

Protein-Phosphorylierung und Zellregulation I (Nobel-Vortrag)**

Von Edwin G. Krebs*

Einleitung

Dieser Vortrag und der unmittelbar folgende^{***} handeln von der reversiblen Phosphorylierung von Proteinen und der Bedeutung, die dieser Vorgang für die biologische Regulation hat. Ed Fischer und ich werden unsere eigenen frühen Arbeiten auf diesem Gebiet diskutieren und einige daraus folgende Entwicklungen beschreiben. Diese haben zu der Erkenntnis geführt, daß die Protein-Phosphorylierung ein wichtiger Mechanismus für die Regulation (Kontrolle) von zellulären Vorgängen ist. Mein Vortrag wird eine Übersicht über den historischen Hintergrund geben, vor dem unsere gemeinsame Arbeit in den fünfziger und frühen sechziger Jahren stattfand. Dann werde ich unsere eigene Arbeit diskutieren und anschließend einige Kommentare über die cy-clo-AMP-abhängige Protein-Kinase machen. Abschließend werde ich über die intrazelluläre Übermittlung von Hormon- und Wachstumsfaktorsignalen durch Protein-Kinase-Kaskaden sprechen.

Hintergrund

1940, als ich mein Medizinstudium an der Washington University in St. Louis begann, war wohlbekannt, daß der Abbau von Glycogen im Skelettmuskel und anderen Zelltypen durch Phosphorylyse geschieht und vom Enzym Phosphorylase katalysiert wird (siehe Übersichtsartikel^[1]). Damals war Carl Cori Professor und Vorsitzender des Department of Pharmacology an der Washington University, aber er übernahm bald das Department of Biological Chemistry. Ich lernte ihn langsam kennen, zuerst aus der Ferne – so wie Medizinstudenten ihre Professoren gewöhnlich kennen –, und später, als ich „teaching assistant“ in Biochemie geworden war, etwas besser. In dieser Funktion wurde ich auch mit Arda Green bekannt, die zusammen mit Carl und Gerty Cori die Muskel-Phosphorylase aus Kaninchen reinigte. Es dauerte nicht lange, bis ich von den ungewöhnlichen Eigenschaften dieses Enzyms hörte, das von ihnen im Skelettmuskel in zwei Formen gefunden wurde, der Phosphorylase *a* und *b*^[2, 3]. Die *a*-Form wurde gereinigt und als kristallines Enzym gewonnen. Es wurde gezeigt, daß Phosphorylase *b* hohe Konzentrationen von 5'-AMP zur Aktivität benötigte, wohingegen Phosphorylase *a* in Abwesenheit dieses Nucleotids aktiv war. Da die für die Aktivität von Phosphorylase *b* benötigte Konzentration von 5'-AMP we-

sentlich über der des Muskels lag, wurde diese Form als physiologisch inaktiv eingestuft. Man hielt Phosphorylase *a* für die aktive Spezies. Es gab Hinweise darauf, daß die beiden Formen in der Zelle ineinander übergehen können und Cori postulierte, daß die Interkonversion der Phosphorylase-Formen ein physiologisch wichtiger Regulationsmechanismus ist. Es konnte gezeigt werden, daß der ruhende Muskel die Phosphorylase überwiegend in der *a*-Form enthält, wohingegen im elektrisch stimulierten Muskel die *b*-Form vorkommt^[4]. Wir werden später diskutieren (siehe unten), daß tatsächlich das Gegenteil der Fall ist. Abgesehen von diesem Punkt war die Erkenntnis, daß ein Enzym zwischen zwei Formen innerhalb der Zelle wechselt kann, ein bemerkenswerter Fortschritt, der die Basis für wichtige Entwicklungen sein sollte.

Die Coris kannten die chemische Natur der Interkonversionsreaktionen der Phosphorylase nicht, aber sie entdeckten ein Enzym, das Phosphorylase *a* in Phosphorylase *b* in vitro überführen konnte. Dieses Enzym wurde „PR-Enzym“ genannt, basierend auf der Annahme, daß es die prosthetische Gruppe aus Phosphorylase *a*, welche man für das Holoenzym hielt, entfernte^[2]; Phosphorylase *b*, ohne die besagte Gruppe, wurde für das Apoenzym gehalten. Man glaubte aufgrund der Tatsache, daß Phosphorylase *b* von 5'-AMP aktiviert werden konnte, daß dieses an das Enzym gebundene Nucleotid die prosthetische Gruppe von Phosphorylase *a* ist. Aber alle Versuche, 5'-AMP als Produkt der Reaktion von Phosphorylase *a* zu *b* durch das PR-Enzym zu identifizieren, schlugen fehl^[2, 3]. Weil die Behandlung von Phosphorylase *a* mit Trypsin zur Bildung einer Phosphorylase-*b*-ähnlichen Form führte, d.h. einem Enzym, das von 5'-AMP aktiviert werden konnte, so hielt man das PR-Enzym für eine Protease. Es konnte kein Enzym gefunden werden, das in vitro Phosphorylase *b* in *a* in Anwesenheit von 5'-AMP oder unter anderen Bedingungen überführte. Das schien nicht unlogisch, da man annahm, daß eine solche Konversion die Knüpfung einer Peptidbindung voraussetzte und zu jener Zeit die Wahrscheinlichkeit, eine solche Reaktion in vitro durchzuführen, als sehr klein galt. Diese frühen Konzepte bezüglich der Interkonversionsreaktion der Phosphorylase sind in Abbildung 1 illustriert.

