentiert auf einer nativen PAGE. Die Abbildung verdeutlicht, dass sich die Kinasen in ihrer elektrophoretischen Mobilität unterscheiden, und dass sich die Mutante weniger autophosphoryliert als die Wildtypkinase (Vergleiche 12min Phosphorylierung). Die Kinasefunktion für die Fähigkeit zur Autophosphorylierung ist durch die Mutationen nicht beeinträchtigt. Jedoch sind die einzelnen Phosphorylierungsstufen nicht so klar aufgelöst worden wie bei den verkürzten Kinasen (Vergleiche Abb.4.4).

4.5 Substratphosphorylierung von GST-IGF_{D→A} durch die Kinasen LIRK_{wt} und LIRK_{Mut}

Eine weitere Charakterisierung der Kinasen erfolgte über die Phosphorylierung des Substrates GST-IGF_{D→A}. Das Substrat besteht aus dem durch GST dimerisierten cytoplasmatischen Teil des IGF-Rezeptors. In der Kinasedomäne wurde das katalytische Aspartat (D1105A) durch Alanin ausgetauscht, wodurch die Kinase inaktiv in Bezug auf Autophosphorylierung und Substratphosphorylierung ist. Dieses Substrat ist nicht in der Lage mit den Kinasen über den Juxtamembranbereich zu interagieren.

Zunächst wurden die LIRK_{Mut} sowie die LIRK_{wt} in gleicher Konzentration 20min bei RT in mit 1mM ATP unter standardisierten Bedingungen vorphosphoryliert. Diese Vorphosphorylierung wird standardgemäß, sofern nicht anders gekennzeichnet, bei jeder Substratphosphorylierung in dieser Arbeit angewendet (6.2.8).

Diese aktivierten Kinasen werden zur zeitabhängigen Substratphosphorylierung eingesetzt. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden in 30µl Aliquotes durch SDS-Probenpuffer die Phosphorylierungsreaktionen gestoppt. Nach elektrophoretischer Auftrennung über 12%

SDS-PAGE wurde das Gel 20min in kolloidaler Färbelösung (6.2.6.5) angefärbt und die Proteinbanden des Substrates wurden ausgeschnitten. Die Radioaktivität des inkorporierten P^{32} wurde durch Messung der Cerenkov-Strahlung bestimmt und durch Verrechnung mit dem im Ansatz enthaltenden ATP wurde der Phosphattransfer bestimmt. Diese Durchführung der Substratphosphorylierung wurde in dieser Arbeit für alle Substratphosphorylierungen angewendet und ist im methodischen Teil (6.2.9) detailliert angegeben. In Abbildung 4.9 sind die durch die jeweilige Kinase auf das Substrat übertragenen Phosphate graphisch gegen die Zeit aufgetragen. Aus der Abbildung geht hervor, dass die LIRK_{Mut} und die LIRK_{wt} das Substrat GST-IGF_{D→A} innerhalb der Fehlergrenzen gleich phosphorylieren. Die Kurve beschreibt eine hyperbolische Form, die mit zunehmender Zeit in den Sättigungsbereich eintritt. Die LIRK_{wt} übertrug nach 32 min ebenso wie die LIRK_{Mut} 300pmol Phosphat auf die GST-IGF_{D→A}. Die Anfangsgeschwindigkeit $V_{Initial}$ der Kinasen lässt sich aus der Steigung der Tangente an die geplottete Kurve und der Kinase menge im Ansatz errechnen. Für beide Kinasen ergibt sich mit $1,8\text{pmol P} \times \text{pmol Kinase}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ die gleiche Initialgeschwindigkeit.

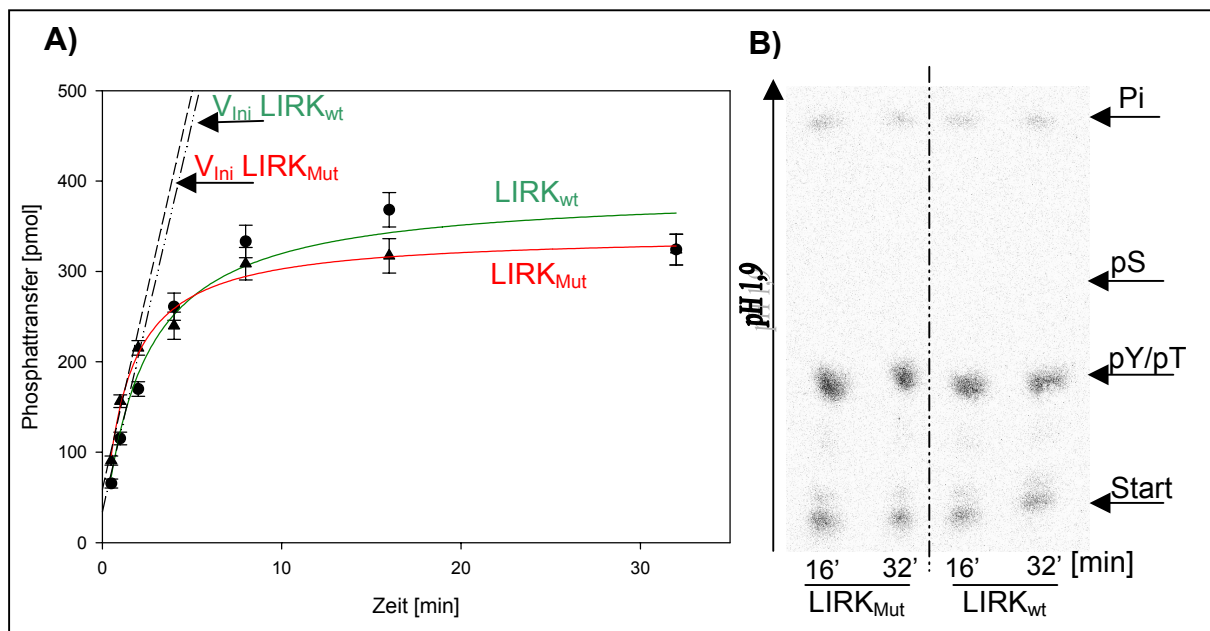


Abb. 4.9

A) Graphische Auswertung der zeitabhängigen Phosphorylierung von GST-IGF_{D→A} durch LIRK_{Mut} und LIRK_{wt}

Dargestellt ist der Phosphattransfer durch die LIRK_{Mut} (rot) und LIRK_{wt} (grün) auf das Substrat GST-IGF_{D→A} gegen die Zeit. Je Zeitpunkt wurden 30µl (10µM Substrat, 1,6µM Kinase, 250µM [γ^{32}]-ATP) aufgetragen.

B) Eindimensionale Phosphoaminosäureanalyse der GST-IGF_{D→A}, phosphoryliert durch LIRK_{Mut} und LIRK_{wt}

Aufgetragen wurden jeweils 500cpm pro Spur. Es ist zu erkennen, dass das Substrat weder durch die Wildtypkinase noch durch die Mutante an Serinresten phosphoryliert wurde.

Eine Phosphoaminosäureanalyse (PASA 6.2.10) des phosphorylierten Substrates ist in Abbildung 4.9B dargestellt. Bei pH 1,9 wird Phosphoserin von Phospho-

threonin/Phosphotyrosin elektrophoretisch getrennt. Auf dem Phosphoimage sind die Startpunkte, die nicht hydrolysierten Peptide enthalten; P³² markierte Tyrosinreste, sowie freies radioaktives Pi zu erkennen. Phosphorylierte Serinreste sind auf der Autoradiographie nicht detektiert. Aus der Abbildung 4.9 A+B wird deutlich, dass die GST-IGF_{D→A} von beiden Kinasen, sowohl was V_{Initial}; den quantitativen Umsatz; als auch die Zusammensetzung der Phosphoaminosäuren betrifft; im gleichen Maße umgesetzt wird.

4.6 Substratphosphorylierung von GST-PTB_{Mut} durch LIRK_{wt} und LIRK_{Mut}

Die GST-PTB_{Mut} als Substrat für die Kinasen unterscheidet sich von dem zuvor verwendeten Substrat GST-IGF_{D→A} dadurch, dass es über Phosphotyrosinbindende Eigenschaften verfügt. Aus diesem Grund kann die PTB-Domäne mit Kinasen, die über ein NPEpY-Motiv verfügen, interagieren (Parvaresh, unpublizierte Ergebnisse). Im folgenden Versuch wurde untersucht, ob sich der Phosphattransfer auf die GST-PTB_{Mut} quantitativ und in Bezug auf die Spezifität der jeweiligen Kinase unterscheidet.

Die GST-PTB_{Mut} stellt für die LIRK_{wt} ein Substrat dar, welches über das phosphorylierte Tyrosin⁹⁶⁰ im Juxtamembranbereich mit der Kinase interagieren kann. In einem orientierenden Vorversuch wurde die GST-PTB_{Mut} durch beide Kinasen konzentrationsabhängig phosphoryliert. Durch Vorphosphorylierung aktivierte Kinasen wurden mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen inkubiert. Die Konzentrationen der GST-PTB_{Mut} betragen 8µM, 16µM, 24µM und 29µM. Dies entspricht Kinase:Substrat-Verhältnissen von 1:5, 1:10, 1:15 und 1:18. Die Phosphorylierungsreaktion wurde für 40min bei RT durchgeführt. Abbildung 4.10 zeigt das Säulendiagramm das den Phosphattransfer der jeweiligen Kinase auf das Substrat bei unterschiedlichen Konzentrationen widerspiegelt. Es wird deutlich, dass die GST-PTB_{Mut} für die LIRK_{wt} ein besseres Substrat darstellt als für die LIRK_{Mut}. Während die LIRK_{wt} bis zu 138pmol Phosphat auf die GST-PTB_{Mut} übertragen konnte, erreichte die LIRK_{Mut} nur einen maximalen Transfer von 40pmol Phosphat (Vergleiche Säulen bei 24µM). Im Gegensatz zur PASA der GST-IGF_{D→A} zeigen beide Kinasen, dass die GST-PTB_{Mut} sowohl an Tyrosinresten als auch an Serinresten phosphoryliert wird. Jedoch ist bei der Phosphorylierung durch die Wildtyp-Kinase eine deutlich höhere Serinphosphorylierung (20%) als bei der mutierten Kinase (5%) zu beobachten

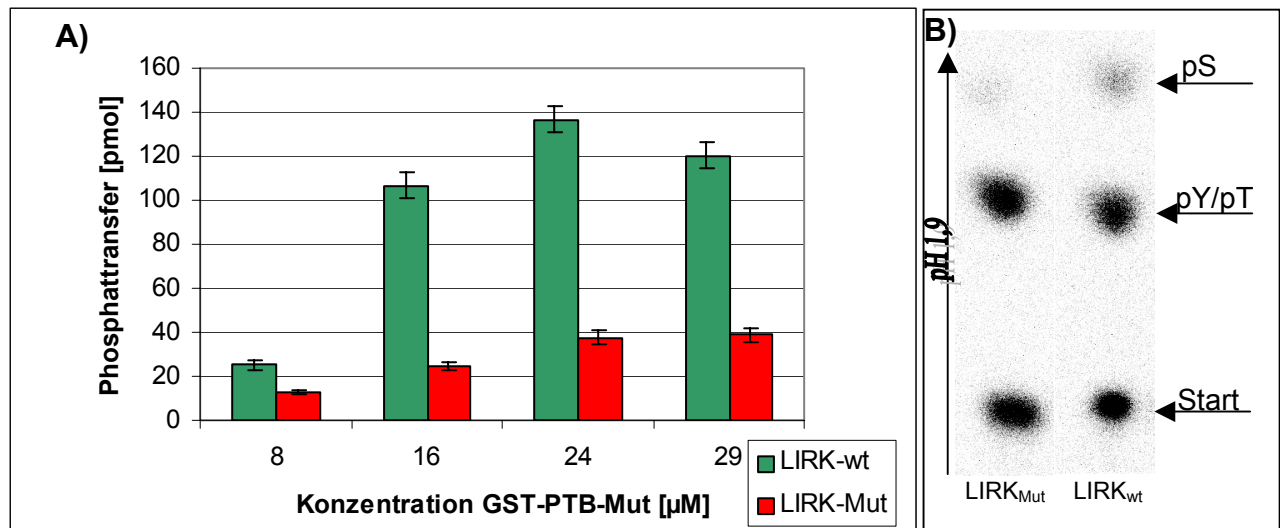


Abb. 4.10: A) Graphische Darstellung der konzentrationsabhängigen Substratphosphorylierung von GST-PTB_{Mut} durch LIRK_{Mut}/LIRK_{wt}.

Aufgetragen sind die Substratkonzentrationen in µM bei einem Volumen von je 30µl gegen den Phosphattransfer durch die jeweilige Kinase LIRK_{wt} (grün) bzw. LIRK_{Mut} (rot). Jeder Ansatz wurde 40min bei RT mit 1,6µM vorphosphorylierter Kinase und 250µM [γ ³²]-ATP inkubiert und durch SDS-Probenpuffer abgestoppt. Es wird deutlich, dass die Wildtypkinase das Substrat deutlich stärker phosphoryliert als die Mutante

B) Eindimensionale PASA der GST-PTB_{Mut}, phosphoryliert durch LIRK_{Mut} und LIRK_{wt}

Aufgetragen wurden jeweils 500cpm pro Spur. Es ist zu erkennen, dass das Substrat durch die Wildtypkinase an Serin phosphoryliert wird (20% Serin). Die Mutante phosphoryliert das Substrat nur marginal an Serinresten (5%).

In diesem Versuch wurde eine große Diskrepanz des Phosphattransfers zwischen den Verhältnissen 1:5 und 1:10 zu beobachteten. Daher wurde eine zeitabhängige Phosphorylierung bei einem Kinase:Substrat-Verhältnis von 1:5 vorgenommen, wobei sowohl die Konzentration der Kinasen, als auch das Substrat im gleichen Maße erhöht wurden (2µM Kinase/10µM Substrat gegenüber 1,6µM Kinase/8µM Substrat im vorherigen Versuch). Abbildung 4.11 zeigt graphisch den Phosphattransfer auf das Substrat durch die jeweilige Kinase gegen die Zeit. Die GST-PTB_{Mut} wird durch die LIRK_{wt} 10fach schneller phosphoryliert ($V_{\text{Initial}} = 0,29 \text{ pmol P} \times \text{pmol Kinase}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) als durch die LIRK_{Mut} ($V_{\text{Initial}} = 0,029 \text{ pmol P} \times \text{pmol Kinase}^{-1} \times \text{min}^{-1}$). Wie bereits beobachtet unterscheidet sich der maximale Phosphattransfer auf das Substrat bei beiden Kinasen erheblich. Die LIRK_{wt} übertrug nach 32 min 103pmol Phosphat auf das Substrat. Die LIRK_{Mut} übertrug in derselben Zeit maximal 14 pmol Phosphat. Im Gegensatz zum vorhergehenden Versuch ist die Effizienz beider Kinasen deutlich gesteigert. Dieser erhöhte Transfer bestätigte sich auch bei weiteren Versuchen (nicht gezeigt). Die Auswertung der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung des 32min lang phosphorylierten Substrates ergab, das sich beide Kinasen nicht nur im maximalen Phosphattransfer, sondern auch in der Spezifität der Aminosäuren deutlich unterscheiden. Während die Wildtyp-Kinase bis zu 65% des gesamten Phosphates auf Serinreste des Substrates übertrug, werden für die LIRK_{Mut} nur 3% Phosphoserin detektiert.

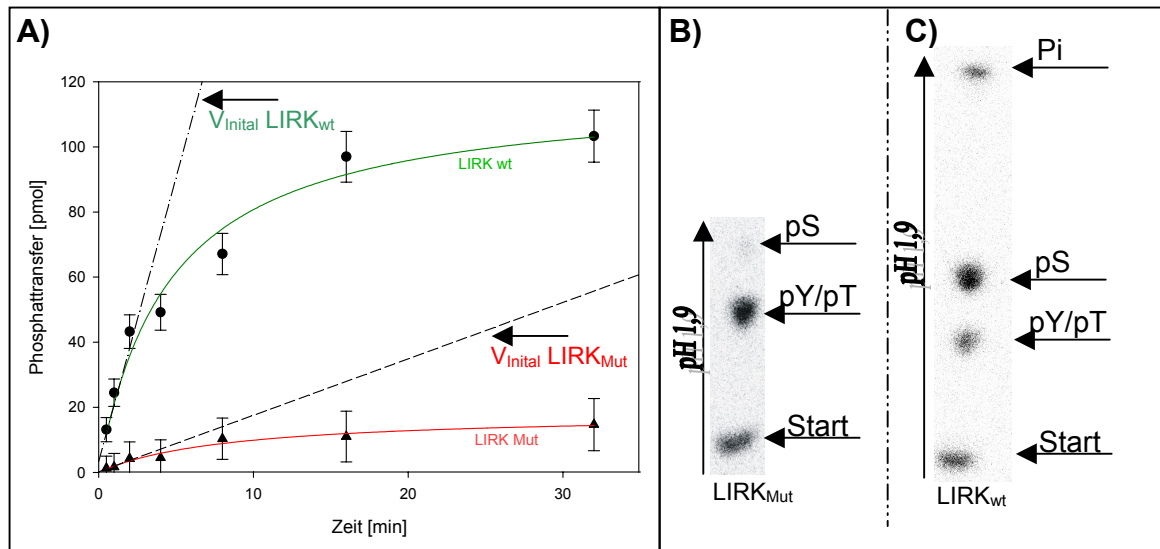


Abb. 4.11: A) Graphische Darstellung der Zeitabhängigen Substratphosphorylierung von GST-PTB_{Mut} durch LIRK_{Mut} /LIRK_{wt}.

Dargestellt ist der Phosphattransfer auf das Substrat durch die LIRK_{wt} (grün) bzw. LIRK_{Mut} (rot). Aufgetragen sind je Datenpunkt 30 μ l mit 10 μ M Substrat, 2 μ M Kinase, 250 μ M [γ ³²]-ATP. Es wird deutlich, dass die Wildtypkinase das Substrat 10fach schneller phosphoryliert als die Mutante

B) Eindimensionale PASA der GST-PTB_{Mut}, phosphoryliert durch LIRK_{Mut}

Es ist zu erkennen, dass die mutierte Kinase das Substrat nur marginal an Serinresten phosphoryliert (3%)

C) Eindimensionale PASA der GST-PTB_{Mut}, phosphoryliert durch LIRK_{wt} nach Optimierung der Bedingungen für die saure Hydrolyse

Die Abbildung verdeutlicht, dass die Wildtypkinase das Substrat verstärkt an Serinresten phosphoryliert (65%)

Der orientierende Versuch (Abb.4.10), in dem nur ein Zeitpunkt bei verschiedenen Substratkonzentrationen gemessen wurde, würde implizieren, dass die Dissoziationskonstante K_D zwischen 8 μ M und 16 μ M zu veranschlagen wäre. Um dies zu bestätigen wurden zeitabhängige Substratphosphorylierungen der GST-PTB_{Mut} mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen durchgeführt (nicht gezeigt). In Abbildung 4.12 sind die jeweiligen Initialgeschwindigkeiten der Kinasen gegen die Substratkonzentration aufgetragen (Abb. 4.12A für LIRK_{wt}; Abb. 4.12B für LIRK_{Mut}). Aus den Abbildungen geht hervor, dass mit steigender Substratkonzentration eine steigende Initialgeschwindigkeit einhergeht. Die jeweiligen Geschwindigkeiten liegen auf einer Gerade, deren Steigung die Beschleunigung der Initialgeschwindigkeit der Kinasen bei steigender Substratkonzentration wiedergibt. Ein direkter Vergleich der einzelnen Initialgeschwindigkeiten der Kinasen bestätigt noch einmal, dass die Wildty-Kinase das Substrat bei jeder Substratkonzentration 10fach schneller phosphoryliert als die LIRK_{Mut}. Eine Abschätzung des K_D ist mit diesem Substrat nicht möglich. Mögliche Gründe hierfür werden in der Diskussion ausreichend erörtert.

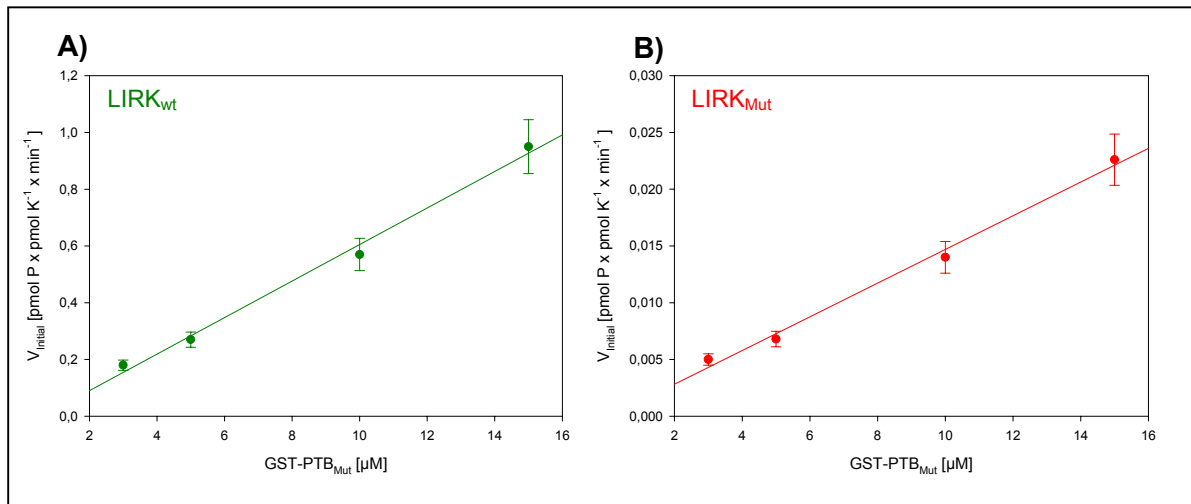
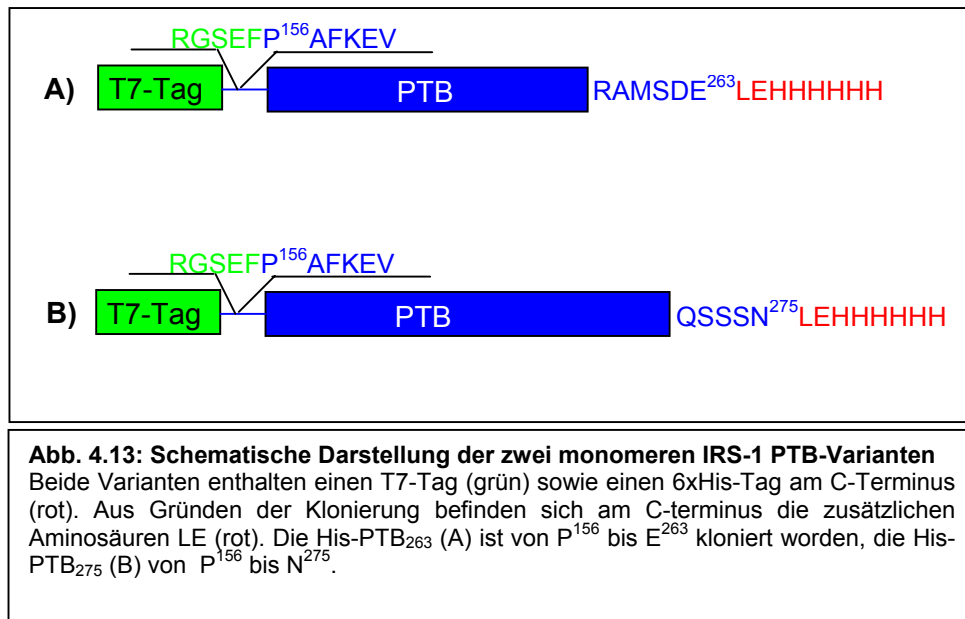


Abb. 4.12: Initialgeschwindigkeiten für die Substratphosphorylierung der GST-PTB_{Mut} durch A) LIRK_{wt} und B) LIRK_{Mut} bei unterschiedlicher Substratkonzentration

Dargestellt ist jeweils das errechnete V_{Initial} der Kinase bei variablen Substratkonzentrationen. In beiden Abbildungen liegen die Initialgeschwindigkeiten auf einer Geraden. Ein Vergleich der jeweiligen V_{Initial} der Kinasen bestätigt, dass LIRK_{wt} das Substrat bei jeder Konzentration 10fach schneller phosphoryliert als die LIRK_{Mut}.

