

Inhaltsverzeichnis

PUBLIKATIONEN.....	I
INHALTSVERZEICHNIS.....	II
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	X
TABELLENVERZEICHNIS.....	XIII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Bedeutung von Phosphorylierungen und Proteinkinasen	1
1.2 Klassifikation und Funktion der Proteinkinasen der DYRK-Familie	2
1.3 Zelluläre und klinische Relevanz von DYRK1A und DYRK1B.....	3
1.3.1 Biologische Gemeinsamkeiten und Unterschiede	3
1.3.2 DYRK1A und neurologische Erkrankungen	5
1.3.3 DYRK1B und metabolische Erkrankungen.....	5
1.3.4 DYRK1B und Tumorerkrankungen.....	6
1.4 Struktur der DYRK-Kinasen.....	7
1.4.1 Domänenstruktur der aktiven Konformation einer Proteinkinase	7
1.4.2 Autonome Faltungseinheit der DYRK-Kinasen	10
1.4.3 Strukturelle Unterschiede der Klasse-I/II-DYRK-Kinasen...	11
1.4.4 Strukturelle Besonderheiten von DYRK1A und DYRK1B...	12
1.4.5 Strukturelle Besonderheiten der Klasse-II-DYRK-Kinasen.	14
1.5 HSP90/CDC37-System	14
1.5.1 Allgemeine Funktionen der molekularen Chaperone.....	14
1.5.2 Interaktion von Proteinkinasen mit dem HSP90/CDC37- System	16
1.6 Initiale Reifung der DYRK-Proteinkinasen.....	18
1.6.1 Nachweis der Autophosphorylierung als Parameter für eine erfolgreiche, initiale Reifung	18
1.6.2 Unterschiede in der initialen Reifung von DYRK1A und DYRK1B in Abhängigkeit vom HSP90/CDC37-System.....	20

1.6.3	Unterschiedliche initiale Reifung von DYRK1A und DYRK1B als pharmakologischer Angriffspunkt.....	22
2	ZIELSETZUNG	24
3	MATERIAL UND METHODEN	25
3.1	Material.....	25
3.1.1	Geräte und <i>Software</i>	25
3.1.2	Chemikalien und Restriktionsenzyme	27
3.1.3	Puffer und Lösungen	27
3.1.4	<i>Primer</i>	28
3.1.5	Antikörper und Konjugate	31
3.1.6	Plasmide	32
3.1.7	Bakterienstämme	33
3.2	Nukleinsäureanalytik	34
3.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
3.2.2	Agarosegelelektrophorese	36
3.2.3	Restriktionsverdau von DNA-Elementen	37
3.2.4	Klonierungen	37
3.2.5	Herstellung des pcDNA5/FRT/TO-FLAG-HiBiT-Vektors	40
3.2.6	Aufbereitung der Plasmid-DNA	42
3.3	Mikrobiologische Methoden	42
3.3.1	Transformation von <i>E. coli</i>	42
3.3.2	Bakterielle Expression der Kinasekonstrukte	43
3.3.3	<i>In-vitro</i> -Proteinsynthese	44
3.4	Zellbiologische Methoden	44
3.4.1	Verwendete Zelllinien und allgemeine Kultivierung	44
3.4.2	Transiente Transfektion der HeLa-Zellen und HEK293- Zellen	45
3.5	Proteinbiochemie.....	46
3.5.1	SDS-Lyse der HeLa-Zellen	46
3.5.2	Immunpräzipitation der FLAG-HiBiT-Kinasekonstrukte	46

3.5.3	<i>HiBiT Lytic Assay</i>	48
3.5.4	<i>HiBiT Blotting System</i>	49
3.5.5	Quantifizierung der unlöslichen FLAG-HiBiT-Kinasekonstrukte	49
3.5.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
3.5.7	<i>Western Blot</i>	50
3.6	Statistik und Abbildungen	51
4	ERGEBNISSE	53
4.1	Neue DYRK1A-DYRK1B-Chimären	53
4.1.1	Planung der DYRK1A-DYRK1B-Chimären	53
4.1.2	Klonierung der DYRK1A-DYRK1B-Chimären	56
4.1.3	Protein-tags der DYRK1A-DYRK1B-Chimären	57
4.2	DYRK1A-DYRK1B-Chimären in <i>E.-coli</i> -basierten Expressionssystemen.....	59
4.2.1	Vorteile der <i>E.-coli</i> -basierten Expressionssysteme	59
4.2.2	Einfluss der katalytischen Domäne auf die Autophosphorylierung	60
4.2.3	Einfluss des <i>C-lobes</i> auf die Autophosphorylierung	64
4.3	DYRK1A-DYRK1B-Chimären in Säugerzellen	67
4.3.1	Expression der DYRK1A-DYRK1B-Chimären.....	67
4.3.2	Autophosphorylierung der DYRK1A-DYRK1B-Chimären in Abhängigkeit vom HSP90/CDC37-System.....	68
4.3.3	Aggregation der DYRK1A-DYRK1B-Chimären in Abhängigkeit vom HSP90/CDC37-System.....	71
5	DISKUSSION	73
5.1	Initiale Reifung von DYRK1A und DYRK1B in verschiedenen Expressionssystemen.....	73
5.1.1	Initiale Reifung von DYRK1A und DYRK1B in <i>E.-coli</i> -basierten Expressionssystemen.....	73

5.1.2	Besonderheiten der heterologen Genexpression für die initiale Reifung von DYRK1A und DYRK1B	76
5.1.3	Initiale Reifung von DYRK1A und DYRK1B in Säugerzellen in Abhängigkeit vom HSP90/CDC37-System	78
5.1.4	Aggregation von DYRK1A und DYRK1B in Säugerzellen in Abhängigkeit vom HSP90/CDC37-System	80
5.2	Strukturelle Grundlagen für die unterschiedliche initiale Reifung von DYRK1A und DYRK1B	83
5.2.1	Bedeutung der DH-Box für die initiale Reifung	83
5.2.2	Bedeutung der katalytischen Domäne für die initiale Reifung	84
5.2.3	Bedeutung des <i>C-lobes</i> für die initiale Reifung	86
5.3	Thermodynamische Aspekte hinsichtlich DYRK1A und DYRK1B	88
5.3.1	Einfluss der thermodynamischen Stabilität auf die initiale Reifung	88
5.3.2	Einfluss der thermodynamischen Stabilität auf die gereifte Proteinkinase	92
5.4	Ausblick	94
6	ZUSAMMENFASSUNG	97
7	LITERATURVERZEICHNIS	98
8	ANHANG	112
8.1	Expressionskassette im pET-ST2-Vektor	112
8.2	Expressionskassette im pcDNA5/FRT/TO-FLAG-HiBiT-Vektor	113
8.3	Sequenz-Alignment von rDYRK1A und hDYRK1B	114
8.4	Codon-Adaptions-Index	115
	AUFLISTUNG DER EIGENEN PUBLIKATIONEN	116
	DANKSAGUNG	117
	ERKLÄRUNG ZUR DATENAUFBEWAHRUNG	118
	ERKLÄRUNG ÜBER DEN EIGENANTEIL	119
	LEBENS LAUF	120