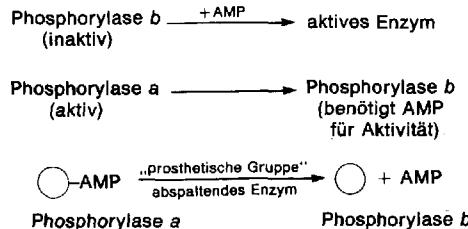


Abb. 1. Frühe Konzepte über die Interkonversionsreaktionen der Muskel-Phosphorylase. Inaktive Phosphorylase *b* wird in Gegenwart von 5'-AMP zum aktiven Enzym. Phosphorylase *a*, die physiologisch aktive Form des Enzyms, wird durch das „prosthetische Gruppe“ entfernende „PR-Enzym“ inaktiviert. Man hielt es für wahrscheinlich, daß 5'-AMP das Produkt dieser Reaktion ist, aber dies konnte nicht bewiesen werden.

* Prof. E. G. Krebs
Departments of Pharmacology and Biochemistry
School of Medicine, SL-15
University of Washington
Seattle, WA 98195 (USA)
Telefax: Int. + 206/543-0858

** Copyright © The Nobel Foundation 1993. – Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck einer deutschen Fassung des Vortrags.

*** Siehe den direkt folgenden Artikel: E. H. Fischer, *Angew. Chem.* 1993, 105, 1181; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1993, 32, Nr. 8.

Obwohl ich als Medizinstudent von der Phosphorylase-Forschung, besonders durch meine Freundschaft mit Arda Green, wußte, so machte ich meine erste direkte Erfahrung mit dem Enzym erst, nachdem der zweite Weltkrieg zuende war und ich als Postdoktorand in Coris Labor zu arbeiten begann (meine Ausbildung als Assistenzarzt in Innerer Medizin war durch den Krieg unterbrochen worden und ich beschloß, obwohl ich irgendwann zur klinischen Medizin zurück wollte, ein oder zwei Jahre in der Grundlagenforschung zu arbeiten und dann erst die klinische Ausbildung fortzusetzen). Die Coris gaben mir die Aufgabe, Löslichkeitsmessungen mit der Phosphorylase durchzuführen; zusätzlich untersuchte ich die Wirkung von Protamin und Polylisin auf die beiden Enzymformen. Es war interessant, daß Inosinsäure und 5'-AMP in Gegenwart dieser polyanionischen Substanzen sehr effektive Aktivatoren von Phosphorylase *b* waren. Alle diese Untersuchungen über die Wirkung von Nucleotiden auf Phosphorylase wurden durchgeführt, bevor Jacob und Monod ihre Entdeckungen zur Allosterie und Proteinkonformation machten; man betrachtete die Befunde zu jener Zeit einfach als unerklärte Phänomene. Tatsächlich sprach sich Carl Cori einige Jahre lang gegen eine Publikation meiner Ergebnisse aus, jedenfalls solange ich sie nicht erklären konnte. Schließlich, nachdem Neil Madsen herausfand, daß Protamin physikalisch an Phosphorylase binden konnte – das war wenigstens ein Schritt weiter für die Erklärung, wie die Enzymaktivität beeinflußt werden konnte –, ließ mich Cori meine Veröffentlichung einreichen.

Obwohl also die Kenntnisse über die Eigenschaften der Phosphorylase als Enzym während der vierziger Jahre rapide zunahmen, war es doch oft schwierig, die physiologische Bedeutung dieser Eigenschaften zu erklären. Man muß dazu wissen, was damals über den Glycogen-Metabolismus bekannt war. Die epochale Arbeit von Leloir über den Mechanismus der Glycogen-Synthese sollte erst noch erscheinen, d.h. die Bedeutung von Uridindiphosphat (UDP) für die Polysaccharid-Synthese lag noch völlig im Dunklen. Man glaubte, daß die Phosphorylase sowohl an der Glycogen-Synthese als auch an der Glycogenolyse beteiligt ist (Abb. 2).

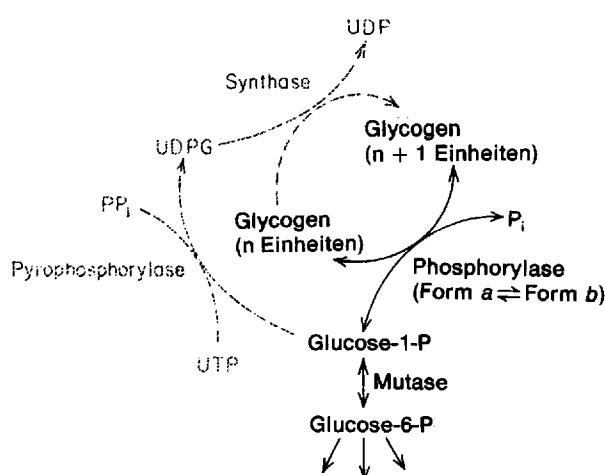


Abb. 2. Der Glycogen-Metabolismus, wie er etwa 1945 geschen wurde. Der gestrichelte Teil des Metabolismus-Schemas war unbekannt. Man vermutete, daß Glycogen-Synthese und -abbau von der Phosphorylase katalysiert werden, wobei die Richtung der Reaktion von der Konzentration der Reaktionsteilnehmer bestimmt werden sollte. Man glaubte, daß die Phosphorylase innerhalb der Zelle zwischen der Form *a* und *b* wechseln konnte, aber die chemische Natur der Interkonversion war unbekannt. Die Konversion von Phosphorylase *a* zu *b* konnte in vitro gezeigt werden.