4.7 Klonierung von zwei monomeren Varianten der IRS1-PTB

Zur Abklärung der Frage, ob der GST-Tag, der eine Dimerisierung des Substrates bewirkt, die Instabilität der PTB-Domäne beeinflusst, sollte ein monomeres PTB-Konstrukt kloniert und als natives Protein exprimiert werden. Innerhalb meiner Arbeit habe ich zwei unterschiedlich lange Varianten der IRS1-PTB mit einem C-terminalen His-Tag und einem N-terminalen T7-Tag kloniert. Zum einen die PTB von Aminosäure Prolin¹⁵⁸ bis Glutamat²⁶³ (His-PTB₂₆₃) sowie die PTB von Prolin¹⁵⁸ bis Asparagin²⁷⁵ (His-PTB₂₇₅). Der T7-Tag enthält keine weiteren Tyrosine, und erlaubt eine deutliche Überexpression in Bakterien. Die Generierung einer Protease-Erkennungssequenz zwischen T7-Tag und der jeweiligen PTB-Domäne wurde vermieden um nicht zusätzliche Phosphorylierungsstellen zu schaffen. Die kurze Variante His-PTB₂₆₃ ist identisch mit der für die Kristallisation von Eck *et al.*, 1998 verwendeten PTB, der das Serin²⁷⁰ fehlt. In der längeren Variante His-PTB₂₇₅ ist dieses Serin enthalten. Abbildung 4.13 veranschaulicht die Konstrukte schematisch.



Die Klonierung erfolgte wie in den Methoden beschrieben in den pET21a(+) Vektor. Die Expression der Proteine erfolgte in für pET-Vektoren geeigneten *E.coli* BL21-DE3 RIPL Zellen. Diese Zellen enthalten ein Plasmid, das für die in *E.coli* seltenen tRNA kodiert. Hierdurch wird es *E.coli* ermöglicht, eukaryotische Gensequenzen mit seltenen Codons zu exprimieren.

Beide PTB-Konstrukte wurden für jeweils 3h exprimiert (Abb. 4.14A), die Zellen aufgeschlossen (6.2.3) und das Lysat über Nickel-Chelat-Chromatographie (6.2.4.2) aufgereinigt. In Abbildung 4.14B ist exemplarisch die Aufreinigung von His-PTB₂₇₅ auf 12% SDS-PAGE dokumentiert. Aufgetragen wurden das Lysat aus dem Zellaufschluss; der Durchfluss; eine Probe der Waschfraktion sowie zwei Proben der Eluate. Es wird deutlich, dass das Zielprotein 40% der Gesamt-Proteinmenge im Lysat ausmacht. Die PTB-Konstrukte konnten jeweils mit einer Reinheit von 95% gewonnen werden. Das ca. 18kDa Protein wurde nicht weiter charakterisiert. Um Oligomerisierung des Proteins zu vermeiden wurden die Eluate einzeln durch Waschen mit 50mM Tris pH 7,5 im Centricon vom Imidazol gereinigt und anschließend durch Ultrafiltration auf eine Konzentration von 2µg/µl eingestellt.

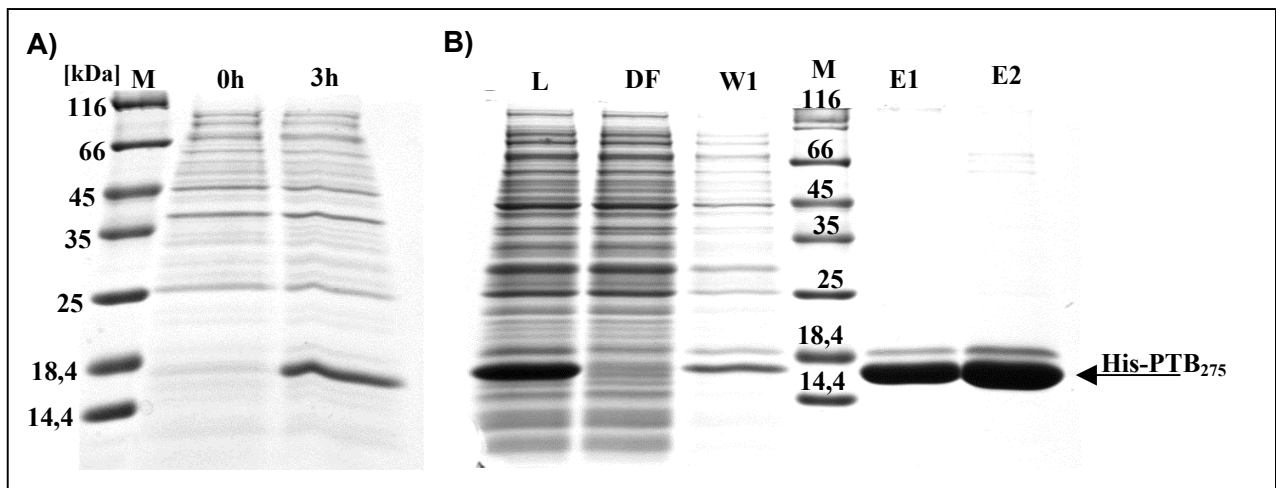


Abb. 4.14: Expression und Aufreinigung über Nickel-Chelat-Chromatographie der His-PTB₂₇₅, jeweils dokumentiert auf 15% SDS-PAGE

- A) Expressionsmuster der His-PTB₂₇₅ in BL21-DE3 (RIPL)-Zellen. Die Anreicherung des Proteins ist nach drei Stunden deutlich zu erkennen
- B) Dokumentation der Aufreinigung über Nickel-Chelat-Chromatographie; L = Lysat ; DF = Durchfluss; W1 = Waschfraktion (50mM Tris, 25mM Imidazol, 150mM NaCl pH 7,5), E1+E2 = Eluate His-PTB₂₇₅. Das Protein von 15,6kDa konnte durch diese Methode mit einer Reinheit 95% von aufgereinigt werden.

Zu einer ersten Charakterisierung beider PTB Varianten wurden sie in ihrer Phosphorylierungsfähigkeit durch die Akt-Kinase getestet. Aus der Literatur ist bekannt (Zick *et al.*, 1999), dass das Serin²⁷⁰ des IRS-1 ein bevorzugtes Substrat für die Akt-Kinase darstellt. Wie erwartet, wurde die His-PTB₂₆₃ nicht durch die Kinase phosphoryliert, während die His-PTB₂₇₅ an Serin²⁷⁰ stöchiometrisch phosphoryliert wurde (1pmol Phosphat/pmol His-PTB₂₇₅)

4.8 Substratphosphorylierung der His-PTB₂₇₅ durch LIRK_{wt} und LIRK_{Mut}

Zur Charakterisierung der His-PTB₂₇₅ wurde das Substrat in zwei Konzentrationen durch die LIRK_{wt} zeitabhängig phosphoryliert. Hierzu wurden Kinase:Substrat-Verhältnisse von 1:5 und 1:20 ausgewählt, welche Konzentrationen von 1µM vorphosphorylierter/aktivierter Kinase und 5µM bzw. 20µM Substrat (250µM [γ^{32}]-ATP) entspricht. In Abbildung 4.15A ist der Phosphattransfer der Kinase gegen die Zeit aufgetragen. Die Datenpunkte entsprechen jeweils 30µl Volumen. Die Kurven für beide Substratkonzentrationen beschreiben eine hyperbolische Form. Der maximale Phosphattransfer für beide Konzentrationen unterscheidet sich jedoch erheblich. Die Initialgeschwindigkeiten V_{Initial} differieren für beide Substratkonzentrationen nicht wesentlich. Für eine Substratkonzentration von 5µM wurde eine V_{Initial} von $0,026 \text{ pmol P} \times \text{pmol Kinase}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ errechnet. Für 20µM Substrat ergibt

sich V_{Initial} von $0,033 \text{ pmol P} \times \text{pmol Kinase}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. Der Phosphattransfer durch die LIRK_{Mut} auf die His-PTB₂₇₅ ist deutlich geringer als auf das Substrat GST-PTB_{Mut}. Insgesamt konnten nach 32min bei 20 μM Substrat 12pmol Phosphat übertragen werden, bei 5 μM Substratkonzentration 4 pmol Phosphat. In Abbildung 4.15B ist die Ninhydrin angefärbte zwei dimensionale PASA der durch LIRK_{wt} phosphorylierten His-PTB₂₇₅ dargestellt, auf der die relativen Positionen der drei Aminosäuren zu erkennen sind. In Abbildung 4.15C ist die entsprechende Autoradiographie dargestellt. Das Substrat wurde durch die Kinase zu gleichen Teilen an Serinresten (50%) und Threoninresten (50%) phosphoryliert wird, jedoch nur marginal an Tyrosinresten (>1%).

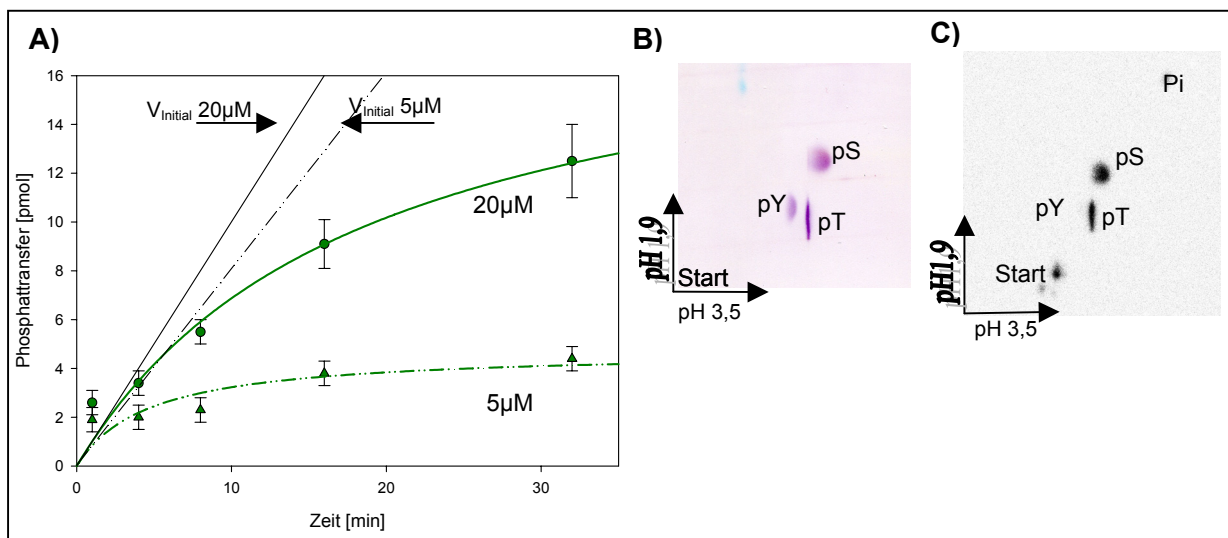


Abb. 4.15: A) Graphische Darstellung der Zeitabhängigen Substratphosphorylierung von His-PTB₂₇₅ durch LIRK_{wt}.

Aufgetragen sind je Zeitwert 30 μl mit 5 μM (Kreis) bzw. 20 μM (Dreieck) His-PTB₂₇₅, 1 μM Kinase, 250 μM [γ^{32}]-ATP. Gestrichelte Linien entsprechen Tangenten, aus deren Steigung und bekannter Kinase menge die Initialgeschwindigkeiten (V_{Initial}) der Kinasen berechnet werden kann

B) Ninhydrin angefärbte zweidimensionale PASA der His-PTB₂₇₅ phosphoryliert durch LIRK_{wt}
In der ersten Dimension (pH 1,9) trennt sich pS von pY/pT. In der zweiten Dimension trennt sich pT von pY. Angegeben sind die relativen Positionen der drei Aminosäuren

C) Phosphoimager der zweidimensionalen PASA aus B)

Durch die LIRK_{wt} wurde die His-PTB₂₇₅ nur an Serinresten (50%) und Threoninresten (50%) phosphoryliert. Tyrosinphosphorylierung liegt nur marginal vor (>1%)

Vergleichend wurde die His-PTB₂₇₅ auch durch die LIRK_{Mut} zeitabhängig phosphoryliert. Dazu wurde ein Kinase:Substrat-Verhältnis von 1:20 gewählt was Konzentrationen von 1 μM vorphosphorylierter Kinase und 20 μM Substrat (250 μM [γ^{32}]-ATP) in einem Volumen von 180 μl . Jeder Datenpunkt in Abbildung 4.16 entspricht 30 μl des Gesamtansatzes. Die zeitabhängige Phosphorylierung der His-PTB₂₇₅ durch die LIRK_{Mut} beschreibt eine flacher verlaufende Sättigungskurve. Zum direkten Vergleich ist im Graphen auch die Phosphorylierung durch die LIRK_{wt} dargestellt, die schon im obigen Text besprochen wurde. Nach 32min übertrug die mutierte Kinase 4 pmol Phosphat auf das Substrat. Aus der Steigung

der Geraden lässt sich die Geschwindigkeit der Substratphosphorylierung durch die $LIRK_{Mut}$ errechnen. Sie beträgt mit ca. $0,01 \text{ pmol P} \times \text{pmol Kinase}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ etwa 1/5 der Initialgeschwindigkeit der $LIRK_{wt}$.

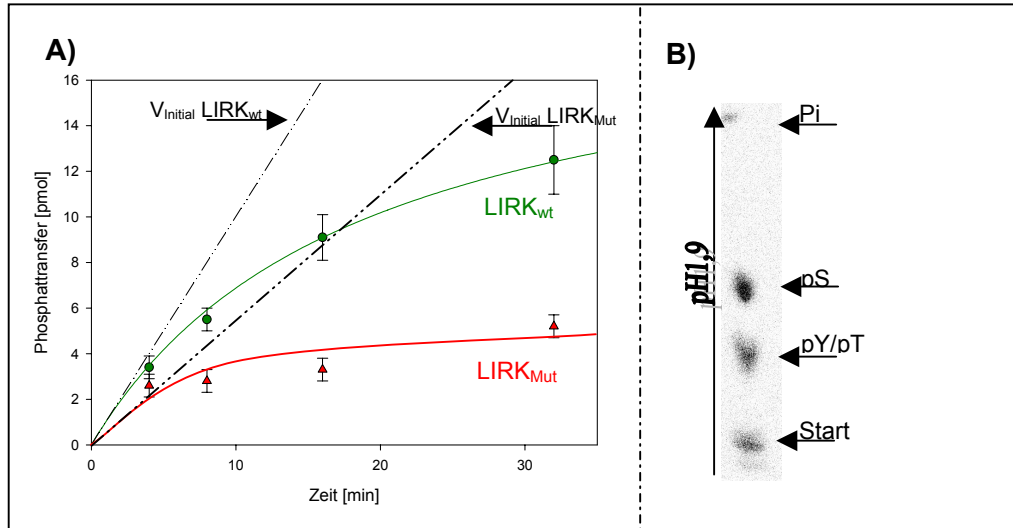


Abb.4.16: A) Graphische Darstellung der zeitabhängigen Substratphosphorylierung von His-PTB₂₇₅ durch $LIRK_{Mut}$.

Aufgetragen sind 30 μl Volumen je Zeitwert bei 20 μM Substrat, 1 μM Kinase, 250 μM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. Grün: Phosphorylierung des Substrates durch $LIRK_{wt}$; Rot: Phosphorylierung des Substrates durch $LIRK_{Mut}$. V_{Initial} entspricht der Steigung der jeweiligen Tangente an die Kurve.

B) Eindimensionale PASA des Substrates nach 32min Phosphorylierung durch die $LIRK_{Mut}$.

Das Substrat wurde zu gleichen Teilen an Serin- und Threoninresten phosphoryliert.

4.9 Konkurrenz der His-PTB₂₇₅ durch phosphorylierten GST-IGF_{NT}

Um zu überprüfen ob die Beobachtung der Serinphosphorylierung durch die $LIRK_{wt}$ aus einer spezifischen Wechselwirkung der PTB-Domäne und dem Tyrosin⁹⁶⁰ der Kinase hervorgeht, sollte die Substratphosphorylierung der His-PTB₂₇₅ durch phosphorylierten GST-IGF_{NT} kompetitiert werden.

Der N-terminale Bereich des IGF-Rezeptors enthält im Juxtamembranbereich mit dem

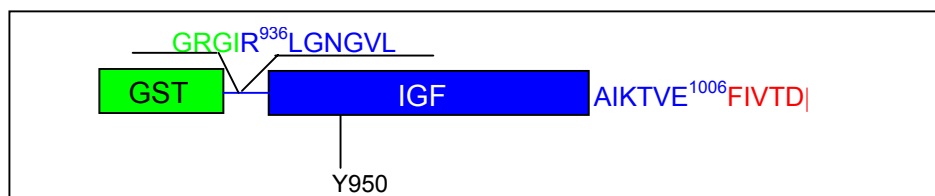


Abb. 4.17: Schematische Darstellung des GST-IGF_{NT}

Das Konstrukt besteht aus einem GST-Tag sowie dem N-terminalen Bereich des IGF_R von Aminosäure Arginin⁹³⁶ bis Glutamat¹⁰⁰⁶. Das Tyrosin⁹⁵⁰ liegt innerhalb eines NPEY-Motivs.

Tyrosin⁹⁵⁰ in einem NPEpY-Motiv eine Bindestelle für die PTB-Domäne. Für meinen Versuch wurde mir freundlicherweise phosphorylierter GST-IGF_{NT} von Fr. Dr. Parvaresch zur Verfügung gestellt. Das Konstrukt besteht aus der IGF_R-Sequenz vom Aspartat⁹³⁶ bis Glutamat¹⁰⁰⁶ inklusive des PTB-bindenden Motivs und einem N-terminalen GST-Tag. Abbildung 4.17 zeigt schematisch den Aufbau des Konstrukts.

Die Phosphorylierungsansätze wurden so gewählt, dass ein Kinase:Substrat-Verhältnis von 1:20 bestand (1µM Kinase:20µM His-PTB₂₇₅); in Gegenwart bzw. Abwesenheit von 15µM phosphoryliertem GST-IGF_{NT}. In Abbildung 4.18 ist die Auswertung des Versuchs als Säulendiagramm dargestellt. Jede Säule entspricht dem Phosphattransfer auf die His-PTB₂₇₅ durch die jeweilige Kinase. In einem Fall in Anwesenheit von phosphoryliertem GST-IGF_{NT} im anderen Fall ohne. Die Abbildung bestätigt, dass die LIRK_{wt} das Substrat His-PTB₂₇₅ deutlich besser phosphoryliert (48 pmol übertragene Phosphate), als die LIRK_{Mut} (25 pmol übertragene Phosphate). In Anwesenheit von phosphoryliertem GST-IGF_{NT} übertrug die LIRK_{wt} im gleichen Zeitraum nur noch 20 pmol Phosphat auf das Substrat. Im Falle der LIRK_{Mut} verhält es sich ähnlich. In Anwesenheit des GST-IGF_{NT} ging der Phosphattransfer durch die Kinase von 25pmol auf noch 15 pmol Phosphat zurück. Dies deutet auf die Bildung eines Komplexes zwischen der PTB-Domäne und der Kinase hin.

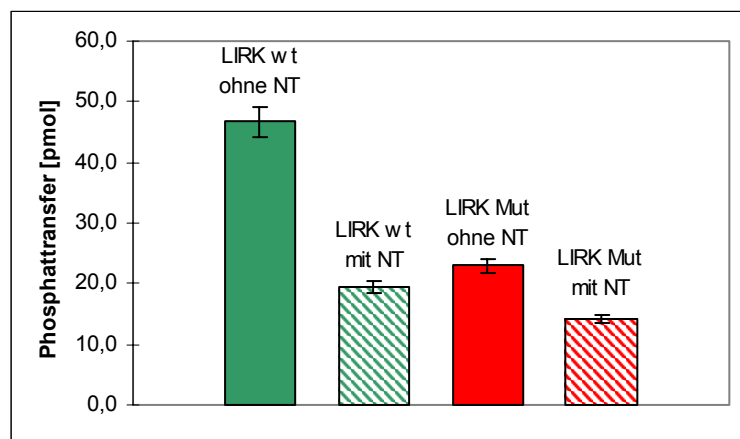


Abb. 4.18: Graphische Darstellung der Substratphosphorylierung von His-PTB₂₇₅ durch die LIRK_{wt} bzw. LIRK_{Mut} mit und ohne Anwesenheit von phosphoryliertem GST-IGF_{NT}

Aufgetragen wurden je 30µl eines Ansatzes (1µM Kinase ; 20µl Substrat ; 250 µM [³²Y]-ATP ; ± 15µM GST-IGF_{NT}) der nach 32min durch SDS-Probenpuffer gestoppt wurde. Aufgetragen ist der Phosphattransfer der jeweiligen Kinase auf das Substrat.

Die LIRK_{wt} übertrug ohne Zugabe von GST-IGF_{NT} nach 32min 48pmol Phosphat auf das Substrat, die LIRK_{Mut} unter gleichen Bedingungen 25pmol Phosphat.

Bei Zugabe von GST-IGF_{NT} übertrug die LIRK_{wt} nach 32min 20pmol Phosphat auf die His-PTB₂₇₅, die LIRK_{Mut} unter gleichen Bedingungen 15pmol Phosphat.

Als Kontrolle, dass der phosphorylierte GST-IGF_{NT} keine unspezifische Hemmung des Kinase-Assays im Allgemeinen darstellt, wurde die His-PTB₂₇₅ in Anwesenheit bzw. Abwesenheit des Peptids durch die Akt-Kinase phosphoryliert.

Hierzu wurde ein Kinase:Substrat-Verhältnisse von 1:20 ausgewählt (1 μ M Kinase:20 μ M Substrat). Im Versuchsansatz befand sich phosphorylierter GST-IGF_{NT} in einer Konzentration von 33 μ M, in einem Kontrollansatz wurde das Volumen durch 50mM Tris pH 7,5 ersetzt. Beide Reaktionsansätze wurden nach 16min mit SDS-Probenpuffer gestoppt. In Abbildung 4.19 ist die Auswertung des Versuchs als Säulendiagramm dargestellt. Jede Säule entspricht dem Phosphattransfer auf die His-PTB₂₇₅ durch die Akt-Kinase; im einen Fall in Anwesenheit von phosphoryliertem GST-IGF_{NT} im anderen Fall ohne. Die Abbildung verdeutlicht, dass die Anwesenheit von phosphoryliertem GST-IGF_{NT} auf den Phosphattransfer der Kinase keinen Einfluss hat. Ohne GST-IGF_{NT} wurden durch die Kinase 250 pmol Phosphat übertragen, mit GST-IGF_{NT} 240 pmol Phosphat. GST-IGF_{NT} wurde durch die Akt-Kinase nicht phosphoryliert. Der Versuch verdeutlicht, dass die Anwesenheit von phosphoryliertem GST-IGF_{NT} den Kinase-Assay nicht negativ beeinflusst.