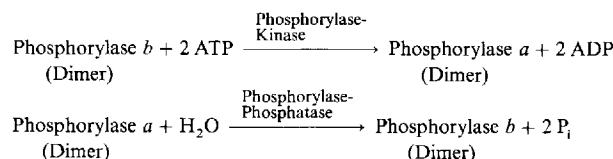
Es wurde angenommen, daß die Richtung der Phosphorylase-Reaktion von den Konzentrationen der Reaktionsteilnehmer bestimmt wird, besonders von der Phosphat(P)-Konzentration. Diese Situation erschwerte die Interpretation der Ergebnisse von Untersuchungen der Interkonversion von Phosphorylase *a* und *b*. Trotzdem ergab sich ein klares Bild von der Wirkungsweise der glycolytischen Hormone Glucagon und Adrenalin und deren Wirkung auf die Interkonversion der Phosphorylaseformen in Leberzellen in den späten vierziger und frühen fünfziger Jahren. Earl Sutherland, der anfangs im Labor der Coris und später unabhängig an der Western Reserve University arbeitete, fand heraus, daß Adrenalin und Glucagon eine schnelle Umwandlung der Leber-Phosphorylase *a* zu *b* bewirken^[5], und er konnte außerdem zeigen, daß Adrenalin die gleiche Umwandlung in Muskeln des Zwerchfells verursacht^[6]. Da Adrenalin und Glucagon als glycogenolytische Hormone bekannt waren, unterstützten die Ergebnisse von Sutherland das Konzept, daß die Aktivierung der Phosphorylase mit dem Glycogenabbau gekoppelt ist. Warum aber sollten elektrische Stimulation und Muskelkontraktion, von denen man wußte, daß auch sie eine Glycogenolyse auslösen, mit der Konversion der Phosphorylase *a* in die inaktive Phosphorylase *b* assoziiert sein^[4]?

In-vitro-Umwandlung der Phosphorylase *b* in Phosphorylase *a* im Skelettmuskel von Kaninchen

Im Herbst 1953 kam Ed Fischer an das Department of Biochemistry der University of Washington, wo ich schon Mitglied der Fakultät war. Ed hatte als Student in Genf an der Phosphorylase aus Kartoffel gearbeitet, und so hatten wir ein gemeinsames Interesse an diesem Enzym. Wir diskutierten einige der verwirrenden Eigenschaften der Phosphorylase und interessierten uns besonders für die noch unerklärte Wirkung von 5'-AMP, d.h. wie 5'-AMP Phosphorylase *b* aktiviert, aber anscheinend unnötig für Phosphorylase *a* ist. Wir beschlossen, neben unseren Hauptinteressen gemeinsame Anstrengungen zu unternehmen, um diesen Punkt aufzuklären. Zuerst wollten wir Phosphorylase *b* bis zur kristallinen Form nach dem Protokoll der Coris reinigen^[7]. Aber unsere anfänglichen Versuche waren erfolglos. Das Enzym wollte nicht kristallisieren, ein Schritt, der für die Reinigung des Enzyms unerlässlich war. Noch verwirrender war die Tatsache, daß das partiell reine Enzym, das wir erhalten, immer in der *b*-Form und nicht in der *a*-Form vorlag. Soweit wir wußten, waren wir dem Protokoll der Coris genau gefolgt, außer daß wir den ursprünglichen Muskelextrakt nicht durch Papierfiltration, sondern durch Zentrifugation geklärt hatten. Obwohl das wie eine triviale Veränderung schien, so übernahmen wir doch den Filtrationsschritt in unserer nächsten Präparation. Zu unserer Überraschung erhielten wir diesmal Phosphorylase *a*, die wie erwartet sehr gut kristallisierte. Aus diesen Resultaten konnten zwei Schlüsse gezogen werden. Erstens enthielten Extrakte aus „ruhendem“ Kaninchenmuskel die Phosphorylase vor allem in der *b*- und nicht in der *a*-Form, wie von den Coris postuliert worden war^[4, 8]; zweitens bewirkte die Filtration von Muskelextrakten durch Papier die Umwandlung von Phosphorylase *b* zu *a* in vitro^[9]. Wir fanden später, daß durch Waschen des Filterpapiers vor Gebrauch die Konversion *b*

zu α verhindert wurde, woraus wir schlossen, daß eine bestimmte Komponente aus dem Papier extrahiert worden war, die diesen Einfluß hatte. Wir fanden zudem, daß auch keine Konversion stattfand, wenn der Muskelextrakt vor der Filtration etwas abstand. Die kritische Komponente des Filterpapiers, die für den Schritt b zu α benötigt wurde, waren Calcium-Ionen, und die essentielle Komponente, die der Extrakt durch längeres Stehen verlor, war ATP.

Da wir jetzt wußten, daß ATP für die Konversion von Phosphorylase b zu α benötigt wird, nahmen wir an, daß wir es mit einer Phospho-Transferase-Reaktion zu tun hatten, während der die terminale Phosphoryl-Gruppe des ATPs entweder auf das Protein selbst oder auf eine an das Enzym gebundene Komponente übertragen wurde, bei der es sich nicht um ein Protein handelt. Es wurde bald deutlich, daß ein „Unwandlungsenzym“ („converting enzyme“), das von Phosphorylase b getrennt werden konnte, für die Reaktion nötig war^[10]. Nachdem bestimmt worden war, daß ADP und Phosphorylase α die Produkte dieser Reaktion waren^[11], nannten wir dieses Enzym Phosphorylase- b -Kinase und nicht mehr „converting enzyme“^[11]. Welche Rolle Calcium-Ionen bei der b -zu- α -Reaktion spielen, war nicht sofort klar; aber bald wurde von einem unserer Studenten, William L. Meyer, herausgefunden, daß die Wirkung dieses Metall-Ions zweifach war: Ca^{2+} wurde für die Aktivierung eines Kinase-aktivierenden Faktors (KAF) benötigt und zusätzlich für die Aktivität der Phosphorylase-Kinase selbst^[12]. Später zeigte ein anderer Student, R. Bruce Huston, daß KAF eine Ca^{2+} -abhängige Protease war^[13]. (Der heutige Name dieser Protease ist Calpain.) Wir bestimmten die Stöchiometrie der Umwandlung von Phosphorylase b in α ^[11] und auch die Aminosäuresequenz, die den phosphorylierten Serin-Rest in Phosphorylase α umgibt^[14]. Es konnte gezeigt werden, daß in der vom PR-Enzym katalysierten Phosphorylase- b -zu- α -Reaktion im Muskel Phosphat frei wird, das PR-Enzym wurde dementsprechend jetzt Phosphorylase-Phosphatase genannt. In den späten fünfziger Jahren war es also möglich, spezifische Gleichungen für die Interkonversion der Muskel-Phosphorylase zu formulieren:



Während derselben Zeit, in der wir an dem Muskel-Phosphorylase-System arbeiteten, wurden unabhängig von uns im Labor von Earl Sutherland an der Western Reserve University ähnliche Experimente mit der Phosphorylase aus Leber durchgeführt. Die wichtigsten Mitarbeiter von Sutherland an diesem Projekt waren Walter D. Wosilait und Theodore W. Rall. In einer frühen Untersuchung^[15] hatten sie herausgefunden, daß anorganisches Phosphat frei wird, wenn partiell gereinigte aktive Leber-Phosphorylase mit – wie sie es bezeichneten – inaktivierendem Enzym inkubiert wird, und sie fanden außerdem, daß, wenn Leberscheiben mit ^{32}P -Phosphat inkubiert werden, Phosphat in die Phosphorylase eingebaut wird. Sie zeigten später, daß beide Inter-

konversionsreaktionen der Leber-Phosphorylase in zellfreien Systemen stattfinden können^[16, 17]. Ein monumental „Nebenbefund“, der aus der Arbeit von Sutherland's Labor über die Leber-Phosphorylase kam, war natürlich die Entdeckung von cyclischem AMP, dem ersten identifizierten sekundären Botenstoff („second messenger“) der Hormonwirkung^[18].

Gab es – bevor das Muskel- und Leber-Phosphorylase-System aufgeklärt wurde – Hinweise dafür, daß Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen für die Zellregulation von Bedeutung sind? Die Existenz von Phosphoproteinen war natürlich schon lange vor 1950 bekannt. Phosphoproteine wurden als „konjugierte Proteine“ klassifiziert, und man vermutete, daß sie hauptsächlich für die Ernährung von Bedeutung sind (z.B. das Casein in der Milch und mehrere Phosphoproteine im Eigelb). Es war auch bekannt, daß Pepsinogen ein mol fest gebundenes Phosphat pro mol Enzym enthält, aber die Bedeutung dessen war (und ist immer noch) nicht klar. Man wußte auch, daß unspezifische Phosphatasen die Abspaltung von Phosphat aus Phosphoproteinen katalysieren können. In einer interessanten Untersuchung, die etwa zur gleichen Zeit wie die Arbeit an der Phosphorylase durchgeführt wurde, beschrieben Burnett und Kennedy ein Enzym, das die Phosphorylierung von Casein katalysierte^[19]. Diese Forscher kannten die hohe Umsatzrate von Phosphat in Proteinen, und sie waren die ersten, die eine Protein-Kinase beschrieben. Im allgemeinen war jedoch die Erkenntnis, daß die Protein-Phosphorylierung und -Dephosphorylierung ein dynamischer Prozeß ist, der die Enzyme beeinflußt und für die Kontrolle des Metabolismus und anderer zellulärer Prozesse wichtig ist, noch nicht vorhanden.