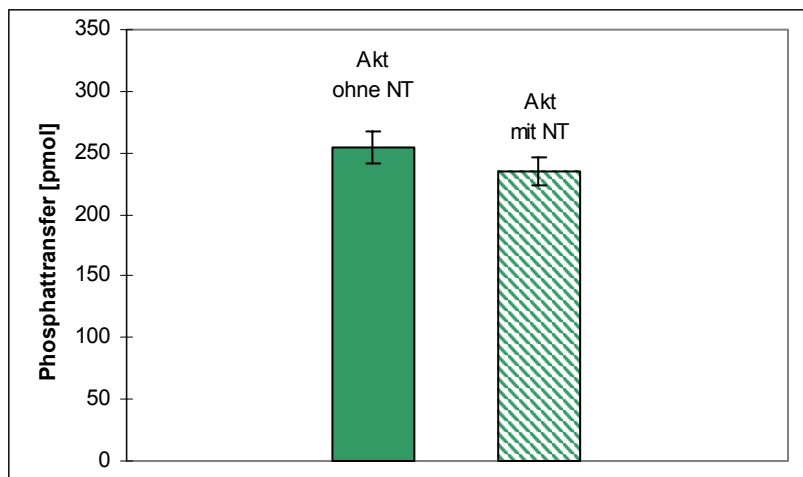


Abb.4.19: Graphische Darstellung der Substratphosphorylierung von His-PTB₂₇₅ durch die Akt-Kinase mit und ohne Anwesenheit von phosphoryliertem GST-IGF_{NT}

Aufgetragen wurden je 30 μ l eines Ansatzes (1 μ M Kinase ; 20 μ l Substrat ; 250 μ M [γ ³²]-ATP; \pm 33 μ M GST-IGF_{NT}) der nach 16min durch SDS-Probenpuffer gestoppt wurde. Aufgetragen ist jeweils der Phosphattransfer der Kinase auf das Substrat.

Es wird deutlich, dass die Akt-Kinase die His-PTB₂₇₅ mit und ohne phosphoryliertem GST-IGF_{NT} gleich stark phosphoryliert.

4.10 Zeitabhängige Phosphorylierung der His-PTB₂₇₅ durch unterschiedliche Kinasmengen

Der Kompetitionsversuch mit phosphoryliertem GST-IGF_{NT} hat gezeigt, dass sich zwischen Kinase und Substrat ein Komplex ausbildet. Dies impliziert, dass mit steigender Kinase-Konzentration sich eine erhöhte Menge an Komplex ausbilden kann. Diese Versuchsmöglichkeit stellt eine Alternative dar, um die Komplexbildung zwischen der PTB und der Kinase zu zeigen. Hierzu wurde eine bestimmte Konzentration an Substrat (38 μ M)

zeitabhängig mit steigenden Mengen an phosphophorylierter, und damit aktivierter LIRK_{wt}, phosphoryliert. Die Kinasekonzentrationen wurden von 1 μ M ausgehend für jeden Ansatz jeweils verdoppelt. In Abbildung 4.20 sind die gemessenen cpm (counts per minute) des Substrat His-PTB₂₇₅ gegen die Zeit aufgetragen. Diese Einheiten sind für diesen Versuch zu empfehlen, da mit steigender Kinasekonzentration stets unbekannte Mengen an ATP aus der Vorphosphorylierung in den Substratphosphorylierungs-Ansatz überführt werden. Die einzelnen Kinasekonzentrationen sind farblich markiert (1 μ M = blau; 2 μ M = grün; 4 μ M = rot). Die Abbildung verdeutlicht, dass das Substrat bei jeder Kinasekonzentration ungefähr gleich stark phosphoryliert wird. So wurden bei 1 μ M und 2 μ M Kinase nach 32min 7600cpm im Substrat gemessen, bei 4 μ M LIRK_{wt} 5800cpm.

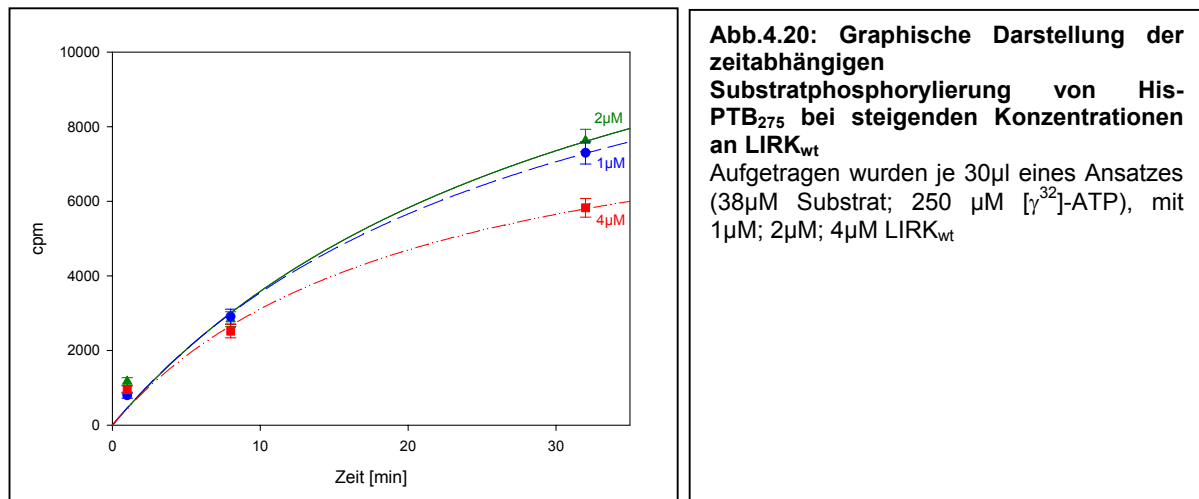


Abb.4.20: Graphische Darstellung der zeitabhängigen Substratphosphorylierung von His-PTB₂₇₅ bei steigenden Konzentrationen an LIRK_{wt}

Aufgetragen wurden je 30 μ l eines Ansatzes (38 μ M Substrat; 250 μ M [γ ³²]-ATP), mit 1 μ M; 2 μ M; 4 μ M LIRK_{wt}

Aus dem Versuch wird deutlich, dass nicht der Anteil an Kinase im Ansatz limitierend für die Komplexbildung ist, sondern das Substrat His-PTB₂₇₅.

5 Diskussion

5.1 Die verwendeten PTB-Derivate

Im Mittelpunkt meiner Arbeit stand die Frage, ob Komplexbildung Einfluss auf die Spezifität der Kinase hat. Als Modellreaktion wurde von mir die Interaktion der Insulinrezeptorkinase mit der Phosphotyrosin-bindenden Domäne des IRS-1 (PTB) untersucht. Die PTB-Domäne wurde von mir ausgewählt, da die Serinphosphorylierung dieser IRS-1 Domäne für den Abschaltmechanismus der IRS-1-Insulinrezeptor-Wechselwirkung verantwortlich gemacht wird (Zick *et al.*, 1997).

Zur Beantwortung der Fragestellung wurden von mir unterschiedliche PTB-Konstrukte kloniert und exprimiert. Von den fünf Konstrukten, die kloniert wurden, konnten nur drei als native Proteine isoliert werden. Das mag daran liegen, dass es sich bei der PTB-Domäne im allgemeinen um ein Faltungsmotiv handelt, das von einer Vielzahl von Faktoren abhängt. So fällt auf, dass die GST-PTB_{Mut} nach der Solubilisierung im Wesentlichen in der unlöslichen Fraktion zurück bleibt (vergleiche Abbildung 4.6 Spur „L“ und Spur „P“). Entsprechend ist die Ausbeute von diesem PTB-Derivat äußerst gering. Aus vier Litern Zellkultur wurden nur 2mg Protein isoliert, das in einer Reinheit von 90% vorlag. Im Gegensatz dazu wurde ein PTB-Konstrukt, dessen C-Terminus verkürzt war und N-terminal keinen GST-Tag trug, als lösliches Protein in hoher Ausbeute und Reinheit gewonnen. Aus 1l Kulturmedium konnten 6mg natives Protein mit einer Reinheit von 95% isoliert werden.

Die Struktur unterschiedlicher PTB-Domänen (IRS-1; Shc) (Zwahlen *et al.*, 2000) ist mittels Röntgenstruktur und NMR aufgeklärt worden. Während die PTB des IRS-1 und des Dap-1 (Blacklow *et al.*, 2004) auch in ihrer Apo-Form (d.h. ohne gebundenen Liganden) hoch geordnet ist (Park *et al.*, 2003; Eck *et al.*, 1996), zeigt eine neuere Arbeit über die PTB-Domäne von Shc, dass die Peptidbindungstasche in Abwesenheit des Peptidliganden ungeordnet ist, und erst nach Peptidbindung voll strukturiert wird (Zhou *et al.*, 2003). Schon die Verlängerung der PTB durch einen His-Tag über Asparagin²⁷⁵ hinaus (vergleiche Abb. 4.13B) führt zu einer metastabilen Form des Proteins, der dadurch Rechnung getragen wurde, dass hohe Proteinkonzentrationen vermieden wurden. Im Gegensatz dazu ist das GST-Fusionsprotein, dessen GST-Tag am N-Terminus der PTB positioniert ist und dessen C-Terminus bis Aspartat²⁷⁵ reicht, äußerst stabil. Da ich in meiner Arbeit den dimerisierenden Effekt des GST-Tag vermeiden wollte, habe ich mich für einen His-Tag am Protein entschieden. Das Strukturmerkmal der PTB-Domäne entspricht einem Kern aus sieben β -

Faltblättern, über denen eine einzelne C-terminale α -Helix liegt, die den Peptidliganden wie ein „Sandwich“ über dem Kern positioniert. Die von mir gewählten Konstrukte scheinen darauf hinzuweisen, dass die PTB-Domäne des IRS-1 außerordentlich empfindlich auf Extension der α -Helix reagiert. Zwar ließ sich die His-PTB₂₇₅ in sehr guter Ausbeute exprimieren; jedoch erwies sich dieses Protein als äußerst labil, da es zu starker Aggregation neigt. Dies wurde von mir während der Konzentrierung über Centrikon (6.2.5) beobachtet.

Die Überlegungen, dass die Aminosäuresequenz der C-terminalen α -Helix Auswirkungen auf die Stabilität der PTB-Domäne hat, könnten auch bei der GST-PTB_{Mut} eine Rolle spielen. Zwar wurden in diesem Konstrukt nur sechs Aminosäuren, bedingt durch die Klonierungsstrategie, C-terminal an die PTB angehängt (Vergleiche Abbildung 4.5); jedoch war ich mir zu diesem Zeitpunkt noch nicht über die strukturellen Auswirkungen dieser Modifikation im Klaren. Wichtig hingegen war es mir, zwischen dem GST-Tag und dem N-Terminus der PTB eine zusätzliche Tyrosinphosphorylierungsstelle einzubringen, da ich die duale Aktivität der Insulinrezeptorkinase (Phosphorylierung von Tyrosinresten sowie Serin-/Threoninresten) untersuchen wollte. Dieses zusätzliche Tyrosin befindet sich innerhalb der Erkennungssequenz für die TEV-Protease. Diese sollte es mir erlauben, den GST-Tag von der PTB-Domäne abzutrennen.

5.2 Charakterisierung der Kinasen

Die von mir in meinen Untersuchungen verwendeten Kinasen (LIRK $_{\Delta 72C}$ Mut; LIRK_{wt}; LIRK_{Mut}) waren, bis auf die LIRK $_{\Delta 72C}$ Mut, in der Arbeitsgruppe etabliert und freundlicherweise von Fr. Dr. Parvaresh zur Verfügung gestellt worden (Reinigung siehe auch Abb. 4.7). Die Kinase LIRK $_{\Delta 72C}$ Mut wurde von mir kloniert und erfolgreich als natives Protein exprimiert. In dieser Kinase wurde das Tyrosin⁹⁶⁰ durch Phenylalanin substituiert. Dieses Tyrosin liegt innerhalb eines NPEY-Motivs im N-terminalen Bereich (Juxtamembranbereich) der Kinase und ist für die hochaffine Interaktion mit der PTB-Domäne verantwortlich (White *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 1995). Bei einem Vergleich durch zeitabhängige Autophosphorylierung der Kinase mit der entsprechenden Wildtyp-Kinase wird ersichtlich, dass diese N-terminale Phosphorylierungsstelle in der Mutante fehlt. Dies geht aus der nicht denaturierenden PAGE in Abbildung 4.4 hervor.

In der Substratphosphorylierung der GST-IGF_{D→A}, die für Substrat- und Autophosphorylierung inaktiv ist, erwiesen sich die LIRK_{wt} und die am N-Terminus mutierte LIRK_{Mut} als gleich effektiv. Beide Kinasen unterschieden sich weder in der

Initialgeschwindigkeit, mit der das Substrat phosphoryliert wurde ($V_{\text{Initial}} = 1,8 \text{ pmol P} \times \text{pmol Kinase}^{-1} \times \text{min}^{-1}$), noch im maximalen Phosphattransfer (vergleiche Abb. 4.9; 140 pmol Phosphat nach 32 min). Die Analyse der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung des Substrates, phosphoryliert durch die monomeren und zuvor durch Autophosphorylierung aktivierten Kinasen, ergab wie erwartet ausschließlich Tyrosinphosphorylierung. Es ist von Interesse, dass das gleiche Substrat von der stets dimeren GST-IRKD an Tyrosin- und Serinresten phosphoryliert wird, was auf die effektive katalytische Aktivität der GST-Kinasen als duale Kinasen hinweist (Parvaresch *et al.*, 2002)

5.3 Änderung der Kinaseaktivität durch Bildung eines Komplexes mit der PTB-Domäne

Die Serinphosphorylierung der PTB-Domäne durch Serinkinasen wird im pathophysiologischen Zustand der Insulinresistenz als ein Abschaltsignal der Interaktion zwischen Insulinrezeptor und IRS-1 beschrieben (Zick, 2004). Für das Serin²⁷⁰ innerhalb der PTB-Domäne ist in der Literatur die Phosphorylierung durch die Akt-Kinase gezeigt worden (Zick *et al.*, 1997) und wurde von mir in der vorliegenden Arbeit bestätigt (Abb. 4.19).

Ein erster orientierender Versuch mit den beiden Vollängen-Kinasen LIRK_{wt} und LIRK_{Mut}, sowie GST-PTB_{Mut} als Substrat zeigt, dass sich die Effizienz der Kinasen in der Substratphosphorylierung deutlich unterscheidet (Abb. 4.10). Bei einem Kinase:Substrat-Verhältnis von 1:18 wurden durch die Wildtyp-Kinase, die über das Tyrosin⁹⁶⁰ effizient mit der PTB-Domäne wechselwirken kann, 120 pmol Phosphat auf das Substrat transferiert. Die LIRK_{Mut}, in der dieses Tyrosin⁹⁶⁰ durch Phenylalanin substituiert ist, übertrug im selben Zeitraum nur 40 pmol Phosphat. Diese Phosphate waren, wie die PASA zeigt, vornehmlich an Tyrosinresten lokalisiert (Abb. 4.10B). Jedoch wurden durch die Wildtyp-Kinase auch 20% der

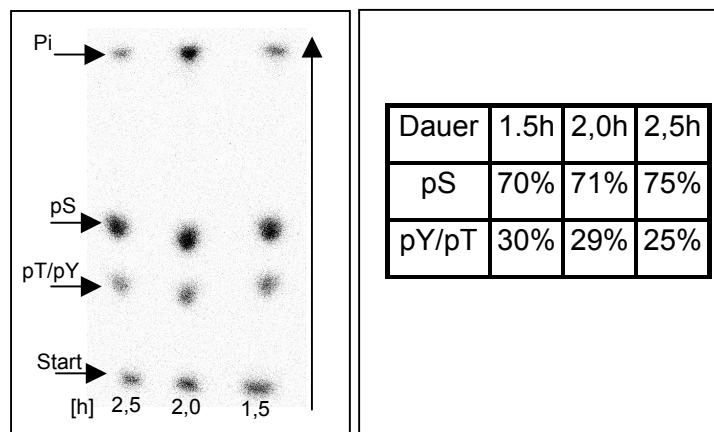


Abb. 5.1: Zeitabhängige saure Hydrolyse der durch LIRK_{wt} phosphorylierten GST-PTB_{Mut}

Auf der Autoradiographie wird die Phosphoaminosäure-Zusammensetzung der GST-PTB_{Mut} nach Phosphorylierung durch die LIRK_{wt} gezeigt. Die durch tryptische Elution isolierten Peptide wurden mit 600 µl 6N HCl unterschiedlich lange hydrolysiert. Der jeweilige Anteil von Phosphoserin und Phosphotyrosin/-threonin ist in der nebenstehenden Tabelle zusammengefasst.

Phosphate auf Serinreste der GST-PTB_{Mut} übertragen. Die gemessene Menge an Phosphoserin ist jedoch nur bedingt repräsentativ, da in diesem Versuch die Menge an nicht hydrolysierten Peptiden in der partiellen Hydrolyse als unerwartet hoch beobachtet wurde. Gleichwohl demonstrierte dieser Versuch, dass die effiziente Interaktion mit der PTB-Domäne die Wildtyp-Kinase in die Lage versetzt, das Substrat dual (d.h. sowohl an Tyrosin- als auch an Serinresten) zu phosphorylieren. Bei den folgenden Phosphoaminosäureanalysen wurde das Protokoll so geändert, dass eine der Proteinmenge adäquate Menge an Säure hinzugegeben wurde. Die Optimierung der PASA ist in Abbildung 5.1 dokumentiert. In diesem Versuch wurde nicht nur die Säuremenge erhöht, sondern auch die Hydrolysezeiten zwischen 1,5h und 2,5h variiert. Es zeigte sich, dass die Hydrolysezeit nur geringen Einfluss auf das Ausmaß der detektierbaren Phosphoserinmenge hat.

Zur quantitativen Erfassung des Phosphattransfers auf die GST-PTB_{Mut} wurde eine zeitabhängige Phosphorylierung bei einem Kinase:Substrat-Verhältnis von 1:5 durchgeführt (Abb. 4.11). Der Unterschied der Initialgeschwindigkeiten beider Kinasen in der Phosphorylierung der PTB-Domäne dokumentiert, dass bei gleichen Substratmengen die Wildtypkinase das Substrat 10fach schneller phosphoryliert als die mutierte Kinase. Hinsichtlich der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung des Substrates ist zu beobachten, dass nur die Wildtyp-Kinase das Substrat nennenswert an Serinresten phosphoryliert (65%).

Ich habe dieses Substrat (GST-PTB_{Mut}) in meiner Arbeit nicht weiter untersucht, als ich feststellte, dass die Bestimmung der Bindungskonstante K_D mit diesem Substrat nicht möglich war, da es im Laufe der Lagerung seinen Bindungscharakter verlor. In Einklang mit der spezifischen Interaktion der Vorversuche (vergleiche Abb. 4.10 + 4.11) war zum einen ein signifikanter Anteil an Phosphoserin im Substrat zu beobachten, zum anderen eine Sättigung des maximal zu übertragenden Phosphates auf das Substrat bei einer Substratkonzentration von mehr als 8 μ M. Bei einer Überprüfung dieses Befundes und dem Versuch, K_D durch jeweilige zeitabhängige Substratphosphorylierungen zu bestimmen, konnte keine Sättigung des maximalen Phosphattransfers erreicht werden; zudem ging auch der Anteil an gemessenem Phosphoserin im Laufe der Versuche erheblich zurück (bis 7% pS durch LIRK_{wt}; nicht gezeigt). Wie bereits vorher diskutiert, zeigte sich die GST-PTB_{Mut} bereits in der Expression als nur teilstabiles Protein, da es zum überwiegenden Teil in Einschlusskörpern vorlag.

In den nachfolgenden Versuchen wurde daher das PTB-Konstrukt His-PTB₂₇₅ verwendet. Dieses PTB-Derivat trägt das Serin²⁷⁰, welches innerhalb einer Erkennungssequenz (**RVRASS**²⁷⁰) für die Akt-Kinase liegt und wie gezeigt (Abb. 4.19) ein effizientes Substrat für die Akt-Kinase darstellt. Wie erwartet, beobachtete ich bei diesem Substrat eine

Phosphorylierung durch die LIRK_{wt}. Ein Vergleich der Initialgeschwindigkeiten V_{Initial} zeigt jedoch, dass das Substrat His-PTB₂₇₅ durch die LIRK_{wt} genauso schnell phosphoryliert wird wie das Substrat GST-PTB_{Mut} durch die mutierte Kinase LIRK_{Mut} ($0,024 \text{ pmol P} \times \text{pmol Kinase}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ für His-PTB₂₇₅ durch LIRK_{wt} gegenüber $0,026 \text{ pmol P} \times \text{pmol Kinase}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ für GST-PTB_{Mut} durch LIRK_{Mut}; vergleiche Abb. 4.11 und 4.15). Schon daraus geht hervor, dass auch dieses Substrat nicht effizient an die Kinase bindet. Dennoch zeigt die PASA Serin-/Threonin-Phosphorylierung des Substrates ($\text{pS:pT} \equiv 1:1$; vergleiche Abb. 4.15), katalysiert durch eine Tyrosinkinase. Und obwohl die LIRK_{Mut}, dessen Tyrosin⁹⁶⁰ durch Phenylalanin substituiert ist, dieses Substrat (His-PTB₂₇₅) bei gleicher Konzentration nochmals um den Faktor 5 langsamer phosphoryliert, zeigt die PASA auch in diesem Fall Phosphoserin und Phosphothreonin (Abb. 4.16B).

Aus *in vivo* Untersuchungen ist bekannt, dass IRS-1 durch Überexpression in der Zelle den Effekt der Phenylalanin-Mutante des Insulinrezeptors kompensiert. Die Autoren schätzen den Bindungsanteil des phosphorylierten Tyrosin⁹⁶⁰ im Vergleich zur Phenylalanin-Mutante auf 40% (White *et al.*, 1988).

Aus den Phosphorylierungsversuchen mit konstanten Konzentrationen der His-PTB₂₇₅ und steigenden Kinasekonzentrationen geht hervor, dass nur ein geringer Teil des Substrates im Ansatz bindungsfähig ist, da sich mit steigender Konzentration der Kinase keine Erhöhung der Komplexbildung mit dem Substrat ergibt (Abb. 4.18). Dennoch ist die Substraterkennung sowohl durch die Wildtyp-Kinase als auch für die Mutante spezifisch, da sich die Wechselwirkung des Substrates mit der Kinase durch Zugabe von phosphoryliertem GST-IGF_{NT}, der mit dem NPEpY-Motiv ebenfalls eine Erkennungssequenz für die PTB-Domäne besitzt, kompetitieren konnte (Abb. 4.18).

Die zuvor schon beschriebene Spezifität der Akt-Kinase, welche das Substrat allein auf Grund der Erkennungssequenz (**RvRASS**²⁷⁰) phosphoryliert, konnte nachdrücklich dadurch bewiesen werden, dass ein verkürztes PTB-Derivat (His-PTB₂₆₃, ohne Serin²⁷⁰) nicht phosphoryliert wird (nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu ist der Insulinrezeptor durchaus in der Lage, das Substrat His-PTB₂₆₃ an Serin- und Threoninresten zu phosphorylieren (Abb. 5.2). Welches Serin und welches Threonin in der PTB-Sequenz phosphoryliert wird, ist nicht geklärt. Es fällt jedoch auf, dass die Initialgeschwindigkeit eines Kinase:Substrat-Verhältnisses von 1:10 nur noch 1/15 der Initialgeschwindigkeit für die Vollängen-His-PTB₂₇₅ beträgt ($0,002 \text{ pmol P} \times \text{pmol Kinase}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ für His-PTB₂₆₃ durch LIRK_{wt} gegenüber $0,024 \text{ pmol P} \times \text{pmol Kinase}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ für His-PTB₂₇₅ durch LIRK_{wt}).