Protein-Phosphorylierung und die Übermittlung extrazellulärer Signale

Wie wir gesehen haben, spielte das Interesse an der Wirkungsweise von Adrenalin und Glucagon eine bedeutende Rolle für die Arbeit über die Interkonversionsreaktionen der Phosphorylase^[5, 6], die wiederum zur Entdeckung der dynamischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen führte. Wenn man noch weiter zurückgeht, bemerkst man, daß die Originalarbeiten der Coris, die zur Entdeckung der Phosphorylase selbst führten, aus einem langwährenden Interesse dieser Forscher an der Bedeutung des Adrenalins für die Regulation des Glycogen-Metabolismus entstanden^[20]. Es war kein Zufall, daß das Interesse an der Hormonwirkung zu Entwicklungen auf dem Gebiet der Protein-Phosphorylierung/Dephosphorylierung beitrug, und wir wissen jetzt, daß eine der wichtigsten Funktionen der Protein-Phosphorylierung als regulatorischer Vorgang die Übermittlung von Signalen ist, die auf die Zelle einwirken. Dies trifft nicht nur auf die Übermittlung von Hormon- und Wachstumsfaktorsignalen zu, sondern auch auf andere Stimulustypen. Ich erwähnte, daß die elektrische Stimulation des Muskels zu einer Veränderung der Protein-Phosphorylierung innerhalb der Zelle führt. Es ist wahrscheinlich kein Zufall, daß das Ausmaß der Protein-Phosphorylierung in eukaryotischen Zellen viel größer ist, als in prokaryotischen und besonders in den eukaryotischen Zellen höherer Tiere, die einer komplexen Regulation von außen unterliegen.

Es war schon ziemlich früh klar, daß die relativen Mengen an Phosphorylase *b* und *a*, die in der Zelle zu irgendeinem Zeitpunkt vorhanden sind, von den relativen Geschwindigkeiten der Phosphorylase-Kinase- und -Phosphatase-Reaktionen abhängen, und man ging davon aus, daß ein oder beide Enzyme einer Regulation unterliegen mußten. Des weiteren waren zwei Faktoren, die das Gleichgewicht zwischen den beiden Formen der Phosphorylase beeinflussen, gefunden worden. Das waren, wie schon erwähnt, Calcium-Ionen, die als Metall-Ionen die Bildung von Phosphorylase *a* in Muskelextrakten bewirken^[19], und cyclo-AMP, das die Phosphorylase-*a*-Bildung in Leberzellen und -homogenaten fördert (siehe Übersichtsartikel^[21]). Wir konnten bald darauf zeigen, daß cyclo-AMP die Bildung von Phosphorylase *a* auch in Muskelextrakten bewirkt^[22]. Im Muskel-System konnte bestimmt werden, daß die Wirkung von Ca^{2+} und cyclo-AMP bei der Stimulation der Phosphorylase-Aktivierung *in vitro* ein Ergebnis der Phosphorylase-Kinase-Aktivierung und nicht der Phosphorylase-Phosphatase-Hemmung ist^[11].

Die Kopplung der Muskelkontraktion an die Glycogenolyse

Der Befund, daß die Hauptform der Phosphorylase in ruhendem Muskel Phosphorylase *b*^[8] und nicht Phosphorylase *a*^[4, 7] ist, und die Erkenntnis, daß Phosphorylase *b* in Phosphorylase *a* umgewandelt werden kann, wenn Ca^{2+} zu einem Muskelextrakt, der ATP enthält, zugefügt wird, ermöglichen eine vernünftige Interpretation der Auswirkung von elektrischer Stimulation auf die Phosphorylase. Im Jahre 1956 konnte Cori zeigen^[23], daß Muskelkontraktion zu einer Umwandlung der Phosphorylase *b* in *a* führt und nicht umgekehrt; das entsprach dem bekannten Effekt der Kontraktion auf den Glycogenabbau. Die Wirkung von Ca^{2+} auf die Aktivierung der Phosphorylase-Kinase passte jetzt gut ins Schema (Abb. 3), wobei dieses Metall-Ion – als Botensubstanz mit der Muskelkontraktion in Verbindung stehend – für die Kopplung der Glycogenolyse (ein energieliefernder Vorgang) an die Kontraktion (ein energieverbrauchender Prozeß) verantwortlich sein könnte. Von den beiden Mechanismen, durch die Ca^{2+} die Phosphorylase-Kinase regulieren könnte, d.h. über limitierte Proteolyse durch KAF oder als Ergebnis eines Bedarfs der Phosphorylase-Kinase selbst für Ca^{2+} ^[12], wurde nur der zweite für

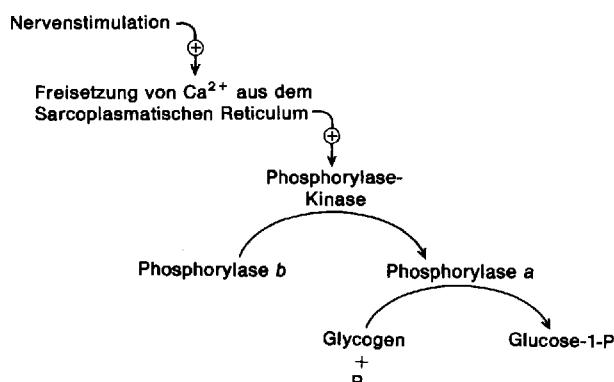


Abb. 3. Die Bedeutung der Calcium-Ionen für die Regulation der Glycogenolyse (ca. 1962).

physiologisch bedeutsam gehalten. Die Arbeit von Ozawa et al.^[24], der den Effekt von Ca^{2+} auf die Phosphorylase-Kinase-Reaktion quantifizierte, war entscheidend für unser Verständnis dieses Vorgangs. Erst viele Jahre später, als man herausfand, daß Calmodulin eine Untereinheit der Phosphorylase-Kinase ist, wurde der wirkliche Mechanismus, durch den Ca^{2+} die Phosphorylase-Kinase stimuliert, klar^[25].

Der Wirkungsmechanismus von cyclo-AMP und von cyclo-AMP-abhängiger Protein-Kinase

Der Mechanismus, durch den cyclo-AMP eine Erhöhung der Phosphorylase-Kinase-Aktivität auslöst, war komplexer als der von Ca^{2+} . Während Ca^{2+} selbst ein essentieller Aktivierungsfaktor in der Phosphorylase-*b*-zu-*a*-Reaktion ist, verursacht cyclo-AMP eine Aktivierung der Phosphorylase-Kinase durch Phosphorylierung. Der erste Hinweis darauf, daß eine Phosphorylierung an der Aktivierung der Kinase beteiligt sein könnte, war der Befund, daß ATP für die Aktivierungsreaktion und den Effekt des cyclo-AMP in Extrakten aus Kaninchenmuskel benötigt wurde^[22]. Der Mitarbeiter, der die ersten Experimente mit ATP ausführte, war der Student Donald J. Graves. Die Aktivierung der Phosphorylase-Kinase aus Muskel war charakterisiert durch eine deutliche Verstärkung der Aktivität bei pH 7 oder darunter und nur einen leichten Anstieg der Aktivität, wenn die *b*-zu-*a*-Reaktion bei höheren pH-Werten durchgeführt wurde. Der Quotient der Aktivität bei pH 6.8 zur Aktivität bei pH 8.2 diente als wertvoller Index für das Ausmaß der Phosphorylase-Kinase-Aktivierung^[26]. War die Phosphorylase-Kinase erst einmal durch Vorinkubation mit ATP aktiviert worden, so war die Gegenwart von cyclo-AMP nicht länger essentiell, was erwartungsgemäß der Fall wäre, wenn die Kinase in einem – von cyclo-AMP stimulierten – Aktivierungsprozeß kovalent verändert wird^[22].

Die Phosphorylase-Kinase wurde hochgradig aufgereinigt und als fast homogenes hochmolekulares Protein ($M_r = 1.2 \times 10^6$) gewonnen, das immer noch durch Vorinkubation mit MgATP aktiviert werden konnte, und zwar in einer Reaktion, die in hohem Maße von cyclo-AMP stimuliert wurde. Obwohl wir Hinweise dafür hatten, daß eine zweite Kinase an dem Aktivierungsvorgang beteiligt ist^[27], so war die Reaktionskinetik doch sehr komplex, und die Arbeit von DeLange et al.^[28] ließ vermuten, daß eine autokatalytische Reaktion vorlag. Die Existenz einer separaten „cyclo-AMP-abhängigen Phosphorylase-Kinase-Kinase“, die die Phosphorylase-Kinase während ihrer Reinigung begleitete, wurde von Donal A. Walsh und John P. Perkins, zwei Postdocs in meinem Labor, bestätigt^[29]. Es gelang ihnen, die neue Kinase aus Kaninchenmuskel-Extrakt um das 200fache anzureichern und sie komplett von der Phosphorylase-Kinase zu trennen. Die Kinase wurde „cyclo-AMP-abhängige Protein-Kinase“ genannt und nicht Phosphorylase-Kinase-Kinase, weil sie über eine breitere Spezifität verfügte, als der restriktivere Name hätte vermuten lassen^[29]. Im Rückblick handelt es sich bei der cyclo-AMP-abhängigen Protein-Kinase wahrscheinlich um die gleiche Aktivität, die Huijing und Larner^[30] bei der cyclo-AMP-abhängigen Glycogen-Synthase-Phosphorylierung beobachtet hatten. Die Tatsache, daß eine cyclo-AMP-abhängige Protein-Kinase von der Phosphorylase-Kinase getrennt werden konnte, ermöglichte

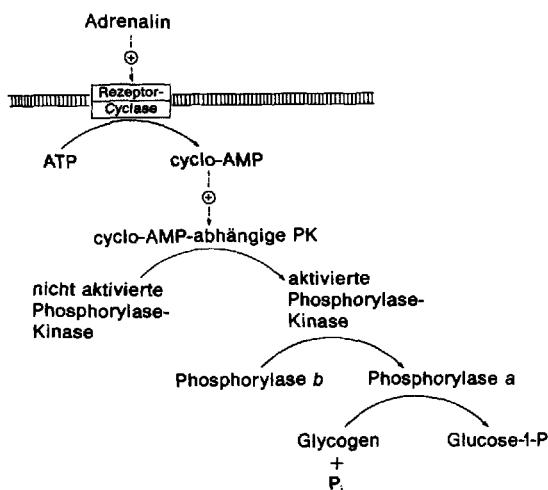


Abb. 4. Die Regulation der Glycogenolyse durch Adrenalin.

es, einen kompletten Kaskaden-Mechanismus zu konstruieren, der die Wirkung des Adrenalins auf die Glycogenolyse verdeutlichte (Abb. 4). Dies war das erste Beispiel einer Protein-Kinase-Kaskade, in der eine Protein-Kinase von einer anderen phosphoryliert und aktiviert wird. Obwohl eine Kaskade potentielle Vorteile bietet (Signalamplifikation, Verzweigungspunkte etc.), wurden seither nur wenige andere Beispiele beschrieben. Vor kurzem jedoch wurde eine komplizierte Multischritt-Protein-Kaskade entdeckt, die an der Wirkung zahlreicher Wachstumsfaktoren beteiligt ist; dieses Thema soll am Ende dieses Vortrags diskutiert werden.