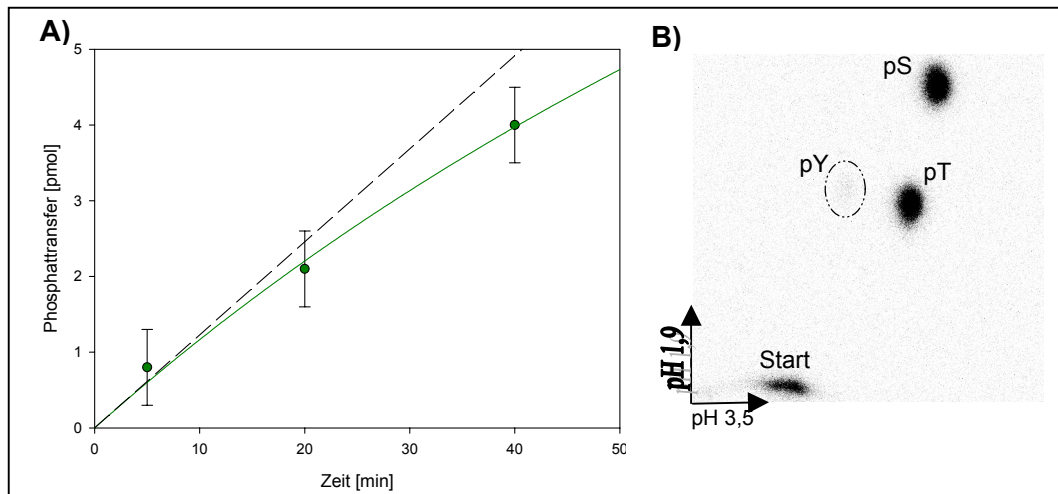


Abb. 5.2: A) Graphische Darstellung der zeitabhängigen Substratphosphorylierung von His-PTB₂₆₃ durch LIRK_{wt}.

Aufgetragen sind je Zeitwert 30 μ l Volumen bei 20 μ M Substrat, 2 μ M Kinase, 250 μ M [γ ³²]-ATP.

Die His-PTB₂₆₃ wird durch die LIRK_{wt} nur schwach phosphoryliert. $V_{\text{Initial}} = 0,002 \text{ pmol P} \times \text{pmol Kinase}^{-1} \times \text{min}^{-1}$

B) 2D PASA der His-PTB₂₆₃ phosphoryliert durch die LIRK_{wt}

Das Substrat wurde durch die Kinase nur an Serinresten (50%) und Threoninresten (50%) phosphoryliert. Tyrosinreste des Substrates werden durch die Kinase nur nebensächlich phosphoryliert (>1%)

Bei Betrachtung der Röntgenstruktur der PTB-Domäne (Eck *et al.*, 1998) kommen verschiedene Serin- und Threoninreste an der Oberfläche des Proteins für eine Phosphorylierung in Frage. Hierbei sind das Threonin¹⁷⁶ zwischen den β -Faltblättern 1 und 2 sowie das Serin²²⁸ und Threonin²³¹ zwischen den β -Faltblättern 6 und 7 zu nennen, da sie alle an exponierten Stellen des Proteins liegen.

Dies wirft die grundsätzliche Frage auf, welche Serine überhaupt durch die Tyrosinkinase erkannt und phosphoryliert werden.

Bei einem Vergleich der Serin-Autophosphorylierung des Insulinrezeptors liegen die phosphorylierten Serine in sequenziell deutlich unterschiedlichen Motiven. Das Serin¹²⁷⁵ liegt in der Umgebung von KAPES¹²⁷⁵EELE, das Serin¹³⁰⁹ hingegen in der Sequenz DGGSS¹³⁰⁹LGFK (Al-Hasani *et al.*, 1997). Dadurch wird ersichtlich, dass die Insulinrezeptorkinase, wie auch der Insulinrezeptor selbst, ihre Substrate nicht nach einer Erkennungssequenz auswählt, sondern nach Zugänglichkeit der zu phosphorylierenden Aminosäuren (Tennagels *et al.*, 2001). In sofern verwundert es nicht, dass die kurze PTB-Domäne (His-PTB₂₆₃), wenngleich auch schlechter als die Vollängen PTB-Domäne (His-PTB₂₇₅), an Serin- und Threoninresten phosphoryliert wird.

Daraus schließe ich, dass die kinetischen Anforderungen des Substrates darüber entscheiden, ob es phosphoryliert wird oder nicht. Dies steht im Gegensatz zu der Sequenzspezifität der Serinkinasen, wie ich es für die Akt-Kinase im Speziellen gezeigt habe.

Generell ist hervorzuheben, dass der Insulinrezeptor nur dann duale Aktivität zeigt, wenn ein Substrat entweder durch Poly-Lysin (Noelle *et al.*, 2002) oder durch Phosphotyrosin-bindende Eigenschaften (in meinem Fall die PTB-Domäne des IRS-1) an die Kinase bindet. Daraus folgt, dass die duale Aktivität der Kinase eine verstärkte Interaktion des Substrates mit der Kinase verlangt. In der Tat wird die apparente lokale Konzentration des Substrates durch Komplexbildung mit der Kinase (sei es durch Poly-Lysin oder durch Phosphotyrosin-bindende Eigenschaften) unvergleichlich erhöht.

5.4 Wie erklärt sich die duale Spezifität der Insulinrezeptorkinase mit den publizierten Röntgenstrukturdaten?

Tyrosinkinase weisen generell in der P0-Bindungsstelle ein Prolin (in LIRK Prolin¹¹⁶⁰) auf. Dieses Prolin sorgt dafür, dass die Aktivierungsschleife das zu bindende Substrat in einem solchen Abstand hält, dass ausschließlich Tyrosinreste phosphoryliert werden können. Serinkinase besitzen anstelle eines Prolins ein Threonin, das diese sterischen Restriktionen nicht vermittelt. Wenn also der Insulinrezeptor in der Auto- und Substratphosphorylierung dennoch zur dualen Kinaseaktivität fähig ist, muss vermutet werden, dass die Proteinstruktur, wie aus NMR-Untersuchungen bekannt (Jardetzky *et al.*, 1994), sich in ständiger Bewegung befindet. Wenn also die Interaktion des Substrates mit der Kinase die produktive Lebensdauer des Enzym-Substrat-Komplexes verlängert, sollte die Restriktion durch das Prolin in der P0-Bindungsstelle somit aufgehoben werden; dies lässt zu, dass duale Aktivität beobachtet werden kann. Tyrosinreste werden nach dieser Hypothese, wie auch von mir beobachtet, wesentlich schneller durch die Kinase phosphoryliert als Serinreste (vergleiche Abb. 4.11 und Abb. 4.15). Die zeitliche Nachfolge der Serinphosphorylierung könnte als potentiell Abschaltsignal für die Kinase:Substrat-Interaktion gelten, wenn, wie unsere Arbeitsgruppe zeigen konnte, das Phosphoserin²⁷⁰ ein 14-3-3-Protein bindet (Parvaresh, unveröffentlichte Versuche). Dies könnte für die Signalwirkung von Tyrosinkinase einen möglichen Mechanismus der homologen Desensibilisierung bedeuten.

5.5 Erklärt die beobachtete duale Aktivität der Insulinrezeptor-kinase auch die duale Aktivität anderer Kinasen?

Die Beobachtung zur dualen Spezifität der Insulinrezeptorkinase bei der Phosphorylierung der PTB-Domäne des Insulinrezeptorsubstrates (IRS-1) findet eine überraschende Entsprechung in der dualen Spezifität der Proteinkinase MEK, die als Prototyp einer dualen Kinase gilt (Lindberg *et al.*, 1992). Die spezifischen Wechselwirkungen, die sich zwischen der MEK-Kinase und ihrem Substrat, der MAP-Kinase, ausbilden müssen, um das Substrat zu erkennen und dual phosphorylieren zu können, sind vergleichbar mit der Komplexbildung des phosphorylierten Tyrosin⁹⁶⁰ der Rezeptorkinase und der PTB-Domäne. So verwundert es nicht, dass denaturierte Proteine oder Peptide, die von der MAP-Kinase abgeleitet sind, keine Substrate für die MEK-Kinase darstellen (Cobb *et al.*, 2002). Auch in diesem Fall hieße die Schlussfolgerung:

Die duale Aktivität einer Kinase verlangt die verstärkte Anbindung des Substrates an den Katalysator.

5.6 Ausblicke

In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass die Modifikation der C-terminalen α -Helix der PTB-Domäne zu einer Destabilisierung des gesamten Faltungsmotives führt. Es ist daher unverzichtbar, PTB-Konstrukte zu generieren, deren His-Tag am N-Terminus des Proteins kloniert wird.

Desweiteren zeige ich, dass die Insulinrezeptorkinase das Serin²⁷⁰ phosphoryliert. Wird dieses zu phosphorylierende Serin entfernt (His-PTB₂₆₃), phosphoryliert der Insulinrezeptor das Substrat weiterhin an Serin- und Threoninresten. Daher wäre es von Interesse, diese alternativen Phosphorylierungsstellen über NMR oder Massen-Spektroskopie zu bestimmen.

Im Laufe der Versuche fiel auf, dass die verwendeten PTB-Derivate in metastabiler Konformation vorlagen. Es ist daher notwendig die Tertiärstruktur der PTB-Derivate über CD-Spektroskopie zu bestimmen.

Schließlich stellt sich die Frage, ob die Einführung einer zusätzlichen exponierten Tyrosinphosphorylierungsstelle (vergleiche GST-PTB_{Mut}) in monomeren His-PTB-Konstrukten den Befund der nachgeschalteten Serinphosphorylierung bestätigt.

6 Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 Bakterienstämme, Viren, Kulturmedien und –zusätze

| | |
|---|--|
| <i>Autographa californica</i> Nuclear Polyhedrosis Virus | Pharmingen, San Diego, CA, USA |
| <i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf9) Zellen | Dr. S. Stabel, Max-Delbrück-Laboratorien, Köln |
| <i>Escherichia coli</i> Dh5 α | Dr. S. Stabel, Max-Delbrück-Laboratorien, Köln |
| <i>Escherichia coli</i> BL21-DE3 | Studier & Moffatt 1986 |
| <i>Escherichia coli</i> BL21-DE3-RIPL | Stratagene, |
| Amphotericin B (Fungizone®) | Life Technologies, Eggenstein |
| Ampicillin, Natriumsalz | Fluka, Buchs, Schweiz |
| Fötale Kälberserum (FCS) | Life Technologies, Eggenstein |
| Gentamycinsulfat (G418) | Life Technologies, Eggenstein |
| Grace´s Insektenzellenmedium | Life Technologies, Eggenstein |
| LB-Broth Base Medium | Life Technologies, Eggenstein |
| LB-Agar | Life Technologies, Eggenstein |
| Neutralrot (3-Amino-7-dimethylamino-2-Methylphenazin-Hydrochlorid) | Sigma, Taufkirchen |
| Trypanblau (1,2-bis(-Amidino-2-benzofuranyl)-ethylen (0,5 % (w/v) Trypanblau in 0,9 % (w/v) NaCl) | Serva, Heidelberg |

6.1.2 Chemikalien

A

| | |
|---------------------------------------|-----------------------|
| Acetonitril, <i>gradient grade</i> | Merck, Darmstadt |
| Acrylamid, p.a. | Serva, Heidelberg |
| Adenosin-5´-diphosphat | Boehringer, Mannheim |
| Adenosin-5´-triphosphat | Boehringer, Mannheim |
| Agarose, <i>electrophoresis grade</i> | Seakem, Hameln |
| Ammoniumacetat | Fluka, Buchs, Schweiz |
| Ammoniumper(oxodi)sulfat | Serva, Heidelberg |
| Ammoniumsulfat | Merck, Darmstadt |

B

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

C

| | |
|----------------------------------|-------------------|
| (Coomassie Brilliant) Blue G-250 | Serva, Heidelberg |
| (Coomassie Brilliant) Blue R-250 | Serva, Heidelberg |

D

| | |
|-------------------------|--------------------|
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Merck, Darmstadt |
| Dithiothreitol (DTT) | Sigma, Taufkirchen |

E

| | |
|---|--------------------|
| Essigsäure, >97%, p.a. | Roth, Karlsruhe |
| Ethanol, absolut, p.a. | Merck, Darmstadt |
| Ethidiumbromid (2,7-Diamino-10-ethyl-9-phenyl-phenanthridiumbromid) | Sigma, Taufkirchen |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Merck, Darmstadt |

G

| | |
|--------------------------------------|----------------------|
| Glutathion, oxidiert | Serva, Heidelberg |
| Glutathion, reduziert | Boehringer, Mannheim |
| Glycerin | Serva, Heidelberg |
| Glycin, <i>electrophoresis grade</i> | ICN, Aurora, OH, USA |

H

| | |
|-----------|-----------------|
| Harnstoff | Biomol, Hamburg |
|-----------|-----------------|

I

| | |
|-------------------|------------------|
| Imidazol | Merck, Darmstadt |
| Isopropanol, p.a. | Merck, Darmstadt |

K

| | |
|---|------------------|
| Kaliumchlorid-hexahydrat, p.a. | Merck, Darmstadt |
| Kaliumhydrogenphosphat, p.a. | Merck, Darmstadt |
| di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, p.a. | Merck, Darmstadt |
| Kaliumhydroxid | Merck, Darmstadt |

L

| | |
|-----------|--------------------|
| Leupeptin | Sigma, Taufkirchen |
|-----------|--------------------|

M

| | |
|--|-------------------|
| Magnesiumchlorid-Hexahydrat, p.a. | Merck, Darmstadt |
| Methanol, p.a. | Roth, Karlsruhe |
| N,N'-Methylenbisacrylamid, <i>research grade</i> | Serva, Heidelberg |

N

| | |
|--|--------------------|
| N-(3-Fluoranthyl)maleimide | Sigma, Taufkirchen |
| Natriumacetat, wasserfrei, p.a. | Merck, Darmstadt |
| Natriumazid, reinst | Merck, Darmstadt |
| Natriumchlorid p.a. | Roth, Karlsruhe |
| Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat, p.a. | Merck, Darmstadt |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Serva, Heidelberg |
| di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat | Merck, Darmstadt |
| Natriumhydroxid | Merck, Darmstadt |

| | |
|-----------------------------------|--------------------|
| Natriumfluorid | Merck, Darmstadt |
| Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) | Sigma, Taufkirchen |

P

| | |
|-------------------------------------|----------------------|
| PCR-Nucleotidmix | Boehringer, Mannheim |
| Phenylmethylsulfonylfluorid | Sigma, Taufkirchen |
| Polyethylenglykol 35000 (PEG-35000) | Serva, Heidelberg |
| i-Propanol, p.a. | Merck, Darmstadt |

S

| | |
|-----------------------|------------------|
| D(+)-Saccharose, p.a. | Roth, Karlsruhe |
| Salzsäure, 37 % | Roth, Karlsruhe |
| Schwefelsäure, 98 % | Merck, Darmstadt |

T

| | |
|---|----------------------|
| TCEP | Fluka, Taufkirchen |
| N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED) | Serva, Heidelberg |
| Triton-X-100®, p.a. | Boehringer, Mannheim |
| Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) | Sigma, Taufkirchen |
| Trypanblau (1,2-bis(-Amidino-2-benzofuranyl)- ethylen (0,5 % (w/v) Trypanblau in 0,9 % (w/v) NaCl) | Serva, Heidelberg |
| Tween-20 (Polyoxyethylensorbitmonolaureat) | BioRad, München |

X

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

6.1.3 Chromatographiematerial**Matrixmaterial:**

| | |
|-------------------------|---------------------|
| Glutathion-Sepharose-4B | Pharmacia, Freiburg |
|-------------------------|---------------------|

Fertigsäulen:

| | |
|-------------------|---------------------|
| <i>Resource Q</i> | Pharmacia, Freiburg |
| Superdex 75 | Pharmacia, Freiburg |

6.1.4 Kit-Systeme

| | |
|--------------------------------|--------------------------------|
| BaculoGold™ -Transfection Kit | PharminGen, San Diego, CA, USA |
| GenElute™ Plasmid Miniprep Kit | Sigma, Steinheim |
| GenElute™ Plasmid Midiprep Kit | Sigma, Steinheim |
| Nucleobond® AX 100 Plasmid Kit | Macherey & Nagel, Düren |
| QIAquick™ PCR Purification Kit | Qiagen, Hilden |

6.1.5 Laborgeräte**A****Autoklaven:**

| | |
|---------------------------------|------------------------------|
| Tischautoklav Tuttnauer 2540 EL | Tuttnauer, Jerusalem, Israel |
| Varioklav Dampfsterilisator | H+P Labortechnik, München |

B

BioLogic Workstation
(ink. Molecular Analyst Software)

BioRad, München

E**Elektrophorese-Apparaturen:**

Mighty Small II
Novex EI 9001-XCELL 2 Mini-Cell
Electroporator 2510

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

F**FPLC:**

Autoinjection Valve AV7-3 und AV8
BioLogic Controller
BioLogic Workstation
Model 2128 Fraction Collector

BioRad, München
BioRad, München
BioRad, München
BioRad, München

G**Geltrockner:**

Model 543
Phero-Temp

BioRad, München
Biotec Fischer, Reiskirchen

H

Heizblock HB-130
Homogenisator

Unitek
Braun, Melsungen

I**Inkubatoren:**

EB 28
FD 53

WTB Binder, Tuttlingen
WTB Binder, Tuttlingen

L

Leuchttisch

Nonius, Delft, NL

M

Microplate Reader Model 550
Mikroskop Wilovert S

BioRad, München
Hund, Wetzlar

P**PCR-Gerät:**

Mastercycler 5330
Peristaltikpumpe Minipuls 2

Eppendorf, Hamburg
Gilson, Arnouville Les Gonesse,
Frankreich
Beckman, München

Photometer DU 7400

R**Rühr- Schüttel- und Mischgeräte:**

Ikamag Magnetrührer mit Heizplatte
Ikamag Magnetrührer Reverstir Model RS 8

Janke&Kunkel, Staufen
Toyo Kagaku Sangyo Co.,
Japan

IKA-Vibrax-VXR
Rollschüttler RM-5
Inkubator Shaker innova 4000

Janke&Kunkel, Staufen
Braun, Melsungen
New Brunswick Sci., USA

Rotoren:

HFA 12.500, HFA 22.50

Heraeus, Düsseldorf

S**Spannungsgeber:**

EPS 3.500
3000 Xi
PowerPac 3000
Sterilbank LB-48-C Lamin Air®

Pharmacia, Feiburg
BioRad, München
BioRad, München
Heraeus, Düsseldorf

T

Thermomixer 5436

Eppendorf, Hamburg

U

Ultraschallquelle
(ink. Branson Sonifier Power Supply)

Branson Instruments, Danbury,
USA

V

Vakuumpumpe

Vakuubrand, Wertheim

W**Waagen:**

Analysewaage
Feinwaage
Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q Plus

Sartorius, Leichlingen
Sartorius, Leichlingen
Millipore, Bedford, PA, USA

Wasserbäder:

Julabo 13A
Julabo F10

Julabo, Seelbach
Julabo, Seelbach

Western Blot-Apparatur:

Novablot Electrophoretic Transfer Kit

LKB/Pharmacia, Freiburg

Z**Zentrifugen:**

Centrifuge 5415 C

Eppendorf, Hamburg

EBA 12 R
Mikrozentrifuge Hf-120 Capsule
Variofuge 20 RS, 3.0 RS

Hettich, Tuttingen
Qualitron, Korea
Heraeus, Düsseldorf

6.1.6 Molekulargewichts- und Längenstandards

Prestained SDS-PAGE Molecular Weight Marker(Broad Range)
Wilna, Litauen
SDS *Molecular Weight Marker* (Broad Range)
GeneRuler™ DNA Ladder Mix
MassRuler™ DNA Ladder Mix
Gene Ruler™ 50bp DNA Ladder

MBI Fermentas,
MBI Fermentas
MBI Fermentas
MBI Fermentas
MBI Fermentas

6.1.7 Nucleinsäuren

6.1.7.1 Plasmidvektoren

pAcG2T
pAcSG2
pCis2-IRS-1
pET-21a(+)
IRS1-PTB-pGex-His-3TS
pUc19-LIRK_{Δ72C/Mut}

PharminGen, San Diego
PharminGen, San Diego
Quon *et al.* 1994
Novagene, San Diego
Gebauer, 2003
Wieber, 1998

6.1.7.2 Oligonucleotide

In Tabelle 6.1 sind alle in dieser Arbeit Verwendeten Ausgangsvektoren (Template), sowie die verwendeten Primer zusammen gefasst. Desweiteren enthält die Tabelle Informationen über eingefügte Restriktionsschnittstellen, sowie der verwendeten Zielvektoren, und den Namen der Konstrukte nach weiteren molekularbiologischen Arbeitsschritten.

| Template (100ng) | Primer 1 (125ng) | Primer 2 (125ng) | Zielvektor | Schnittstellen | Produkt nach weiterer Klonierung |
|---------------------------------|-------------------|------------------------------|------------|----------------|------------------------------------|
| IRS1-PTB-pGEX3X-HTS | BamHI removal Fw | BamHI removal Rev | -/- | -/- | IRS1-PTB-pGEX3X -HTS-ΔBamHI |
| IRS1-PTB-pGEX3X-HTS-ΔBamHI | BamHI New Fw | BamHI New Rev | -/- | -/- | IRS1-PTB-pGEX3X -HTS-BamHI New |
| pCis2-IRS1 | IRS1-PTB-5'-EcoRI | IRS1-PTB-3'-XhoI | pEt21a(+) | EcoRI/XhoI | PTB ₂₆₃ -His6-pEt21a(+) |
| pCis2-IRS1 | IRS1-PTB-5'-EcoRI | IRS1-PTB-3'-XhoI-full length | pEt21a(+) | EcoRI/XhoI | PTB ₂₇₅ -His6-pEt21a(+) |
| pUc IRKD _{Δ72C} Mut | GST-LIRK-Bam | GST-LIRK-Eco | pAc-G2T | BamHI/EcoRI | pAc-LIRK _{Δ72C} Mut |

Primer für die Entfernung einer BamHI-Schnittstelle durch Site-directed-Mutagenesis-PCR

IRS1-PTB-pGEX-3X-3TS-BamHI-removal (forward)

5'- ATT TTC AGG GTA TCC CCG CAT TCA AAG AGG TCT GGC -3'

IRS1-PTB-pGEX-3X-3TS-BamHI-removal (reverse)

5'- CCT CTT TGA ATG CGG GGA TAC CCT GAA AAT AAA G -3'

Primer für die Generierung einer neuen BamHI-Schnittstelle durch Site-directed-Mutagenesis-PCR

IRS1-PTB-pGEX-3X-3TS-BamHI-new (forward)

5'- GTC CTC GTG GAT CCA GAA TTC ATC GTG ACT CAG TG -3'

IRS1-PTB-pGEX-3X-3TS-BamHI-new (reverse)

5'- CAG TCA CGA TGA ATT CTG GAT CCA CGA GGA CTG GCT C -3'

Primer für die Amplifikation der PTB₂₆₃ (AS156-AS263) aus pCis2-IRS1

IRS1-PTB-5' EcoRI (für His-Tag)

5'- CCG GAA TTC CCC GCA TTC AAA GAG GTC TGG CAA -3'

IRS1-PTB-3' XhoI (für His-Tag)

5'- CCG CTC GAG CTC ATC ACT CAT GGC CCG CAT -3'

Primer für die Amplifikation der PTB₂₇₅ (AS156-AS275) aus pCis2-IRS1

IRS1-PTB-5' EcoRI (für His-Tag)

5'- CCG GAA TTC CCC GCA TTC AAA GAG GTC TGG CAA -3'

IRS1-PTB-3' XhoI full length (für His-Tag)

5'- GGC GAG CTC GAG GTT GGA CGA GGA CTG GCT CTT -3'

Primer für die Amplifikation der LIRK_{Mut} aus pUc19-LIRK

GST-LRK-Bam (für GST-Kinase)

5'- GGG ATC CTA TAG GAT CCA GAA AGA GGC AGC -3'

GST-LIRK-Eco (für GST-Kinase)

5'- CGC CAC GGT AGG AAT TCT TAG GAA GGA TTG -3'

6.1.8 Proteine

Antikörper:

α -GST Rabbit 095880

Lehr (1995)

α -Rabbit IgG-Alkalische Phosphatase (AP)

Boehringer, Mannheim

DNA-modifizierende Enzyme und zugehörige Puffer:

PNK

MBI Fermentas,
Wilna, Litauen

| | |
|----------------------------|----------------------------------|
| Puffer A | MBI Fermentas, Wilna, Litauen |
| SAP | Boehringer, Mannheim |
| SAP-Puffer | Boehringer, Mannheim |
| T4-DNA-Ligase | Boehringer, Mannheim |
| T4-DNA-Ligase-Puffer | Boehringer, Mannheim |
| <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase | Promega, Mannheim |
| Cloned <i>Pfu</i> Buffer | Promega, Mannheim |

Restriktionsenzyme und zugehörige Puffer:

| | |
|---|----------------------------------|
| <i>Bam</i> HI | Boehringer, Mannheim |
| <i>Eco</i> RI | Boehringer, Mannheim |
| <i>Xho</i> I | Boehringer, Mannheim |
| <i>Xma</i> I | Boehringer, Mannheim |
| <i>Pst</i> I | Boehringer, Mannheim |
| Puffer B | Boehringer, Mannheim |
| Puffer H | Boehringer, Mannheim |
| Y ⁺ /Tango Buffer | MBI Fermentas, Wilna, Litauen |
| Rinderserumalbumin (BSA) | Serva, Heidelberg |
| Rinderserumalbumin (BSA), Fraction V, <i>pure</i> (Protease- und Phosphatase-frei) | Serva, Heidelberg |
| Aldolase | Pharmacia, Schweden |

6.1.9 Puffer und Lösungen

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

Ampicillin (1000x):

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

ATP-Stocklösung:

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

Blockierungspuffer:

1% (w/v) BSA in PBS (0,5 g BSA, 50 ml 1x PBS, 0.04 ml NaN₃ (nur, wenn der Puffer mehrfach verwendet werden soll)
alternativ: 5 % (w/v) Milchpuffer in PBS

Bradford-Färbereagenz:

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

DC-Laufpuffer:

25% (w/v) Ammoniumhydroxid, 2,19 Teile Ethanol

Destain:

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

DNA-Probenpuffer(10X):

67 % (w/v) Saccharose; 0,4 % (w/v) Bromphenolblau bzw. Xylencyanol FF.
Der Puffer kann mit Wasser (MANNIATIS et al., 1975) oder mit TE-Puffer angesetzt werden

EDTA-Lösung:

0,5 M EDTA/ NaOH, pH 7,5

Elutionspuffer:

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

10 mM red. L-Glutathion (GSH); 50 mM TRIS/ HCl, pH 8,0)

Ethidiumbromid-Lösung:

5,25 mg/ml Ethidiumbromid

FPLC-Puffer für Anionenaustauschchromatographie (IEX):

Die Puffer müssen vor Gebrauch sterilfiltriert und entgast werden.