Das Studium der cyclo-AMP-abhängigen Protein-Kinase hat als Prototyp für Arbeiten über Protein-Kinasen allgemein gedient. Diese Kinase besteht aus regulatorischen (R) und katalytischen (C) Untereinheiten und hat die allgemeine Struktur R_2C_2 . Im nächsten Vortrag wird Ed Fischer über den Mechanismus berichten, durch den cyclo-AMP die Aktivität der Kinase reguliert. Die katalytische Untereinheit dieses Enzyms war die erste Protein-Kinase, deren komplett Aminosäuresequenz bestimmt wurde^[31], und sie war auch die erste Protein-Kinase, deren Struktur durch Röntgenkristallographie bestimmt werden konnte^[32]. Die cyclo-AMP-abhängige Protein-Kinase spielte auch eine sehr wichtige Rolle für unser Verständnis der Protein-Kinase-Spezifität, was im Hinblick auf die enorm wachsende Zahl der bekannten Kinasen von großer Bedeutung war. Ich kann dieses Thema hier nur anreißen und erwähnen, daß die cyclo-AMP-abhängige Protein-Kinase die erste Kinase war, für die eine Consensus-Phosphorylierungssequenz bestimmt werden konnte^[33–37]. Diese Sequenz, Arg-Arg-X-Ser-X, wird in vielen, aber nicht allen Substraten der cyclo-AMP-abhängigen Protein-Kinase gefunden. Bei der Erwähnung der Spezifitätsuntersuchungen, die in meinem Labor durchgeführt wurden, möchte ich auch die besondere Aufmerksamkeit auf die Arbeiten von David B. Bylund und Bruce E. Kemp lenken.

Eine Serin/Threonin-Protein-Kinase-Kaskade, die als Antwort auf Insulin und verwandte Wachstumsfaktoren aktiviert wird

Eines der großen Probleme in der Endokrinologie ist der Wirkungsmechanismus von Insulin gewesen. Die Forschung

war schon Jahrzehntelang an diesem Problem interessiert, und über die Jahre sammelte sich eine Fülle von Information zu diesem Thema an. Zuerst wurden Experimente mit Tieren durchgeführt, später mit perfundierten Organen, dann mit isoliertem Gewebe, z.B. Zwerchfellmuskel, und schließlich mit Zellkulturen. Erst relativ spät wurde es möglich, eine aussagekräftige Antwort auf Insulin in Homogenaten oder anderen zellfreien Systemen zu provozieren. Vor etwa zehn Jahren fand man, daß der EGF-Rezeptor (EGF = epidermal growth factor; dtsh: epidermaler Wachstumsfaktor) eine Protein-Tyrosin-Kinase ist, und kurz danach stellte sich heraus, daß dies auch für den Insulin-Rezeptor gilt^[38, 39]. Heute weiß man, daß acht oder neun Wachstumsfaktor-Rezeptoren Protein-Tyrosin-Kinasen sind. Diese Ergebnisse leiteten ein neue Ära der Forschung über Insulin und verwandte Hormone sowie Wachstumsfaktoren ein. Obwohl viele auf diesem Gebiet arbeitende Wissenschaftler glaubten, es würde jetzt einfach sein, Substrate für diese Rezeptoren/Kinasen zu identifizieren und den gesamten intrazellulären Signalübertragungsweg aufzuklären, passierte dies nicht. Einige am Tyrosin phosphorylierte Proteine wurden in – mit Insulin oder anderen Wachstumsfaktoren behandelten – Zellen gefunden, aber keines der Proteine wurde sogleich mit den bekannten zellulären Wirkungen der Wachstumsfaktoren in Verbindung gebracht. Trotzdem konnte klar gezeigt werden, daß die Protein-Tyrosin-Kinase-Aktivität dieser Rezeptoren unerlässlich für deren Wirkung ist, und man zweifelte nicht daran, daß am Anfang der Signalkette die ligandenstimulierte Tyrosin-Phosphorylierung steht.

Ein Forscher, der an den einzelnen Schritten der Signalübertragungswege interessiert ist, kann entweder „stromabwärts“ von einem Rezeptor ausgehend arbeiten und die Komponenten des Wegs identifizieren, oder er arbeitet „stromaufwärts“ auf den Rezeptor zu und beginnt mit den wohlbekannten zellulären Wirkungen des betreffenden Wachstumsfaktors. Eine Vielzahl von Arbeitsgruppen, meine eigene eingeschlossen, die an den Signalen von Insulin- oder verwandten Rezeptoren interessiert sind, haben die zweite Strategie eingesetzt. Der spezielle zelluläre Effekt, den diese Gruppen zu ihrem Ausgangspunkt gemacht haben, ist die Aktivierung von Serin- und Threonin-Protein-Kinasen, die aus der Stimulierung der Tyrosin-Kinasen folgt. Man wußte seit langem, daß die Stimulierung von Protein-Kinasen in der Zelle zu Veränderungen der Serin/Threonin- und der Tyrosin-Phosphorylierung führt, aber der Mechanismus, durch den diese beiden Typen der Protein-Phosphorylierung gekoppelt sind, war nicht bekannt^[40].