- **IEX A (Äquilibrierung, Waschen):**
2 mM TCEP; 50 mM TRIS/ HCl; pH 7,5
- **IEX B (Elution):**
1 M NaCl; 50 mM TRIS/ HCl; pH 7,5

Gelfiltrationspuffer für Gelfiltrations-Chromatographie:

Der Puffer muß vor Gebrauch sterilfiltriert und entgast werden.

150mM NaCl; 2mM TCEP; 50mM TRIS/HCl, pH 7,5

Kolloidale Peptid-Färbelösung:

0,8 g Coomassie Brilliant Blue G250 in 400 ml MQ unter Rühren lösen, 400 ml 1 M H_2SO_4 (= 21,3 ml 95 % H_2SO_4 ; $M_r = 98,08$; $D = 1,82 \text{ g/cm}^3$) zugeben, 3 h rühren, über Faltenfilter filtrieren, 88 ml 10 M KOH zugeben, 124 ml 100 % (w/v) TCA hinzufügen.

Kulturmedium:

Grace's Insektenmedium, 10% FCS
Fungizone (Endkonzentration: 2,5 µg/ml)

Gentamycin, steril filtriert (Endkonzentration: 50 µg/ml)**Leupeptin-Stammlösung (1000X):**

10 mg/ml Leupeptin

Lysispuffer für Kinasen ohne GST:

250mM Saccharose; 2mM TCEP; 1 Complete Tablette/50ml Lysispuffer; 20mM TRIS/HCl; pH 7,5

Nativer Laufpuffer:

50 mM Tris/HCl (pH 8.3); 384 mM Glycin

Nativer Probenpuffer (5x):

250 mM EDTA pH 7,5, 100mM DTT, 15% Saccharose, 50 mM TRIS/HCl pH 7.5, 0,5% Bromphenolblau

Natriumacetat-Lösung:

3 M NaOAc/AcOH, pH 5,2

PBS-Puffer:

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

Phosphorylierungs-Puffer (10X), Standardbedingungen:

500 mM Mg²⁺; 500mM Mn²⁺; 50 mM DTT; in 0,5 M TRIS/ HCl pH 7,5

PMSF-Stammlösung (100X):

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

Regenerationspuffer 1:

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

Regenerationspuffer 2:

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

SDS-Laufpuffer (1X):

0,1 % (w/v) SDS; 384 mM Glycin; 50 mM TRIS/ HCl, pH 8,3

SDS-Probenpuffer (10X):

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

SOC-Medium :

2 % (w/v) Bacto Trypsine; 0,5 % (w/v) Bacto Yeast Extract; 10 mM NaCl₂; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM Glucose

Spot-Test-Färbelösung:

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

Spot-Test-Entfärbelösung:

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

TBE-Puffer (10X):

0,89 M TRIS; 0,89 M Borsäure; 20 mM EDTA

TBS-Puffer:

150 mM NaCl; 0,05 % (v/v) Tween-20 (fakultativ); 100 mM Tris/ HCl, pH 7,5

TBS/Tween:

0.1 % Tween 20 in TBS (150 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl, pH 7.5); immer frisch ansetzen

TE-Puffer:

1mM EDTA; 10 mM TRIS/ HCl pH 8,0

TNES-Puffer:

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

TE-RNase-Puffer:

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

TRIS-Puffer (1)

50 mM TRIS/ HCl, pH 7,5

TRIS-Puffer (2, Sammelgel):

0,5 M TRIS/ HCl, pH 6,8

TRIS-Puffer (3, Trenngel):

3 M TRIS/ HCl, pH 8,8

Western Blot Blot-Puffer (5x):

50 mM Tris, 40 mM Glycin

Western Blot Entwicklungspuffer:

100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 100 mM TRIS/ HCl, pH 9,5

Wet Blot Puffer:

192 mM Glycin; 25 mM TRIS/ HCl; 20% Methanol; 0,02% SDS

6.1.10 Verbrauchsmaterial

C

Centrikon®-Mikrokonzentratoren
Centrikon CentrX UF2 (10/ 30 kDa)

Complete Protease Inhibitor Tabletten

Millipore, Bedford, USA
Schleicher & Schuell, Bioscience
GmbH, Dassel
Roche Diagnostics, Penzberg

F

Filtermaterial

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

Microgon, California, USA
Millipore, Bedford, USA
Millipore, Bedford, USA

Filterpapier

Munktell Grade 1F
Whatman 3T

LKB, Pharmacia, Freiburg
Whatman, Maidstone, GB

K

Quarzküvetten
Typ 105.200-QS
Schichtdicke 10 mm
Zentrum 8,5 mm

Hellma, Mannheim

P

PVDF-Membran Immobilon P

Millipore, Bedford, PA, USA

6.2 Methoden

6.2.1 Molekularbiologische Methoden

6.2.1.1 Bakterienkulturen

6.2.1.1.1 *Bakterienkulturen zur Plasmidpräparation*

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

Die Kultivierung erfolgte in LB-Suspensionskultur und auf LB-Agar-Platten nach Herstellerangaben. Durch Transformation mit pGex/pET-Vektoren erwerben die Bakterien eine Antibiotikaresistenz für Ampillicin, auf Grund derer sie, nach Zugabe von Ampicillin (50 $\mu\text{g/ml}$) zum LB-Medium, selektiert werden können.

Isolierte Klone nach der Transformation (s. 7.1.3) wurden in 5 ml-Übernachtskulturen (ÜNK), bei 37°C unter Schütteln (180-220 rpm) vermehrt. Größere Kulturen für die Plasmidvermehrung (100 ml) werden mit 1 ml dieser ÜNK angeimpft. Kulturen und Agarplatten sind bei 4°C vier Wochen haltbar und vermehrungsfähig.

6.2.1.1.2 *Anlegen von Glycerolstocks*

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

6.2.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien

6.2.1.2.1 *Herstellung kompetenter Bakterien mittels Zugabe von Detergenz und organischem Lösungsmittel*

6.2.1.2.1.1 *Chemisch kompetente Bakterien*

Bakterien nehmen DNA nur unter gewissen Voraussetzungen gut auf. Zellwand und Plasmamembran der Bakterien müssen permeabilisiert werden, um eine effektive Aufnahme von DNA in die Zellen zu gewährleisten. In der logarithmischen Wachstumsphase ist das Einschleusen der DNA besonders effektiv, wobei zirkuläre DNA um den Faktor 100 bis 1000 besser aufgenommen wird als lineare. Durch die Zugabe eines milden Detergenz (PEG 8000) in Kombination mit einem organischem Lösungsmittel (DMSO) wird zusätzlich die Permeabilität der bakteriellen Zellmembran erhöht. Ein kurzer Hitzeschock unterstützt diesen Vorgang.

-
- 5 ml LB-Amp⁺-Medium wird mit Bakterien aus einem Glycerolstock angeimpft. Die Kultur wird über Nacht bei 37°C/ 220 rpm inkubiert.
 - Aliquots (100 µl, 500 µl, 1 ml) der Kultur werden in 100 mm Ø Petrischalen auf LB-Amp⁺-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.
 - Eine Bakterienkolonie wird am nächsten Tag in 5 ml LB-Amp⁻-Medium überführt. Diese Startkultur wird für 5 h bei 37°C/ 220 rpm inkubiert.
 - Mit 1 ml der Startkultur werden 100 ml LB-Amp⁻-Medium angeimpft; Inkubation über Nacht bei 37°C/ 180 rpm.
 - Am nächsten Tag werden mit 1 ml der ÜNK 100 ml LB-Amp⁻-Medium angeimpft. Die Kultur wird bei 37°C/ 180 rpm inkubiert, bis eine Absorption $A_{600\text{ nm}}$ von 0,5 erreicht wird (nach ca. 2-3 h).
 - Inkubation der Bakteriensuspension für 20 min auf Eis.
 - Zentrifugation der Bakteriensuspension für 5 min bei 4°C/ 1200 x g
 - Resuspension des Bakteriensediments in 10 ml kalter TSS-Lösung. Aliquots (100 µl) der kompetenten Bakterien werden nach Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff bei -80°C aufbewahrt, und bleiben 2 Monate transformierbar.

6.2.1.2.1.2 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

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

- 500 ml LB-Amp⁻-Medium werden mit 5 ml einer ÜNK angeimpft und bei 37°C/ 180 rpm inkubiert, bis eine Absorption $A_{600\text{ nm}}$ von 0,5 erreicht wird.
- Inkubation der Bakteriensuspension für 20 min auf Eis.
- Zentrifugation der Bakteriensuspension für 15 min bei 4°C/ 4000 x g
- Bakteriensediment in 500 ml gekühlten, sterilen Wasser resuspendieren, kurz mischen. Zentrifugation der Bakteriensuspension für 15 min bei 4°C/ 4000 x g.
- Bakteriensediment in 250 ml gekühlten, sterilen Wasser resuspendieren, kurz mischen. Zentrifugation der Bakteriensuspension für 15 min bei 4°C/ 4000 x g.
- Bakteriensediment in 10 ml sterilen 10 % (v/v) Glycerin resuspendieren, kurz mischen. Zentrifugation der Bakteriensuspension für 15 min bei 4°C/ 4000 x g.
- Bakteriensediment in 1,5 ml sterilen 10 % (v/v) Glycerin resuspendieren, kurz mischen. Aliquots (50 µl) der kompetenten Bakterien werden nach Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff (entfällt bei BL21 Zellen) bei -80°C aufbewahrt, und bleiben 2 Monate transformierbar.

6.2.1.3 Transformation kompetenter Bakterien

6.2.1.3.1 Transformation chemisch kompetenter Bakterien durch Hitzeschock

- Aliquot von 100 µl chemisch kompetenten Bakterien auf Eis auftauen
- Zugabe von 1 - 5 µl der zu transformierenden DNA-Lösung
- Inkubation für 20 min auf Eis

-
- Hitzeschock für 1 min bei 42°C im Wasserbad
 - Inkubation für 2 min auf Eis
 - Zugabe von 1 ml LB-Amp^r-Medium und Inkubation für 1 h bei 37°C/220 rpm
 - Aliquots von 100 µl bzw. von einer Ligation 300 µl auf LB-Amp^r-Agar in 100 mm Ø Petrischalen ausstreichen und über Nacht bei 37°C inkubieren.

Die Transformationsrate liegt, für frische, kompetente Bakterien und einem Standard-Plasmid, bei mehr als 10⁶ Kolonien pro µg DNA.

6.2.1.3.2 Transformation elektrokompeter Bakterien durch Elektroporation

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

- 1 µl (dialysiert bis zu 5 µl) der zu transformierenden 1-10 ng/ µl DNA-Lösung wird zu 50 µl sterilem MQ gegeben. Die verdünnte DNA-Lösung wird in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt.
- Ein 40 µl Aliquot elektrokompeter Bakterien wird auf Eis aufgetaut und zu der DNA-Lösung in der Elektroporationsküvette gegeben.
- Die von außen völlig trockene Elektroporationsküvette wird in den Elektroporator gestellt; die Elektroporation erfolgt durch Entladung der an dem Kondensator der Elektroporationsküvette angelegten Spannung (1700V).
- Schnelle Zugabe von 1 ml SOC-Medium. Die Bakteriensuspension wird in ein geeignetes Gefäß (Falconröhrchen 15 ml) umgefüllt und 1 h bei 37°C/ 220 rpm inkubiert.
- Aliquots von 300 µl werden in 100 mm Ø Petrischalen auf LB-Amp^r-Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

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

6.2.1.4 DNA-Reinigung, Konzentrationsbestimmung und Anreicherung

6.2.1.4.1 Plasmid-Minipräparation

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

- 1,5 ml Aliquot der Übernachtskultur in ein Reaktionsgefäß überführen
- Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei 10.000 x g für 1 min
- Überstand verwerfen (bis auf ca. 50-100 µl), das Pellet resuspendieren, Zugabe von 300 µl frisch angesetztem TNES-Puffer und 4x invertieren
- Zugabe von 150 µl 3M NaOAc (pH 5), erneut 4x invertieren
- Zentrifugation der Suspension für 10 min bei max. Drehzahl (14.000 rpm), Überstand in neues Reaktionsgefäß transferieren, Pellet verwerfen
- Zum Überstand 900 µl 100% EtOH dazugeben
- Zentrifugation für 15 min bei max. Drehzahl
- Überstand verwerfen
- Zugabe von 750 µl 70% EtOH und Zentrifugation für 5 min bei max. Drehzahl
- Überstand verwerfen und Pellet in 50 µl TE-Puffer oder sterilem MQ mit RNase aufnehmen

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

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

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

6.2.1.4.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

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

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

$$c(\text{DNA}) [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = (A_{260\text{ nm}} * \text{Verdünnungsfaktor} * 50 \mu\text{g} (33 \mu\text{g})) / 1000 \mu\text{l}$$

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

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

6.2.1.4.4 Ethanolpräzipitation von DNA

Ist die Konzentration oder die Reinheit einer DNA-Lösung nicht ausreichend, so kann mittels Ethanolpräzipitation ein höherer Anreicherungsgrad erreicht werden.

- Zugabe von 1/10 des DNA-Lösungsvolumens an 3 M NaOAc, pH 5,2, kurz mischen
- Hinzugeben des 3-fachen des Gesamtvolumens an -20°C kaltem 100 % (v/v) Ethanol und Inkubation für 30 min. bei -20°C oder direkt 30 min. pelletieren bei 15.000 rpm 4°C
- Der Überstand wird mit einer Pipette abgehoben (und zur Sicherheit aufbewahrt), die DNA befindet sich im Sediment.
- Zugabe von 750 μl 70 % (v/v) Ethanol
- Zentrifugation in der Tischzentrifuge für 5 min bei 4°C / 15.000 rpm
- Der Überstand wird wieder vorsichtig mit einer Pipette abgehoben und aufbewahrt. Das Sediment wird im geöffneten Reaktionsgefäß an der Luft getrocknet.
- Resuspension des Sediments in gewünschtem Volumen TE-Puffer. Soll die Plasmid-DNA zur Transformation mittels Elektroporation verwendet werden, so sollte sie in MQ resuspendiert werden, um den Gehalt an Salzen niedrig zu halten.

Die Ausbeute an DNA beträgt etwa 80 %.

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

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

6.2.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Site-directed-Mutagenesis-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der schnellen Vervielfältigung kleinster Mengen DNA. Das Prinzip basiert auf der enzymatischen Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind. Voraussetzung ist demnach die Kenntnis der, den zu amplifizierenden DNA-Abschnittes

flankierenden, Nukleotidsequenzen. Die Oligonukleotidprimer werden im Überschuss zu einer DNA-Präparation gegeben. Nach thermischer Denaturierung der doppelsträngigen Ausgangs-DNA (96°C), paaren unter Hybridisierungsbedingungen (72°C) die Primer an die komplementären Sequenzen. Die DNA-Polymerase heftet Nukleotide an die 3'-OH-Primer-Enden und synthetisiert die restliche komplementäre Sequenz. Die entstandenen PCR-Synthese-Produkte werden bei 96°C denaturiert. Dann folgt eine neue Runde mit der Hybridisierung von Oligonukleotidprimern und DNA-Strang-Synthesen. Die Amplifikation der Zielsequenz gehorcht folgendem Zusammenhang:

$$N_K = (2^n - 2n)x;$$

mit N_K = Anzahl der Kopienzahl nach n Vervielfältigungszyklen

n = Anzahl der Vervielfältigungszyklen

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

x = Anzahl der Kopien der ursprünglichen DNA-Matrize

Die Anzahl der Kopien der Zielsequenz wird ab dem zweiten Zyklus exponentiell vermehrt. Die Anzahl der Zyklen – Denaturierung, Hybridisierung, Synthese – beträgt in der Regel 20-50, und wird der erwarteten Genauigkeit der Amplifikation angepasst.

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

Bei der *Site-directed-mutagenesis-PCR* handelt es sich um eine Variation der PCR. Mit Hilfe der Primer wird nicht ein DNA-Fragment bestimmter Größe aus einem Template amplifiziert, sondern Modifikationen im Vektor selbst vorgenommen. Hierdurch lassen sich stille Mutationen einfügen, die Schnittstellen für bestimmte Restriktionsenzyme entfernen oder erst generieren. Ein weiterer Aspekt liegt in der Möglichkeit auf DNA-Ebene einzelne Aminosäuren beliebig zu ersetzen.

Die Technik beruht darauf, dass sowohl der Up-Primer als auch der Down-Primer eine Punktmutation tragen und sich an der selben Position im Vektor anlagern. Durch die PCR wird der gesamte Vektor amplifiziert. Das PCR-Produkt unterscheidet sich vom Template nur durch die Mutation an dieser Position, sowie durch den Methylierungsgrad. Die Parentale DNA, sowie Heterodimere aus PCR-Produkt und Parentaler-DNA werden durch die Restriktionsendonuklease *DpnI* abgebaut.

6.2.1.5.1 PCR Ansatz und Zyklen

Ansatz:

Für die PCR wurde das jeweilige Template mit den aus Tabelle 6.1 zu entnehmenden Primern eingesetzt

100 ng Template

125 ng Primer 1

125 ng Primer 2

5 µl 10X Cloned *Pfu* Buffer
 1 µl PCR-Nucleotidmix (dNTP) (10 mM each)
 1 µl *Pfu*-Polymerase
 add 50µl mit MQ

Amplifikationsprogramm (Cycler-Programm):

| | | |
|------|---------|-----------|
| 95°C | 30sec | |
| 95°C | 30sec | ← X 12-24 |
| 55°C | 60 sec | |
| 68°C | 330 sec | |
| 4°C | ∞ | |

6.2.1.5.2 Sequenzierung

Die Proben wurden durch das ZMMK-ServiceLabor sequenziert. Die Sequenzierung erfolgt auf einem ABI PRISM 377 DNA Sequencer der Firma Applied Biosystems mit der *Taq* FS *BigDye-terminator cycle sequencing* Methode.

6.2.1.6 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die von einem Bakterium aufgenommene artfremde DNA abbauen, indem sie zumeist palindromische Nukleotidsequenzen erkennen, und dort den DNA-Strang schneiden. Die Restriktion eigener DNA wird vermieden, indem diese an den entsprechenden Erkennungssequenzen methyliert wird. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit benutzten Restriktionsenzyme sind *Bam*HI (aus *Bacillus amyloliquefaciens*), *Eco*RI (aus *Escherichia coli*) und *Pst*I (aus *Providencia stuartii*); diese Endonukleasen liefern am 5'-Ende überstehende Restriktionsprodukte (*sticky ends*). Die Restriktion wurde zur Überprüfung der PCR-Reaktion und der Kontrolle, der durch Mini-Präparation gewonnenen DNA benutzt. Die Restriktionsansätze werden für 1 h bei 37°C inkubiert. Das Ergebnis der Restriktion wird mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

6.2.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Mittels Agarose-Gelelektrophorese können Gemische von DNA-Molekülen in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden; DNA-Moleküle bewegen sich aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatreste in Richtung der Anode. Die elektrophoretische Mobilität eines DNA-Moleküls bei gegebener Feldstärke, Geldichte und Laufpufferzusammensetzung ist abhängig von seiner Länge, die proportional zu seiner Ladung ist, und bei Plasmiden zudem vom Grad der Superspiralisierung. Durch Zugabe von Ethidiumbromid, das zwischen die Basenpaare der DNA interkaliert, kann die DNA unter UV-Licht durch die Fluoreszenzstrahlung (590 nm) des Ethidiumbromid-DNA-Komplexes identifiziert werden.

Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 10 ng DNA pro Bande. Durch variieren der Konzentration der Agarosegele werden DNA-Moleküle verschiedener Größenbereiche wie folgt aufgetrennt (Tab. 7.1):

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

Tab. 7.1: Trennbereich von Agarosegelen in Abhängigkeit von ihrer Konzentration

Agarosegel gießen:

- entsprechende Menge Agarose in TBE-Puffer aufkochen, auf ca. 60°C abkühlen lassen
- Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 0,3 µg/ml zugeben
- Kamm einsetzen, Gel gießen, erstarren lassen
- Gel in die mit TBE-Puffer gefüllte Gelkammer legen
- Proben (mit 10x DNA-Probenpuffer versetzt) auftragen
- Das Gel bei 100 V ca. eine halbe Stunde laufen lassen

6.2.1.8 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA erfolgt mit dem QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit von Qiagen. Dieses Protokoll ist geeignet für Extraktionen von 40 bp bis zu 50 kbp DNA-Fragmenten aus einem 0,3 – 2 % Agarosegel.

- Die DNA-Bande wird aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Die Gelbande darf nicht schwerer als 250 mg sein.
- Zu der ausgeschnittenen Gelbande werden gemäß den Angaben Puffer QX1 und evtl. MQ hinzugegeben
- QIAEX II durch vortexen für 30 sec. resuspendieren und gemäß den Angaben die jeweilige Menge an QIAEX II hinzugeben und das Reaktionsgefäß mit darin enthaltenen DNA für 10 min. bei 50°C inkubieren: alle 2 min mischen um QIAEX II in Suspension zu halten
- Reaktionsgefäß für 30 sec. zentrifugieren und den Überstand vorsichtig entfernen
- Pellet in 500 µl Puffer QX1 resuspendieren und erneut zentrifugieren für 30 sec.
- Pellet zweimal in 500 µl Puffer PE resuspendieren und zentrifugieren für 30 sec.
- Pellet für 10 – 15 min. lufttrocknen bis Pellet weiß wird
- Zur Elution der DNA 20 µl 10mM TRIS/ HCl pH 8.5 oder MQ hinzugeben und Pellet resuspendieren und gemäß den Angaben inkubieren

-
- Reaktionsgefäß für 30 sec. zentrifugieren und den Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen
 - Optional: die letzten beiden Schritte wiederholen und Überstände vereinigen

6.2.2 Baculovirusexpressionssystem

6.2.2.1 Allgemeines

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

Die 130 kbp große DNA ist in einer stabförmigen Proteinhülle verpackt, die zusätzlich mit einer Lipidmembran umgeben ist; bis zu 100 solcher Partikel bilden, in einer aus Polyhedrin bestehenden Proteinhülle das Dauerstadium des Virus (Einschlusskörper; occlusion body). Die Einschlusskörper werden vom Wirt oral aufgenommen und gelangen so in den Verdauungstrakt des Insektes. Dort wird die Polyhedrinhülle abgebaut und die infektiösen Viruspartikel verschmelzen, nach der Passage der peritrophischen Membran, mit der Zellmembran ihre Wirtszellen. Die hier freigesetzte DNA wandert in den Zellkern und wird nach etwa sechs Stunden (post infection; p.I) repliziert und transkribiert. In der frühen Phase (10h p.I.) verlassen vornehmlich die stäbchenförmigen Partikel durch Knospung die Zelle und infizieren Zellen in ihrer Umgebung; die ersten Einschlusskörper sind nach 48 Stunden p.I. detektierbar. Die Lyse der Zellen setzt nach 72 Stunden ein.

Das Polyhedrin ist im Lebenszyklus für das Virus ein sehr wichtiges Protein, unter Zellkulturbedingungen ist es aber nicht notwendig. Ein unter Kontrolle des Polyhedrinpromotors in das virale Genom eingeschleuste Gen kann in hohen Konzentrationen in den Insektenzellen expremiert und gereinigt werden. (1g/ 10⁹ Zellen). Ein weiterer Vorteil dieses Expressionssystems ist sein eukaryotischer Ursprung. Viele posttranslationalen Modifikationen wie Faltung, Disulfidbrücken und Glykolysierungen werden von den Insektenzellen korrekt ausgeführt, so dass die gereinigten Proteine auch ihre volle biologische Funktion erhalten.

Das einbringen von Fremd-DNA in die Virus-DNA gelingt durch die homologe Rekombination eines die DNA enthaltenen speziellen Transfervektors mit linearisierter AcNPV-DNA (s. 7.2.3). Isolierte Viren werden dann sukzessive vermehrt und für die Infektion großer Insektenkulturen verwendet (s. 7.2.5). Die Reinigung des expremierten Proteins erfolgt nach der Lyse der Zellen mit chromatographischen Verfahren (s. 7.3).

6.2.2.2 *Sf9*-Zellkultur

Die *Sf9*-Zelllinie stammt aus dem Mitteldarmgewebe von *Spodoptera frugiperda*. Nicht infizierte Zellen sind in ihrem äußeren Erscheinungsbild gleichmäßig rund und verdoppeln sich etwa alle 18 bis

24 Stunden bei 27°C. Sie können entweder in Suspensionskultur in einer Spinnerflasche oder als „Monolayer“-Kultur in Gewebeschalen gehalten werden. Neben einer auf ihre Bedürfnisse abgestimmten Nährlösung enthält das Kulturmedium fötales Kälberserum, welches den entsprechenden Wachstumsfaktor liefert, als auch Gentamycin und Fungizone mit antibakteriellen und antifungizider Wirkung. Die Zellzahl sollte zwischen 1×10^6 Zellen pro Milliliter Medium betragen. Die Vitalität der Zellen (Lebendzellzahl) wird durch Anfärbung der Zellen mit Trypanblau bestimmt, welches tote Zellen blau anfärbt.

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

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

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

In einer 25cm² Kulturflasche werden 1×10^6 Zellen in 2 oder 3 ml Medium vorgelegt und für 15 Minuten zur Adsorption stehen gelassen. Während dieser Zeit pipettiert man 1 µg der mittels Midi-Prep gewonnen und gereinigten Transfervektor-DNA zu 0,25 µg Virus-DNA in einem sterilen Reaktionsgefäß, mischt dieses und lässt es bei Raumtemperatur ca. 5 min stehen. Nach der Adsorptionszeit wird das Medium aus der Kulturflasche abgesaugt und 0,5 ml Transfektionspuffer A gleichmäßig auf die Zellen gegeben und die Flasche geschwenkt. Nachfolgend gibt man 0,5 ml Transfektionspuffer B zu dem Virus-Transfervektor-DNA-Gemisch und gibt diese Lösung auf die Zellen, wobei nach der Zugabe von je 2 Tropfen die Schale bewegt wird um sie mit dem Puffer A zu mischen. Das im Puffer B enthaltenen CaCl₂ bewirkt die Aufnahme der DNA in die Zellen. Die Zellen werden unter stündlichem Bewegen der Schale im Brutschrank für 4h bei 27°C inkubiert. Danach wird das Transfektionsgemisch abgesaugt und durch 2,5 ml frisches Kulturmedium ersetzt.

Der Überstand wird nach fünf Tagen abgenommen, durch frische 2,5 ml Kulturmedium ersetzt und weitere zwei Tage im Brutschrank inkubiert. Der abgenommene Überstand wird bei 2300 rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Dasselbe wird mit dem frischen Kulturmedium zwei Tage später auch gemacht. Rekombinante Viren werden anschließend durch einen Plaque Assay (6.2.2.4) isoliert und rekombinante Klone durch immunologischen Nachweis des exprimierten Proteins (6.2.6.6) identifiziert.

6.2.2.4 Plaque Assay

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

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

Durch Auszählen der Plaques in einer bestimmten Verdünnung kann auf den Virus-Titer zurückgeschlossen werden. Zur Identifizierung einzelner rekombinanter Klone wird die Position eines isolierten Plaques markiert und die über ihm befindliche Agaroseschicht, die durch die Lyse freigesetzten Virenpartikel enthält, mit einer Pasteurpipette ausgestochen und abgesaugt. Das isolierte Stück Agarose wird in ein Falconröhrchen mit 1 ml Kulturmedium überführt. Von dieser Suspension wird eine 25cm² Kulturflasche mit 1×10^6 Zellen angeimpft. Die Kultur sollte für drei Tage bei 27°C bis zur Ernte (6.2.2.6) inkubiert werden. Dadurch erhält man ein einzelnes Virus, welche in Kulturflaschen und Spinnerkulturen amplifiziert wird.

6.2.2.5 Infektion von Insektenzellen

Sf9-Zellen lassen sich in Kulturschalen oder in Suspensionskultur infizieren. Im ersten Fall geschieht das durch Zugabe von Virusüberstand (1 ml) zu 1×10^6 Zellen in einem Endvolumen von 5 ml. Die Zellen werden nach vier Tagen Inkubation bei 27°C geerntet (s. 6.2.2.6) und der Überstand gelagert. Im Falle der Suspensionskultur werden die Zellen einer sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen Kultur (1×10^6 Zellen/ ml, >98% Vitalität) aus der Spinnerflasche in Falconröhrchen überführt, bei 1800 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert und die Pellets in 1/10 des Endvolumens mit Medium/ Virusüberstand-Gemisch resuspendiert. Die resuspendierten Zellen gibt man zurück in die Spinnerflasche und inkubiert diese Suspensionslösung bei 27°C für eine Stunde, wobei die Suspensionslösung alle 15 min. geschüttelt wird. Anschließend wird mit frischem Medium auf das gewünschte Kulturvolumen aufgefüllt.

Die Menge an zugegebenem Virusüberstand richtet sich nach der MOI („multiplicity of infection“), der zu infizierten Zellzahl und den Titer der einzusetzenden Viruslösung. Die MOI beschreibt die Anzahl infektiöser Partikel („plaque forming units“; *pfu*) pro Zelle (*pfu/cell*). Ein „Low-Titer Stock“, der zur Infektion einer Spinnerflaschenkultur für eine Virusamplifikation dient, darf nur mit einer MOI von höchstens eins infiziert werden. Der Grund dafür liegt darin, dass jede Zelle höchstens von einem Virus infiziert wird, um die Möglichkeit einer Rekombination so gering wie möglich zu sein. Ein „Low-Titer Stock“ kann aus dem, im Plaque Assay gewonnenen Virusüberstand erhalten werden. Dazu infiziert man 1×10^6 Zellen in einer Kulturflasche mit 1 ml Überstand. Der hieraus gewonnene Überstand hat einen Titer von mindestens 10^7 *pfu/ml*. Mit der Hilfe der Formel

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

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

6.2.2.6 Ernte von Sf9-Zellen

Die Ernte von infizierten Sf9-Zellen aus der Kulturflasche erfolgt durch viermaliges Schlagen gegen jede Seitenwand, wodurch sich die Zellen vom Boden ablösen. Sie werden, genau so wie die Zellen einer Spinnerflaschenkultur, mit dem Medium in ein Falconröhrchen überführt und anschließend zentrifugiert bei 2300 rpm für 10 min bei RT. Das Zellpellet wird gelockert und in jeweils 40 ml eiskaltem PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

6.2.2.7 Expression der GST-LIRK $_{\Delta 72\text{C}}$ Mut

Proteinexpression:

- Zentrifugation von 200 ml Zellen ($1,5-1,6 \times 10^6/\text{ml}$) mit 1800 rpm für 10 min bei RT
- Pellets durch Aufrütteln lockern
- Pellets in Virusüberstand resuspendieren, MOI 5 - 10; Volumen: 20 ml
- Inkubation der Suspension in einem Spinner für 1 h im Brutschrank; alle 15 min. schwenken
- anschließend den Spinner mit Medium auf 200 ml auffüllen
- Inkubation für 48h im Brutschrank

Nach erfolgter Inkubation bestimmt man die Zellzahl und Anteil der toten Zellen im Spinner und behandelt die Zellen wie folgt beschrieben weiter. Die Zellen werden dann für die Aufarbeitung und Reinigung des Proteins nach folgenden Schritten lysiert.

Lyse:

- Pellets in 10 ml Lysisbuffer mit Complete Protease Inhibitor/ 10^8 Zellen resuspendieren
- Im Glas/Teflonpotter 10 x pottern
- 5 x 5 sec sonifizieren (auf Eis)
- Zentrifugation mit 10.000 g für 10 min bei 4°C
- Überstand in Ultrazentrifugationsröhrchen überführen
- Ultrazentrifugation der Lysate mit 40.000 rpm für 45 min bei 4°C
- Vom Überstand evtl. ein Aliquot zur Elektrophorese entnehmen, restlichen Überstand in flüssigem Stickstoff schockgefrieren, bei -80°C lagern

6.2.3 Proteinexpression in *E.coli*

Die PTB-Varianten His-PTB₂₆₃ sowie His-PTB₂₇₅ wurden in für den pET-Vektor geeignete BL21-DE3 RIPL Zellen exprimiert, da diese ein Plasmid enthalten das für die in *E.coli* seltenen tRNA kodiert. Hierdurch wird es *E.coli* ermöglicht, eukariotische Gensequenzen mit seltenen Codonen zu exprimieren. Die PTB-Mutante GST-PTB_{Mut} wurde in *E.coli* DH5 α exprimiert.

- 100 ml-Kulturen in 900 ml LB+AMP Medium geben, im Schüttler bei 37°C und 180 rpm, halbstündlich Probe im Photometer überprüfen, bis OD₆₀₀ zwischen 0,44 und 0,6 liegt
- Zugabe von 100 μ l 1M IPTG, Endkonzentration 0,1 mM
- 3 h im Schüttler bei 37°C und 180 rpm
- Die 1 l-Kultur auf Zentrifugenbecher verteilen
- Zentrifugieren bei 3.500 rpm, 15 min, 4°C in zwei 500 ml-Zentrifugenbechern
- Überstand verwerfen, in je 20 ml PBS resuspendieren
- In kleine Zentrifugenröhrchen überführen
- Zentrifugieren bei 5.000 g, 15 min, 4°C
- Überstand verwerfen und direkt zu Punkt 11; alternativ in je 20 ml PBS resuspendieren
- In Falcons überführen
- In flüssigem Stickstoff schockgefrieren
- Über Nacht bei -70°C lagern
- Pellets auftauen und in 20 ml PBS (oder TBS) resuspendieren, in kleine Zentrifugenröhrchen überführen
- je 20 ml-Suspension wie folgt durchgehen:
- 200 μ l 100 \times PMSF hinzugeben
- 20 μ l 1M DTT (frisch ansetzen) dazugeben (Endkonzentration 1mM)
- 20 μ l 1000 \times Leupeptin
- 3 \times 5 Sekunden sonifizieren bei 70W (alternativ: 6 \times 5 Sekunden auch möglich, höhere Ausbeute an Protein!)
- je Triton-X-100 dazugeben, Endkonzentration 1% (z.B. 1 ml 20% Triton-X-100 auf 20 ml)

-
- resuspendieren
 - Zentrifugieren bei 10.000g, 15 min, 4°C
 - Überstand weiterverwenden

6.2.4 Chromatographische Darstellung

6.2.4.1 Glutathion-Sepharose Affinitätschromatographie

GST ist ein 26 kDa großes Protein aus dem Helminthen *Schistosoma japonicum*. Das Glutathion S-Transferase-Expressionsystem ist eine Methode, die es ermöglicht, auf DNA-Ebene das gewünschte Peptid an ein sehr gut charakterisiertes Protein, die Glutathion S-Transferase (GST) zu koppeln. Die in Fusionsproteine werden über Affinitätschromatographie gereinigt, wobei an Sepharose immobilisiertes Glutathion (γ -Glu-Cys-Gly) als Affinitätsmatrix verwendet, der Ligand der GST. Die auf diese Art gereinigten Proteine waren zum einen die Kinase GST-LIRK Δ 72C Mut, sowie das in *E.coli* expremierte GST-PTBMut

Herstellung der Affinitätssäule

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

Proteinreinigung

- Säule mit 3× Säulenvolumen an PBS äquilibrieren
- Proteinlösung (z.B. Überstand einer Zentrifugation) auf die Säule geben, je 50 μ l von Überstand und Durchlauf in Eppis auffangen
- Säule mit 5-10× Säulenvolumen 1M NaCl (in 50 mM Tris) waschen, 50 μ l Durchlauf in Eppi auffangen
- Säule mit 5-10× Säulenvolumen an PBS waschen, 50 μ l Durchlauf in Eppi auffangen
- Säule 4× mit 2× Säulenvolumen Elutionspuffer eluieren
- Säule 3× abwechselnd mit je 15 ml Regenerationspuffer 1 und Regenerationspuffer 2 regenerieren
- Säule in 20% Ethanol lagern
- Eluate bei -80°C einfrieren

- Eingeengtes Protein in 50 µl Aliquots in 0,5 ml Eppis füllen, in flüssigem Stickstoff schockgefrieren, bei -80°C lagern

6.2.4.2 Nickel-Chelat Affinitätschromatographie

Fusionsproteine mit poly-Histidin-Resten lassen sich leicht und schnell mit Hilfe der Ni-NTA-Affinitätschromatographie reinigen. Die Histidinreste können zweiwertige Kationen wie Ni^{2+} , Fe^{2+} und Cu^{2+} komplexieren. In der Ni-NTA-Chromatographie sind zweiwertige Ni-Ionen über vier ihrer sechs Bindungsstellen an NTA (Nitrilotriessigsäureacid), einem vierzähligen Liganden, der an der Agarose-Matrix gekoppelt ist, gebunden. Histidinreste der rekombinanten Proteine können an die beiden verbleibenden Bindungsstellen des Ni-Ions über ihre Imidazolringe binden, wodurch die Proteine an der Ni-NTA immobilisiert werden. Imidazol allein, eine Teilstruktur von Histidin, bindet ebenfalls an Ni-Ionen und kann zur Elution gebundener Proteine verwendet werden.

Bei einer Imidazolkonzentration von 100- 250 mM dissoziieren 6xHis-Proteine, da sie nicht länger mit Imidazol kompetieren können. Auch eine Reduktion des pH-Wertes lässt gebundene His-Tag-Proteine eluieren. Der Stickstoff des Imidazolringes von Histidin wird bei pH 4,5-5,3 protoniert, so dass ein positives Ammoniumion entsteht, das vom positiv geladenen Ni-Ion abgestoßen wird. Zur Verminderung der Bindung nicht getaggtter, Histidin-haltiger Backgroundproteine im Zelllysat sind geringe Imidazolkonzentrationen (10-20 mM) bereits für die Kopplung und Waschprozeduren empfehlenswert. Ebenso kann bei den Waschschrritten der pH-Wert bis auf pH 6,0 reduziert werden. Mit Hilfe der Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurden in dieser Arbeit sowohl die His-PTB₂₆₃ als auch die His-PTB₂₇₅ aufgetrennt.

- Zellen in Lysispuffer (50mM Tris/150mM NaCl/15mM Imidazol pH 8,0) nach Standardprotokoll lysieren
- Säulenmatrix mit 10 Säulenvolumen Lysispuffer (50mM Tris/150mM NaCl/15mM Imidazol pH 8,0) äquilibrieren
- Lysat mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min über die Säulenmatrix geben
- Matrix mit 15 Säulenvolumen Waschpuffer (50mM Tris/150mM NaCl/25mM Imidazol pH 8,0) bei einer Geschwindigkeit von 1ml/min waschen
- Elution mit 5x 2ml Elutionspuffer (50mM Tris/150mM NaCl/250mM Imidazol pH 8,0)
- Eluate durch Spotttest auf Proteingehalt testen
- Eluate einzeln in 10.000 Centrikon mit 50mM Tris pH 7,5 waschen und auf gewünschte Konzentration einstellen

6.2.4.3 Ionenaustauschchromatographie

Zur Aufreinigung der Kinasekonstrukte aus dem Lysat von Sf9-Zellen wird im ersten Reinigungsschritt eine Resource Q 1 ml Anionenaustauschersäule in einem FPLC (*Fast Performance Liquid Chromatography*) - System eingesetzt. Bei der Anionenaustauschchromatographie (IEX) besteht die Matrix der Säule aus substituierten quarternären Aminogruppen, an welche Proteine mit

einem Überschuss an negativen Ladungen binden. Durch Anlegen eines Salzgradienten werden die gebundenen Proteine entsprechend der Stärke ihrer Interaktion mit dem Säulenmaterial sukzessiv eluiert. Das Eluat wird über einen Fraktionssammler aufgefangen, die Identität der Proteine in den jeweiligen Fraktionen wird mittels SDS-PAGE und *Western Blot* bestimmt. Die Reinigung erfolgt bei 14°C, weil bei dieser Temperatur die maximale Trennschärfe der *Resource Q*-Säule erreicht wird.

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

6.2.4.4 ResourceQ 1 ml

Die *ResourceQ* 1 ml (Amersham Pharmacia Biotech) ist ein starker Anionenaustauscher. Die Säulenmatrix besteht aus monodispersen Polystyren und Divinylbenzen. Die Flussrate beträgt $\Phi = 2$ ml/min. Aufgetragen auf die Säule wurden 1 x 8 ml Lysat. Das Lysat wird im Eiswasserbad schonend aufgetaut, danach das Lysat auf 2 mM TCEP und 5% IEX B eingestellt. Unlösliche Bestandteile werden durch Zentrifugation für 10 min bei 5000 rpm und 4°C sedimentiert. Anschließend wird die Probe über einen 0,45 µm Luer-Filter filtriert und dann in die Probenschleife des Chromatographiesystems eingebracht. Nach Äquilibration der Säule mit 95 % (v/v) Puffer A / 5% (v/v) Puffer B (Flussrate 2 ml/min, für 2 ml) wird der Inhalt der Probenschleife in das Chromatographiesystem über eine 8 ml Probenschleife injiziert (Flussrate 2 ml/min).

Nach vollständiger Beladung der Säule wird mit 8 ml des Gemisches aus 95 % (v/v) Puffer A / 5% (v/v) Puffer B (isokratischer Fluss, Flussrate 2 ml/min) gewaschen, um nicht gebundene Proteine mit dem Durchfluss zu entfernen. Durch kontinuierliche Erhöhung des Anteils an Puffer B in der mobilen Phase (auf 30 % (v/v) innerhalb von 30 ml, Flussrate 2 ml/min), wird ein linearer Salzgradient angelegt. Dies führt zur Elution der Proteine von der Säule; das Elutionsprofil der an die Säule gebundenen Proteine wird durch photometrische Messung der Absorption A_{280} nm erstellt. Sind die Fraktionen (0,7 ml), die das gewünschte Protein enthalten, identifiziert worden, so können diese vereinigt werden. Zur vollständigen Freisetzung auf der Säule verbliebener Proteine wird der Anteil an Puffer B innerhalb von 3 min (Flussrate 2 ml/min) nach der Elution auf 100 % (v/v) gebracht; diese Pufferkonzentration wird bei einer Flussrate von 2 ml/min für mindestens 5 min beibehalten. Zur Aufbewahrung der Säule nach erfolgter Chromatographie wird diese mit MQ/ 0,02 % (w/v) NaN_3 entsalzt (Flussrate 2 ml/min, für mindestens 5 min) und in 20% Ethanol gelagert.

6.2.4.5 Gelfiltrationschromatographie Superdex 75 (prep Grade)

Das Trennprinzip einer Gelfiltrationschromatographie basiert auf dem Größenausschlussverfahren. Die Superdex 75 (HiLoad™ 26/60 prep Grade) (320 ml Säulenvolumen) trennt Proteine in einem Größenbereich von 3000-70000 Da. Der Trennbereich ist abhängig von der Zusammensetzung der

Gelmatrix, einem Dextran-Agarose-Gemisch. Vor dem Lauf muss die Säule ÜN mit 400 ml Superdex-Puffer (Flussrate $\Phi = 0,5$ ml/ min) äquilibriert werden. Die Beladung der Säule und die Reinigung erfolgt mit einer Flussrate von 0,5 ml/ min für 100 ml.

Kinasehaltige Fraktionen werden vereinigt und über einen Mikrokonzentratoren (Amicon Ultra-4) bei 5000 X g und 4°C konzentriert. Aliquots des Konzentrats (i.d.R. 0,5-2 mg/ ml Kinase) werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Säule wird anschließend mit 400 ml Superdex-Puffer gespült und danach auf 20% Ethanol gesetzt.

Reinigung:

- Auftauen der Eluate in Eiswasser
- Eluate mit 2 mM TCEP versetzen
- Unlösliche Bestandteile werden durch Zentrifugation für 10 min bei 5000 rpm 4°C sedimentiert.
- Eluate in 1 ml -, 8 ml Schleife oder in den Dynalooop füllen
- Beladen der Säule mit dem Eluat; $\Phi = 0,5$ ml/min
- Starten des isokratischen Flusses, $\Phi = 0,5$ ml/min
- Sammeln der Fraktionen (je 0,5ml) mit Hilfe des Fraktionssammlers (nach ca. 2 ½ h)
- Fraktionen des gewünschten Proteinpeaks vereinigen und bis zum weiteren Gebrauch bei 4°C lagern oder direkt über ein Centricon einengen

6.2.5 Konzentrierung der gereinigten Proteine mittels Ultrafiltration

- Konzentrationsbestimmung mittels Spotttest zur Bestimmung der Ausgangskonzentration
- Filter des Amicon Ultra-4 bzw. Amicon Ultra-15 10.000 NMWL mit 500µl 50 mM TRIS/HCl, pH 7.5 benetzen; Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C für ca. 10 min.
- überschüssigen Puffer entfernen
- Eluate zugeben und Zentrifugation bei 5000 rpm bei 4°C, alle 5min nachschauen, ob bis zum gewünschten Volumen eingeeengt ist (ca. 200 – 500µl)
- verbliebene Eluat vorsichtig auf- und abpipettieren, um Proteine vom Filter vollständig abzulösen und aliquotieren
- Spotttest zur Bestimmung der Proteinkonzentration durchführen
- Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefrieren und bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung lagern

6.2.6 Charakterisierung von Proteinkonzentration und -Identität

6.2.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach MINAMIDE und BAMBURG (1990)

1 µl der Proteinlösung, deren Konzentration zu bestimmen ist, sowie jeweils 1 µl von BSA-Lösungen einer Eichreihe (0,1-10 µg/µl) wird auf Munktell Grade 1F Filterpapier aufgetragen. Nachdem die Probe eingetrocknet ist, wird das Filterpapier für 30 s in *Spot-Test-Färbelösung* gelegt (s. 6.10), anschließend in *Destain* (s. 6.10) entfärbt, so dass keine unspezifische Hintergrundfärbung sichtbar bleibt. Höhere Konzentration der zu untersuchenden Proteinlösung resultiert in eine intensivere Blaufärbung an dem entsprechenden Auftragsort. Die Konzentration wird durch Vergleich mit den Farbintensitäten der Eichreihe abgeschätzt.

6.2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach BRADFORD (1976)

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

6.2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; LAEMMLI, 1970)

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

Die Zusammensetzung der im Rahmen dieser Arbeit benutzten Gele für SDS-PAGE ist Tab. 7.2 zu entnehmen. Der Trennbereich eines 12 %-igen Trenngels erstreckt sich von 14-200 kDa. Die Polymerisation der Gellösungen erfolgt durch Zugabe von 12,5 µl 40 % (w/v) APS und 10 µl TEMED im Fall für 10ml Sammelgels, bzw. 10,4 µl 40 % (w/v) APS und 4,4 µl TEMED im Fall für 10ml Trenngels.

| Trenngel (10 ml) | 10% | 12% |
|-------------------------|------|------|
| 30% Acrylamid (100:2,7) | 3,3 | 4,0 |
| 3M TRIS, pH 8,8 | 1,85 | 1,85 |
| 20% SDS | 0,05 | 0,05 |
| 60% D(+)-Saccharose | 1,15 | 1,15 |
| [MQ] | 3,65 | 2,95 |

| Sammelgel (10 ml) | 4% | 6% |
|-------------------------|------|------|
| 30% Acrylamid (100:2,7) | 1,2 | 2,0 |
| 3M TRIS, pH 8,8 | 2,5 | 2,5 |
| 20% SDS | 0,05 | 0,05 |
| [MQ] | 6,25 | 5,45 |

Tab. 7.2: Zusammensetzung der verwendeten Trenn- und Sammelgele

6.2.6.4 native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE)

Die nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE) ermöglicht die Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Größe und Ladung. Durch negative Ladungen erhöht sich die Laufstrecke des Proteins im Gel. Diese Methode erlaubt eine Trennung der verschiedenen Phosphorylierungsspezies von Kinasen. Die Phosphorylierungsansätze werden in 1x Probenpuffer (Quenching Buffer) aufgenommen, wodurch die Phosphorylierungsreaktion abgestoppt wird. Die Durchführung erfolgt ähnlich wie die SDS-PAGE. Unterschiede bestehen im Fehlen eines Detergenz wie SDS und die Elektrophorese wird im gekühlten System bei 4°C durchgeführt. Die Auftrennung erfolgt mit 150 mV (konstant) für ein Gel und mit 200 mV für zwei Gele. Nach erfolgter Trennung wird das Gel durch Peptidfärbelösung angefärbt.

| Natives Trenngel | | |
|--|---------|--------|
| 8,5% | 10 ml | 200 ml |
| 30% Acrylamid | 2,8 ml | 56 ml |
| 3M TRIS pH 8.8 | 1,85 ml | 37 ml |
| 60% Saccharose | 1,15 ml | 23 ml |
| MQ | 4,2 ml | 84 ml |
| 10 ml Trenngel; + 10,4 µl APS + 4,4 µl TEMED | | |

| 6.2.6.4.1 Natives Sammelgel | | |
|--|--------|--------|
| 5% | 10 ml | 200 ml |
| 30% Acrylamid | 1,6 ml | 33 ml |
| 0.5M TRIS pH 6.8 | 2,5 ml | 50 ml |
| MQ | 5,9 ml | 117 ml |
| 10 ml Sammelgel; + 12,5 µl APS + 10 µl TEMED | | |

Tab.7.3: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die native PAGE

6.2.6.5 Färbung von Proteinen in SDS-PAGE-Gelen und nativer Gelelektrophorese nach BLAKESLEY und BOEZI (1977)

SDS-PAGE-Gele (s. 7.5.3) und native PAGE (s. 7.5.4) werden über Nacht in kolleoidale Peptid-Färbelösung (s. 6.10) eingelegt, so werden die enthaltenen Proteine durch Coomassie-Blue G250 angefärbt. Durch Waschen des gefärbten Gels in Wasser wird unspezifisch in das Gel eingelagerter Farbstoff entfernt, so dass die Proteinbanden sich deutlich vom Hintergrund abheben. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 0,1 µg Protein pro Bande.

6.2.6.6 Immunologischer Nachweis von Proteinen durch *Western Blot*

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

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wird folgendermaßen vorgegangen:

- Die PVDF-Membran wird auf die Größe des Gels zugeschnitten und für 30 s in Methanol aktiviert. Anschließend wird sie kurz gewässert und in Blotpuffer (s. unten) getränkt.
- Auf die Anodenplatte des Blotapparates werden 12 in Blotpuffer getränkte Munktell-Filterpapiere als Pufferreservoir gelegt. Als nächstes wird die Membran und das Gel aufgelegt, und auf die Kathodenseite des Gels wird ein aus 12 in Blotpuffer getränkten Munktell-Filterpapieren bestehendes Pufferreservoir platziert.
- Blot mit 2 mA/ cm² für 15 min blotten (für ein Gel ~90mA)
- Nach dem Blot wird das Gel in kolleoidale Peptidfärbelösung eingelegt, um die Vollständigkeit des Blots abschätzen zu können. Die Membran wird anschließend für mindestens 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in 1% BSA/TBS + 0,02% NaN₃ inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen für den primären Antikörper abzublocken.
- Waschen der Membran für 30 min in 0,1 % (v/v) Tween-20/TBS (oft wechseln).
- Inkubation mit dem primären Antikörper in einer 1:1000 Verdünnung in 1% BSA/TBS für 1 h bei RT.
- Waschen der Membran mit 0,1% Tween-20/TBS für 5 X 5 min.
- Inkubation mit sekundärem Antikörper in einer 1:3000 Verdünnung in 1% BSA/ TBS für 1 h bei RT.
- Waschen der Membran mit 0,1% Tween-20/TBS für 5X 5 min.

-
- Für die Entwicklung in ein Schale 10 ml des Entwicklungspuffer (s. 6.11) mit 0,4 mM oder 66 μ l NBT und 0,4 mM oder 33 μ l BCIP geben und den Blot hineinlegen, bis Banden sichtbar werden.
 - Die Färbereaktion wird unter fließendem Wasser abgestoppt.
 - Der Blot ist lichtempfindlich, und wird daher in Alufolie aufbewahrt.

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

6.2.7 Autophosphorylierung mit anschließender nativer PAGE

Die Autophosphorylierung erfolgte standardmäßig mit 10 mM ATP, 5 mM DTT, 5 mM Mg^{2+} , 5 mM Mn^{2+} in TRIS/ HCl, pH 7.5 für die angegebenen Zeiten bei Raumtemperatur. Zu den entsprechenden Zeitpunkten werden 30 μ l des Reaktionsansatzes entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 1x Probenpuffer mit EDTA gestoppt. Nach dem Abstoppen der Reaktion werden die Proben auf Eis gelagert. Die Proben werden mittels nativer PAGE (s. 6.2.6.4) aufgetrennt. Anschließend wird das Gel in Proteinfärbelösung angefärbt. Überschüssige Färbelösung wird durch Wasser entfernt.

Phosphorylierungsansatz

- 10 x Kinasepuffer
- 1 - 10 μ M Kinase
- 100 mM ATP (E.K. 10 mM)
- aufgefüllt auf Endvolumen mit 50 mM TRIS/ HCl pH 7.5

10x Kinasepuffer:

- 50 mM $MgCl_2$
- 50 mM $MnCl_2$
- 50 mM DTT
- 0,5 M TRIS/ HCl pH 7,5

6.2.8 Substratphosphorylierung durch LIRK und ihre Varianten

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

1 μ M Kinase, 1 μ Ci [γ - 32 P], 5 mM $MgCl_2$, 5 mM $MnCl_2$, 250 μ M ATP, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5

Die Kinasen wurden jeweils 20min bei Raumtemperatur in einer Konzentration von 10 μ M und 1mM ATP vorphosphoryliert.

Die Reaktionen der Substratphosphorylierung wurden bei Raumtemperatur durch Zugabe des vorphosphorylierten Enzyms gestartet und durch Zufügen von SDS Probenpuffer beendet.

6.2.9 Bestimmung des Phosphateinbaus

Zur Bestimmung der inkorporierten Radioaktivität nach Substratphosphorylierungsreaktionen wurde die Radioaktivität des inkorporierten radioaktiven Phosphates wurde durch Messung der Cerenkov-Strahlung im Tritium-(^3H) Fenster des β -Szintillationszählers ermittelt.

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 in kollektive Peptid-Färbelösung (6.2.6.5) angefärbt, überschüssige Färbelösung mit Wasser entfernt und die Proteinbanden ausgeschnitten. Die Radioaktivität der Gelstücke wurde durch Messung der Cerenkov-Strahlung bestimmt. Nach Verrechnung mit dem im Ansatz enthaltenen ATP konnte der jeweilige Phosphattransfer berechnet werden

6.2.10 Phosphoaminosäure- und Nukleotidanalyse

6.2.10.1 Tryptische Spaltung von Proteinen im SDS-Gel

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

- Proteinbande aus dem SDS-Gel ausschneiden
- Gelstück kurz in H₂O waschen, H₂O entfernen
- Gelstück in 500 μ l CH₃CN 30 min dehydratisieren, CH₃CN abnehmen
- Gelstück mit 60 μ l Spaltungspuffer (50 mM (NH₄)₂CO₃, pH 8,3) rehydratisieren
- Zugabe von 10 μ l Trypsin (1 mg/ml)
- Inkubation für 30 min bei 35°C, schüttelnd
- Zugabe von 300 μ l Spaltungspuffer und 5 μ l Trypsin
- Inkubation über Nacht bei 35 °C
- Überstand abnehmen, 300 μ l H₂O für 1 h zusetzen und Überstände vereinigen

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

6.2.10.2 Phosphoaminosäureanalysen

Die zu analysierenden Proben aus der tryptischen Elution wurden unter Vakuum (Speed-Vac) getrocknet und einer sauren Partialhydrolyse unterworfen (6 N HCl, 2 h, 110 °C). Nach Entfernen der Säure unter Vakuum (Speed-Vac) wurden die Proben zweimal mit je 20 µl H₂O gewaschen und erneut getrocknet. Die Radioaktivität der getrockneten Eluate wurde im Cerenkov-Zähler bestimmt und die Proben in H₂O aufgenommen (500 cpm/µl).

Es wurde beobachtet, dass die Menge an zuzugebender Säure an die Pelletgröße nach tryptischer Elution angepasst werden muss. Zu wenig Säure, führt nur zu einer unzureichenden Hydrolyse der Peptide. Insgesamt wurden je nach Proteinmenge bis zu 600 µl 6N HCl zu gegeben

6.2.10.3 Analyse der Phosphoaminosäure-Zusammensetzung kamen

6.2.10.3.1 *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

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

Laufpuffer: Eisessig/Pyridin/EDTA/H₂O (10:1:0,2:188,8), pH 3,5

Laufbedingungen: 30 min, 1000 V, 4 °C

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

Laufpuffer: 1. Dimension: Ameisensäure 88 %/Eisessig/H₂O (5:15,6:179,4), pH 1,9

2. Dimension: Eisessig/Pyridin/0,5 M EDTA/H₂O (10:1:0,2:188,8), pH 3,5

Laufbedingungen: 1. Dimension: 15 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 250-1000 cpm Hydrolysat verwendet. Dabei diente eine Mischung aus Phosphoserin, Phosphothreonin und Phosphotyrosin (jeweils 1 µg) als Standard, der jeweils auf den Auftragungspunkt pipettiert wurde (0,5 µl). Bei den elektrophoretischen Analysen diente eine Mischung aus ε-Dinitrophenyl-Lysin (DNP-Lysin 5 mg/ml in H₂O) und Xylen Cyanol FF (1mg/ml in H₂O) als Farbmarker (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.

6.2.11 Abspaltung des GST-Tag durch Thrombinbehandlung

Um aus der dimeren GST-LIRK_{Δ72C Mut} monomere Kinase zu gewinnen wurde das Protein mit Thrombin behandelt. Die Aminosäuresequenz der Kinase enthält zwischen dem GST-Tag und der Kinasesequenz eine Erkennungssequenz für die Thrombinprotease. Nach Thrombinbehandlung bleiben am N-Terminus der Kinasesequenz die Aminosäuren Serin und Glycin zurück

- 300µg Kinase in 370µl Volumen
- 10x Spaltpuffer (10mM Tris; 1mM EDTA pH 8,0)
- 4 Units Thrombin
- Inkubation für 1h bei RT (27°C)
- 100µl Gluthationsepharose mit 50mM Tris pH 7,5 äuilbrieren
- Spaltungsansatz 2min bei 4°C mit Affinitätsmatrix inkubieren
- Elution der Kinase durch Schwerkraft (Kinase befindet sich im Durchfluß
- Kontrolle des Durchflusses über Spot-Test (6.2.6.1) und SDS-PAGE (6.2.6.3)

7 Literaturverzeichnis

Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF.

Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action.

J Biol Chem. 2002 Jan 11;277(2):1531-7. Epub 2001 Oct 17.

Al-Hasani H, Passlack W, Klein HW.

Phosphoryl exchange is involved in the mechanism of the insulin receptor kinase.

FEBS Lett. 1994 Jul 25;349(1):17-22.

Al-Hasani H, Eisermann B, Tennagels N, Magg C, Passlack W, Koenen M, Muller-Wieland D, Meyer HE, Klein HW.

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

FEBS Lett. 1997 Jan 2;400(1):65-70.

Baer K, Al-Hasani H, Parvaresh S, Corona T, Rufer A, Nolle V, Bergschneider E, Klein HW

Dimerization-induced activation of soluble insulin/IGF-1 receptor kinases: an alternative mechanism of activation.

Biochemistry. 2001 Nov 27;40(47):14268-78.

Begum N, Sandu OA, Ito M, Lohmann SM, Smolenski A.

Active Rho kinase (ROK-alpha) associates with insulin receptor substrate-1 and inhibits insulin signaling in vascular smooth muscle cells.

J Biol Chem. 2002 Feb 22;277(8):6214-22. Epub 2001 Dec 05.

Bossemeyer D

Protein kinases--structure and function.

FEBS Lett. 1995 Aug 1;369(1):57-61. Review.

Blakesley RW, Boezi JA.

A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using coomassie brilliant blue G250.

Anal Biochem. 1977 Oct;82(2):580-2.

Bradford MM

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal Biochem. 1976 May 7;72:248-54.

Chen D, Van Horn DJ, White MF, Backer JM.

Insulin receptor substrate 1 rescues insulin action in CHO cells expressing mutant insulin receptors that lack a juxtamembrane NPXY motif.

Mol Cell Biol. 1995 Sep;15(9):4711-7

Cohen P.

Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century?

Nat Rev Drug Discov. 2002 Apr;1(4):309-15. Review.

De Fea K, Roth RA.

Protein kinase C modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation requires serine 612.

Biochemistry. 1997 Oct 21;36(42):12939-47.

De Fea K, Roth RA.

Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation and function by mitogen-activated protein kinase.

J Biol Chem. 1997 Dec 12;272(50):31400-6.

Eck MJ, Dhe-Paganon S, Trub T, Nolte RT, Shoelson SE.

Structure of the IRS-1 PTB domain bound to the juxtamembrane region of the insulin receptor.

Cell. 1996 May 31;85(5):695-705.

Farooq A, Zeng L, Yan KS, Ravichandran KS, Zhou MM.

Coupling of folding and binding in the PTB domain of the signaling protein Shc.

Structure (Camb). 2003 Aug;11(8):905-13.

Gao Z, Hwang D, Bataille F, Lefevre M, York D, Quon MJ, Ye J.

Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex.

J Biol Chem. 2002 Dec 13;277(50):48115-21. Epub 2002 Sep 25.

Jakobsen SN, Hardie DG, Morrice N, Tornqvist HE.

5'-AMP-activated protein kinase phosphorylates IRS-1 on Ser-789 in mouse C2C12 myotubes in response to 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside.

J Biol Chem. 2001 Dec 14;276(50):46912-6. Epub 2001 Oct 11.

Jardetzky O, Lefevre JF.

Protein dynamics.

FEBS Lett. 1994 Feb 7;338(3):246-50. Review.

Heidenreich K, Paduschek M, Molders M, Klein HW.

The insulin receptor: a protein kinase with dual specificity?

Biol Chem Hoppe Seyler. 1994 Feb;375(2):99-104.

Hubbard SR, Wei L, Ellis L, Hendrickson WA.

Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor.

Nature. 1994 Dec 22-29;372(6508):746-54.

Hubbard SR

Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog.

EMBO J. 1997 Sep 15;16(18):5572-81

Johnson LN, Lewis RJ

Structural basis for control by phosphorylation.

Chem Rev. 2001 Aug;101(8):2209-42. Review.

Kaburagi Y, Momomura K, Yamamoto-Honda R, Tobe K, Tamori Y, Sakura H, Akanuma Y, Yazaki Y, Kadowaki T.

Site-directed mutagenesis of the juxtamembrane domain of the human insulin receptor.

J Biol Chem. 1993 Aug 5;268(22):16610-22.

Kohanski RA, Cann AD, Bishop SM, Ablooglu AJ

Partial activation of the insulin receptor kinase domain by juxtamembrane autophosphorylation.

Biochemistry. 1998 Aug 11;37(32):11289-300.

Laemmli UK.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

Lehr S

Charakterisierung der EGF-sowie Insulin-Rezeptor-vermittelten Tyrosinphosphorylierung des humanen *Grb2 Associated Binder-1*-Proteins *in vitro*
Dissertation 1998

Lindberg RA, Quinn AM, Hunter T.

Dual-specificity protein kinases: will any hydroxyl do?
Trends Biochem Sci. 1992 Mar;17(3):114-9. Review.

Liu YF, Paz K, Herschkovitz A, Alt A, Tennenbaum T, Sampson SR, Ohba M, Kuroki T, LeRoith D, Zick Y.

Insulin stimulates PKC ζ -mediated phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). A self-attenuated mechanism to negatively regulate the function of IRS proteins.
J Biol Chem. 2001 Apr 27;276(17):14459-65. Epub 2001 Jan 29.

Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S

The protein kinase complement of the human genome.
Science. 2002 Dec 6;298(5600):1912-34. Review.

Minamide LS, Bamburg JR.

A filter paper dye-binding assay for quantitative determination of protein without interference from reducing agents or detergents.
Anal Biochem. 1990 Oct;190(1):66-70.

Mothe I, Van Obberghen E.

Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on multiple serine residues, 612, 632, 662, and 731, modulates insulin action.
J Biol Chem. 1996 May 10;271(19):11222-7.

Munshi S, Kornienko M, Hall DL, Reid JC, Waxman L, Stirdivant SM, Darke PL, Kuo LC

Crystal structure of the Apo, unactivated insulin-like growth factor-1 receptor kinase. Implication for inhibitor specificity.
J Biol Chem. 2002 Oct 11;277(41):38797-802. Epub 2002 Jul 22.

Noelle V, Tennagels N, Klein HW

A single substitution of the insulin receptor kinase inhibits serine autophosphorylation *in vitro*: evidence for an interaction between the C-terminus and the activation loop.
Biochemistry. 2000 Jun 20;39(24):7170-7.

Ozes ON, Akca H, Mayo LD, Gustin JA, Maehama T, Dixon JE, Donner DB.

A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway mediates and PTEN antagonizes tumor necrosis factor inhibition of insulin signaling through insulin receptor substrate-1.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Apr 10;98(8):4640-5. Epub 2001 Apr 03.

Quon MJ, Butte AJ, Zarnowski MJ, Sesti G, Cushman SW, Taylor SI.

Insulin receptor substrate 1 mediates the stimulatory effect of insulin on GLUT4 translocation in transfected rat adipose cells.
J Biol Chem. 1994 Nov 11;269(45):27920-4.

Parvaresh S

Grundlagen zum dualen Mechanismus der Insulinrezeptorkinase
Dissertation 2000

Parvaresh S, Yesilkaya T, Baer K, Al-Hasani H, Klein HW

14-3-3 binding to the IGF-1 receptor is mediated by serine autophosphorylation.
FEBS Lett. 2002 Dec 18;532(3):357-62.

Paz K, Boura-Halfon S, Wyatt LS, LeRoith D, Zick Y.

The juxtamembrane but not the carboxyl-terminal domain of the insulin receptor mediates insulin's metabolic functions in primary adipocytes and cultured hepatoma cells.
J. Biol. Chem. (1996) 271 6998-7003

Paz K, Liu YF, Shorer H, Hemi R, LeRoith D, Quan M, Kanety H, Seger R, Zick Y.

Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) by protein kinase B positively regulates IRS-1 function.
J Biol Chem. 1999 Oct 1;274(40):28816-22.

Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H, Zick Y.

A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation.
J Biol Chem. 1997 Nov 21;272(47):29911-8

Pitcher JA, Touhara K, Payne ES, Lefkowitz RJ.

Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the beta-adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with G beta gamma subunits and lipid.
J Biol Chem. 1995 May 19;270(20):11707-10.

Robinson FL, Whitehurst AW, Raman M, Cobb MH.

Identification of novel point mutations in ERK2 that selectively disrupt binding to MEK1.
J Biol Chem. 2002 Apr 26;277(17):14844-52. Epub 2002 Jan 31.

Ross SA, Gulve EA, Wang M

Chemistry and biochemistry of type 2 diabetes.
Chem Rev. 2004 Mar;104(3):1255-82. Review

Rubin GM, Yandell MG, Wortman JR

Comparative genomics of the eukaryotes.
Science. 2000 Mar 24;287(5461):2204-15.

Salim K, Bottomley MJ, Querfurth E, Zvelebil MJ, Gout I, Scaife R, Margolis RL, Gigg R, Smith CI, Driscoll PC, Waterfield MD, Panayotou G.

Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase.
EMBO J. 1996 Nov 15;15(22):6241-50.

Schlessinger J.

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

Stolt PC, Vardar D, Blacklow SC.

The dual-function disabled-1 PTB domain exhibits site independence in binding phosphoinositide and peptide ligands.
Biochemistry. 2004 Aug 31;43(34):10979-87.

Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF.

Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein.
Nature. 1991 Jul 4;352(6330):73-7.

Tanasijevic MJ, Myers MG Jr, Thoma RS, Crimmins DL, White MF, Sacks DB.
Phosphorylation of the insulin receptor substrate IRS-1 by casein kinase II.
J Biol Chem. 1993 Aug 25;268(24):18157-66.

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

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

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

Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, Le Bon T, Kathuria S, Chen E, et al.
Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity.
EMBO J. 1986 Oct;5(10):2503-12.

Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR.
Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance.
J Clin Invest. 1999 Apr;103(7):931-43. Review.

White MF, Livingston JN, Backer JM, Lauris V, Dull TJ, Ullrich A, Kahn CR.
Mutation of the insulin receptor at tyrosine 960 inhibits signal transmission but does not affect its tyrosine kinase activity.
Cell. 1988 Aug 26;54(5):641-9

Wolf G, Trub T, Ottinger E, Groninga L, Lynch A, White MF, Miyazaki M, Lee J, Shoelson SE.
PTB domains of IRS-1 and Shc have distinct but overlapping binding specificities.
J Biol Chem. 1995 Nov 17;270(46):27407-10.

Yun M, Keshvara L, Park CG, Zhang YM, Dickerson JB, Zheng J, Rock CO, Curran T, Park HW.
Crystal structures of the Dab homology domains of mouse disabled 1 and 2.
J Biol Chem. 2003 Sep 19;278(38):36572-81. Epub 2003 Jun 24.

Zick Y.
Uncoupling insulin signalling by serine/threonine phosphorylation: a molecular basis for insulin resistance.
Biochem Soc Trans. 2004 Oct;32(Pt 5):812-6.

Zhou C, Yang Y, Jong AY.
Mini-prep in ten minutes.
Biotechniques. 1990 Feb;8(2):172-3.

Zwahlen C, Li SC, Kay LE, Pawson T, Forman-Kay JD.
Multiple modes of peptide recognition by the PTB domain of the cell fate determinant Numb.
EMBO J. 2000 Apr 3;19(7):1505-15.

Ich versichere hiermit, dass ich meine Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie Zitate kenntlich gemacht habe.

Daniel-Sebastian Karau

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Hr. Prof. Dr. Klein, nicht nur für die äußerst interessante Fragestellung und Bereitstellung aller benötigten Mittel, sondern insbesondere auch für anregende und fruchtbare Diskussionen. Fr. Dr. Nadja Hellmann danke ich für manch hilfreiche Idee, sowie für die Unterstützung bei kniffligen thermodynamischen, insbesondere aber kinetischen, Fragen. Monika Gombert danke ich für die erlangten Erfahrungen im Bereich der Zellkultur und Fr. Dr. Kristin Baer für die Bereitstellung der Akt-Kinase und der erhaltenen Hilfe bei manchem schier unlösbarem Klonierungsproblem. Magnus Manske danke ich für technische Unterstützung in allen Silicium-getakteten Bereichen. Besonders bedanken möchte ich mich für die intensive Zusammenarbeit mit Fr. Dr. Susan Parvaresch, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Auf Grund seiner schlagkräftigen Unterstützung in allen Belangen des Lebens danke ich Tanju Yesilkaya, außerdem meinen Kollegen Christian Rogon, Daniel Fischer, Julia Wassermann, Sebastian Neubert und Joachim Bräutigam. Den Mitarbeitern der AG Sterner danke ich, für die Bereitstellung und Anleitung in das pET-Expressionssystem. Den Praktikanten Ina Lauinger, Mathias Könn und Claus Bender gilt mein Dank für die erhaltene Unterstützung und Entlastung. Den Mitarbeitern der Mechanischen- und der Elektronischen Werkstatt danke ich für prompte Hilfe bei kleineren oder größeren Problemen sowie Manfred Kreikler für die Versorgung mit praktischen Tipps für alle Lebenslagen. Zuletzt möchte ich mich bei allen hier nicht namentlich erwähnten Personen bedanken, ohne deren Hilfe diese Arbeit niemals hätte fertig gestellt werden können. Meiner Freundin Tinka Wolf möchte ich sagen: Ich liebe dich!

8 Anhang

8.1 Anhang A)

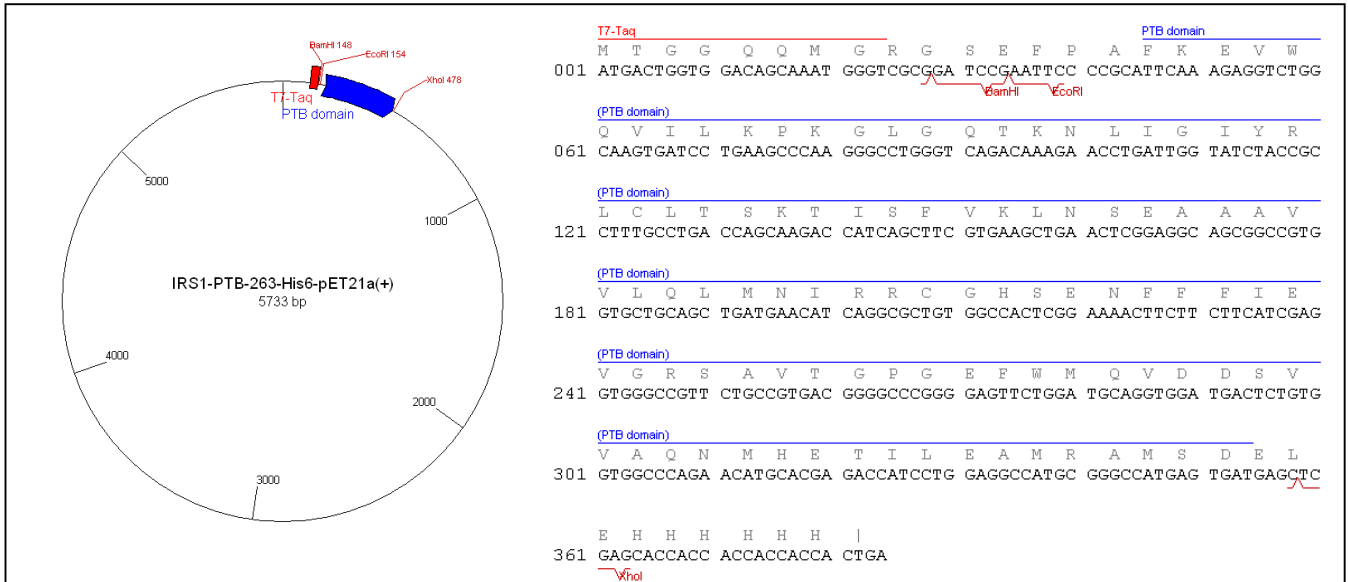


Abb. 8.1: Proteinsequenz der Kinase LIRK_{Δ72C Mut} Einzelne Strukturmodule farblich markiert

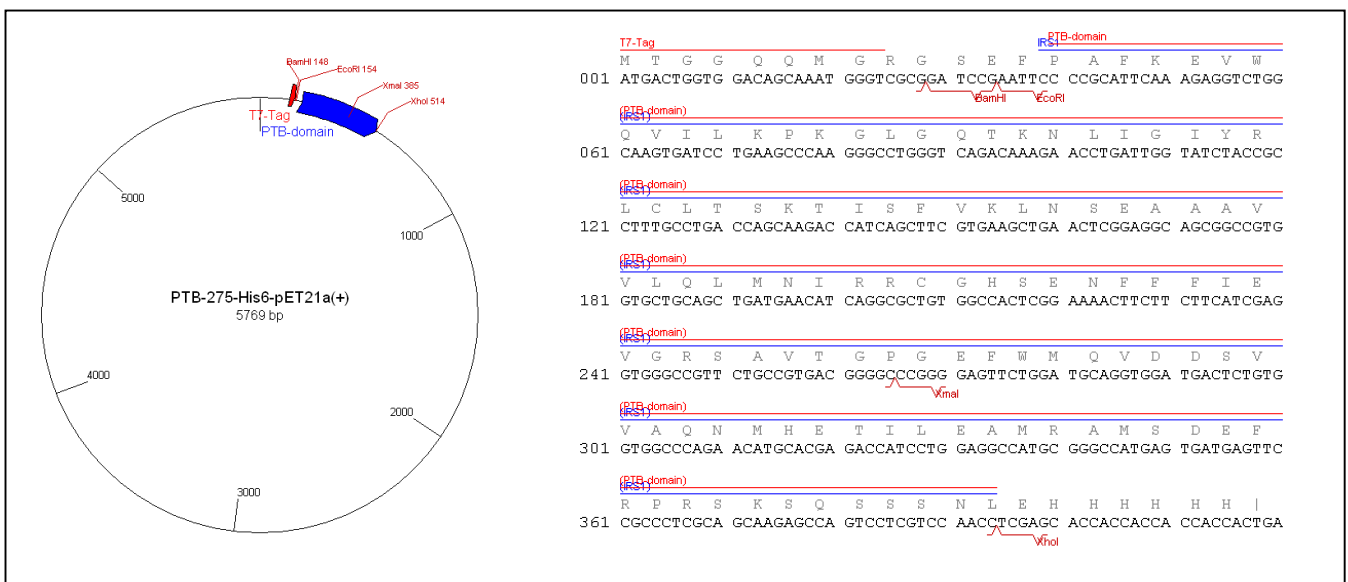


Abb. 8.2: Proteinsequenz der Kinase LIRK_{Δ72C Mut} Einzelne Strukturmodule farblich markiert

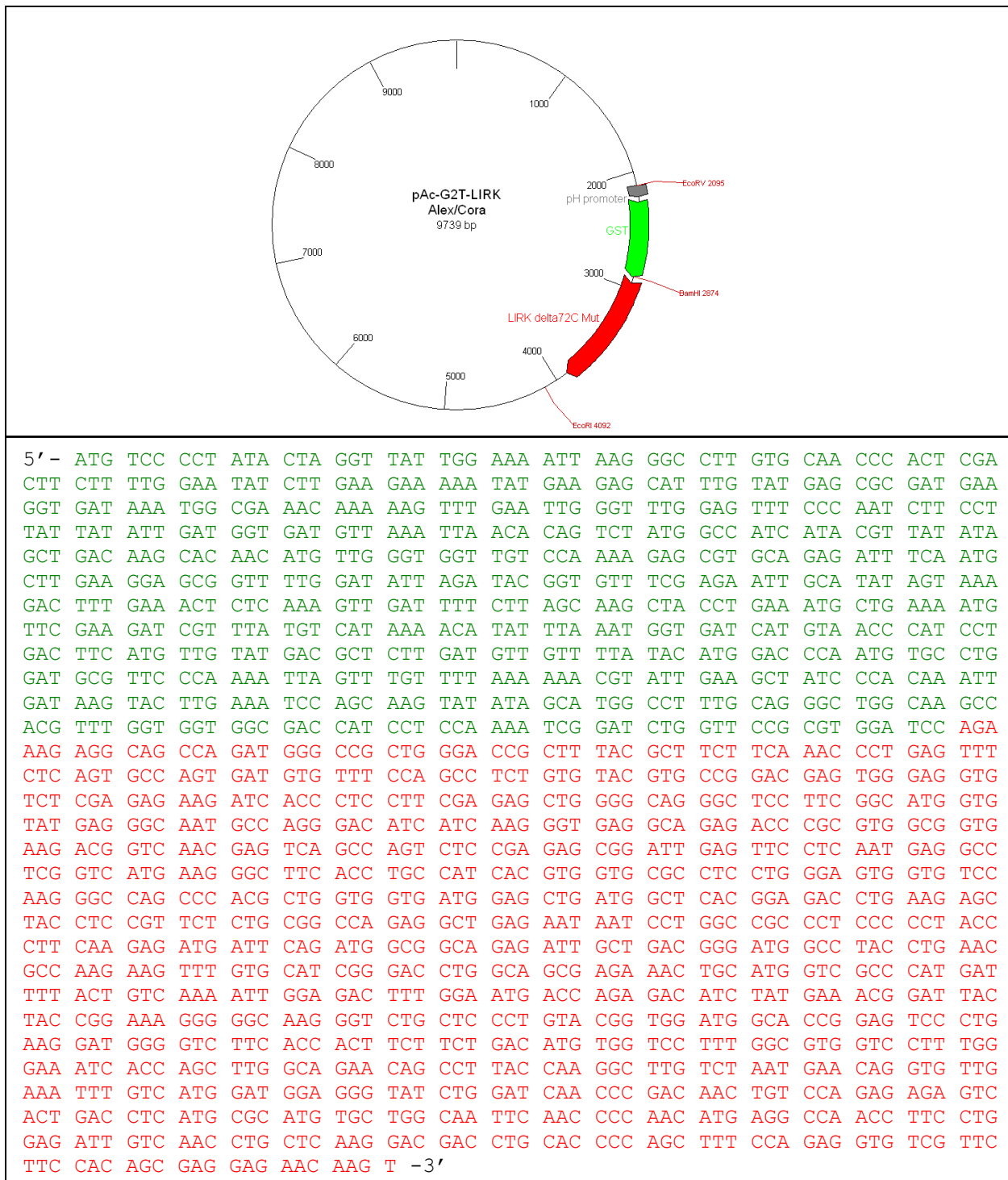
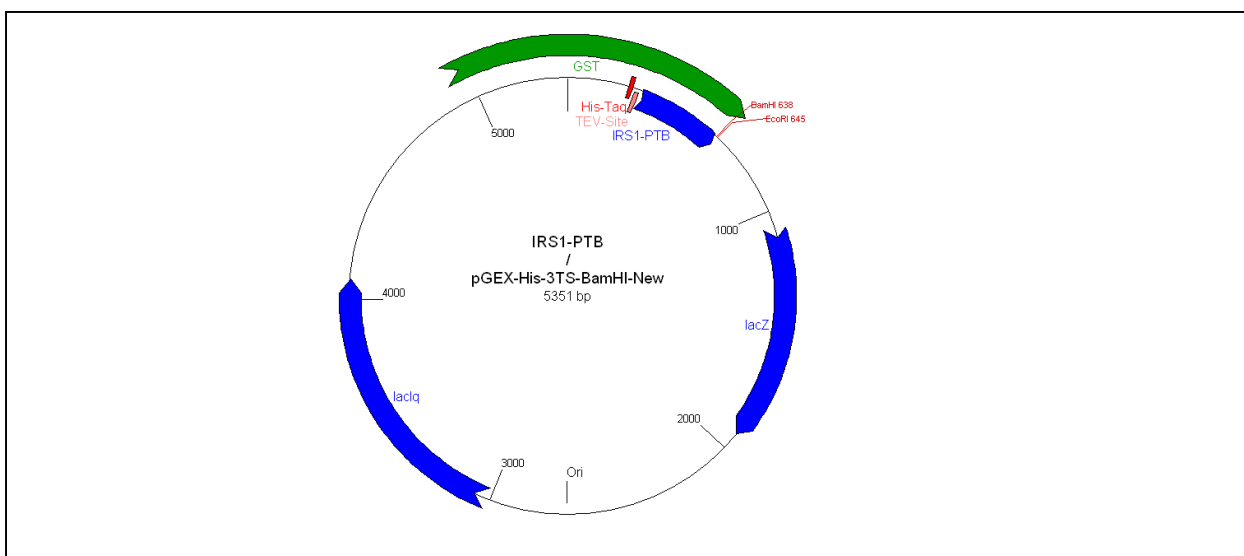


Abb. 8.3: DNA-Sequenz der GST-LIRK $_{\Delta 72C}$ Mut. GST-Tag in grün, Sequenz der Kinase in rot



```

5` - ATG TCC CCT ATA CTA GGT TAT TGG AAA ATT AAG GGC CTT GTG CAA CCC ACT CGA
CTT CTT TTG GAA TAT CTT GAA GAA AAA TAT GAA GAG CAT TTG TAT GAG CGC GAT GAA
GGT GAT AAA TGG CGA AAC AAA AAG TTT GAA TTG GGT TTG GAG TTT CCC AAT CTT CCT
TAT TAT ATT GAT GGT GAT GTT AAA TTA ACA CAG TCT ATG GCC ATC ATA CGT TAT ATA
GCT GAC AAG CAC AAC ATG TTG GGT GGT TGT CCA AAA GAG CGT GCA GAG ATT TCA ATG
CTT GAA GGA GCG GTT TTG GAT ATT AGA TAC GGT GTT TCG AGA ATT GCA TAT AGT AAA
GAC TTT GAA ACT CTC AAA GTT GAT TTT CTT AGC AAG CTA CCT GAA ATG CTG AAA ATG
TTC GAA GAT CGT TTA TGT CAT AAA ACA TAT TTA AAT GGT GAT CAT GTA ACC CAT CCT
GAC TTC ATG TTG TAT GAC GCT CTT GAT GTT GTT TTA TAC ATG GAC CCA ATG TGC CTG
GAT GCG TTC CCA AAA TTA GTT TGT TTT AAA AAA CGT ATT GAA GCT ATC CCA CAA ATT
GAT AAG TAC TTG AAA TCC AGC AAG TAT ATA GCA TGG CCT TTG CAG GGC TGG CAA GCC
ACG TTT GGT GGT GGC GAC CAT CCT CCA AAA TCG GAT GGT TCA ACT AGT GGT TCT GGT
CAT CAC CAT CAC CAT CAC TCC GCG GAG AAT CTT TAT TTT CAG GGT ATC CCC GCA TTC
AAA GAG GTC TGG CAA GTG ATC CTG AAG CCC AAG GGC CTG GGT CAG ACA AAG AAC CTG
ATT GGT ATC TAC TCC CGC CTT TGC CTG ACC AGC AAG ACC ATC AGC TTC GTG AAG CTG AAC
TCG GAG GCA GCG GCC GTG GTG CTG CAG CTG ATG AAC ATC AGG CGC TGT GGC CAC TCG
GAA AAC TTC TTC TTC ATC GAG GTG GGC CGT TCT GCC GTG ACG GGG CCC GGG GAG TTC
TGG ATG CAG GTG GAT GAC TCT GTG GTG GCC CAG AAC ATG CAC GAG ACC ATC CTG GAG
GCC ATG CGG GCC ATG AGT GAT GAG TTC CGC CCT CGC AGC AAG AGC CAG TCC TCG TGG
ATC CAG AAT TCA TCG T -3'

```

Abb. 8.4: Proteinsequenz der GST-PTB_{Mut} Sequenz des GST-Tag in grün, His-Tag in rot, TEV-Site in violett, PTB in blau. Am 3`-Ende ist die Mutation rot hervorgehoben

8.2 Anhang B)

| | | | | | | | |
|-----|------------------------|----------------------|------------|------------|------------|----------------|------------|
| | <u>T7-Tag</u> | <u>PTB (158-263)</u> | <u>165</u> | <u>175</u> | <u>185</u> | <u>195</u> | <u>205</u> |
| 001 | MTGGQQMGRG | SEFPAPKEVW | QVILKPKGLG | QTKNLIGIYR | LCLTSKTISF | VKLNSEAAAV | VLQLMNIRRC |
| | <u>(PTB (158-263))</u> | <u>225</u> | <u>235</u> | <u>245</u> | <u>255</u> | <u>His-Tag</u> | |
| 071 | GHSENFFFIE | VGRSAVTGPG | EFWMQVDDSV | VAQNMHETIL | EAMRAMSDEL | EHHHHHH | |

Abb. 8.5: Proteinsequenz der His-PTB₂₆₃. Einzelne Strukturmodule farblich markiert

-----//-----

| | | | | | | | |
|-----|------------------------|----------------------|------------|------------|------------|------------|-----------------|
| | <u>T7-Tag</u> | <u>PTB (158-275)</u> | <u>165</u> | <u>175</u> | <u>185</u> | <u>195</u> | <u>205</u> |
| 001 | MTGGQQMGRG | SEFPAPKEVW | QVILKPKGLG | QTKNLIGIYR | LCLTSKTISF | VKLNSEAAAV | VLQLMNIRRC |
| | <u>(PTB (158-275))</u> | <u>225</u> | <u>235</u> | <u>245</u> | <u>255</u> | <u>265</u> | <u>275s-Tag</u> |
| 071 | GHSENFFFIE | VGRSAVTGPG | EFWMQVDDSV | VAQNMHETIL | EAMRAMSDEF | RPRSKSQSSS | NLEHHHHHH |

Abb. 8.6: Proteinsequenz der His-PTB₂₇₅. Einzelne Strukturmodule farblich markiert

-----//-----

| | | | | | | | |
|-----|---------------------------|-------------|-------------|--------------------|-------------|--------------------|-------------|
| | <u>GST</u> | | | | | | |
| 001 | MSPILGYWKI | KGLVQPTRL | LEYLEEKYEE | HLYERDEGDK | WRNRKFEGL | EPNLPYYID | GDVKLTQSM |
| | <u>(GST)</u> | | | | | | |
| 071 | IIRYIADKHN | MLGGCPKERA | EISMLEGAVL | DIRYGVSRIA | YSKDFETLKV | DFLSKLP EML | KMFEDRLCHK |
| | <u>(GST)</u> | | | | | | |
| 141 | TYLNGDHVTH | PDFMLYDALD | VVLYMDPMCL | DAFPKLVCFK | KRIEAIPOID | KYLKSSKYIA | WPLQGWQATF |
| | <u>(GST)</u> | | | | | | |
| 211 | GGGDHPPKSD | LVPRGSRKRQ | PDGPLGPLYA | SSNPEFLSAS | DVFPASVYVP | DEWEVSREKI | TLLRELGQGS |
| | <u>(Glycin rich Loop)</u> | <u>1005</u> | <u>1015</u> | <u>ATP-binding</u> | <u>1025</u> | <u>Ionenbrücke</u> | <u>1045</u> |
| 281 | FGMVYEGNAR | DIKGEAETR | VAVKTVNES | SLRERIEFLN | EASVMKGFTC | HHVRLLGVV | SKGQPTLVVM |
| | <u>(KD)</u> | <u>1075</u> | <u>1085</u> | <u>1095</u> | <u>1105</u> | <u>1115</u> | <u>1125</u> |
| 351 | ELMAHGDLKS | YLRSLRPEAE | NNPGRPPPTL | QEMIQMAAEI | ADGMAYLNAK | KFVHRDLAAR | NCMVAHDFTV |
| | <u>(KD)</u> | <u>1145</u> | <u>1155</u> | <u>1165</u> | <u>1175</u> | <u>1185</u> | <u>1195</u> |
| 421 | KIGDFGMTRD | IYETDYRKG | GKGLLPVRWM | APESLKDGVF | TTSSDMWSFG | VVLWEITSLA | EQPYQGLSNE |
| | <u>(KD)</u> | <u>1215</u> | <u>1225</u> | <u>1235</u> | <u>CT</u> | <u>1255</u> | <u>1265</u> |
| 491 | QVLKFVMDGG | YLDQPDNCE | RVTDLMRMCW | QFNPKMRPTF | LEIVNLLKDD | LHPSFPEVSF | FHSEENK |

Abb. 8.7: Proteinsequenz der Kinase LIRK_{Δ72C Mut}. Einzelne Strukturmodule farblich markiert

8. Anhang

```

GST
001 MSPILGYWKI KGLVQPTRL L LEYLEEKYEE HLYERDEGDK WRNKKFELGL EFPNLPYYID GDVKLTQSMA

(GST)
071 IIRYIADKHN MLGGCPKERA EISMLEGAVL DIRYGVSRIA YSKDFETLKV DFLSKLPEML KMFEDRLCHK

(GST)
141 TYLNGDHVTH PDFMLYDALD VVLYMDPMCL DAFPCLVCFK KRIEAI PQID KYLKSSKYIA WPLQGWQATF

(GST)
211 GGGDHPEKSD GSTSGSGHHH HHS AENLYF QGIPAFKEVW QVILKPKGLG QTKNLIGIYR LCLTSKTISF
      His-Tag      TEV-Site      PTB (158-273) 165      175      185
      (PTB (158-273)) 205      215      225      235      245      255
281 VKLNSEAAAV VLQLMNIRRC GHSENF FFIE VGRSAVTGPG EFWMQVDDSV VAQNMHETIL EAMRAMSDEF

      (PTB (158-273)) Mutation
351 RPRSKSQSSW IQNSS

```

Abb. 8.8: Proteinsequenz der GST-PTB_{Mut}. Einzelne Strukturelemente sind farblich markiert