Eines der zellulären Proteine, das nach Stimulation von Rezeptoren mit Tyrosin-Kinase-Aktivität an Serin-Resten phosphoryliert wird, ist das ribosomale Protein S6. Allerdings ist die Bedeutung der Phosphorylierung für die Regulation der Proteinsynthese unklar. Dieses Phänomen war vor einigen Jahren entdeckt worden, kurz bevor sich mein eigenes Labor mit dem Problem zu beschäftigen begann; ein guter Anfang war schon damals mit der Identifizierung der Komponenten gemacht, die an der Regulation der S6-Phosphorylierung beteiligt sind. Beispielsweise war gezeigt worden, daß in Adipozyten oder Swiss-3T3-Zellen durch Insulin eine S6-Kinase aktiviert wird^[41, 42], und es fanden sich Beweise dafür, daß die Aktivierung durch kovalente Modifikation, d.h. Phosphorylierung, eingeleitet wird. Man konnte

zeigen, daß die Serin/Threonin-Phosphatasen die aktivierte Proteine inaktivieren^[43, 44]. Maller et al. hatten gefunden, daß eine bis zur Homogenität aus *Xenopus laevis*-Eiern gereinigte S6-Kinase (S6-Kinase II) auch durch Protein-Phosphatasen inaktiviert werden kann^[45]. Interessanterweise konnte diese S6-Kinase von einer anderen Serin/Threonin-Kinase, der Mikrotubuli-assozierten-Protein-2-Kinase (MAP-Kinase) reaktiviert werden; von dieser wußte man, daß sie durch Insulinbehandlung von 3T3-L1-Zellen stimuliert wird^[46]. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, daß eine Serin/Threonin-Kinase-Kaskade existiert, bei der eine Wachstumsfaktor-aktivierte Protein-Kinase eine zweite Protein-Kinase phosphoryliert und aktiviert. Gregory et al.^[47] bestätigten diese Ergebnisse für eine Phosphatase-behandelte S6-Kinase aus Kaninchenleber und eine MAP-Kinase aus Insulin-stimulierten Ratten-1-HIR_c-B-Zellen. Dann zeigte unsere Gruppe, daß eine EGF- oder Insulin-stimulierte MAP-Kinase aus Swiss-3T3-Zellen eine S6-Kinase aus demselben Zelltyp phosphorylieren und aktivieren kann^[48]. Die MAP-Kinase in ihrer aktivierte Form schien durch Serin/Threonin-Phosphorylierung aktiviert zu werden, da sie von der Protein-Phosphatase 2A inaktiviert werden konnte. Dies ließ sogar die Existenz einer dritten Serin/Threonin-Kinase bei dem Wachstumsfaktor-stimulierten Prozeß vermuten.

Ein sehr wichtiges Ergebnis aus dem Labor von Sturgill war, daß die MAP-Kinase in ihrer aktiven Form sowohl Phosphotyrosin als auch Phosphothreonin enthält und daß sie – zusätzlich zur Inaktivierung durch die Protein-Phosphatase 2A – auch von CD45, einer Tyrosin-Phosphatase, inaktiviert werden kann^[49]. Diese Forscher konnten auch zeigen, daß die Phosphorylierung der MAP-Kinase an Tyrosin und Threonin essentiell für ihre Aktivität ist, und es schien wahrscheinlich, daß zwei Typen von Protein-Kinase d.h. eine Serin/Threonin-Kinase und eine Tyrosin-Kinase, an ihrer Aktivierung „stromaufwärts“ beteiligt sind. Es gab jedoch keinen Beweis dafür, daß eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase eine dieser beiden Kinasen sein konnte. Es war daher wichtig, nach einem oder mehreren Enzymen, MAP-Kinase-Kinasen, zu suchen, die die MAP-Kinase-Phosphorylierung und -Aktivierung katalysieren.

In unserem Labor entdeckten Natalie Ahn et al.^[50] zwei voneinander trennbare Proteinfaktoren aus Swiss-3T3-Zellen, die die Aktivierung einer inaktiven Form der MAP-Kinase in vitro katalysieren. Jeder dieser Faktoren benötigte MgATP, um die MAP-Kinase zu aktivieren, und es war gleichgültig, ob die MAP-Kinase zuerst von einer Serin/Threonin-Phosphatase oder von einer Tyrosin-Phosphatase inaktiviert worden war. Dadurch erschien wahrscheinlich, daß es sich bei diesen Faktoren um „dual-specificity“-Kinasen handelte, die Proteine sowohl an Serin- oder Threonin-Resten als auch an Tyrosin-Resten phosphorylieren. Solche Kinasen waren tatsächlich in Hefen gefunden worden. Zuerst zögerten wir, die aktivierenden Faktoren „MAP-Kinase-Kinasen“ zu nennen, weil wir in der von Rony Seger et al.^[51] ausgeführten Arbeit gefunden hatten, daß die MAP-Kinase langsam aber deutlich autophosphoryliert werden kann, d.h. sie kann ihre eigene Phosphorylierung von Tyrosin- und Threonin-Resten katalysieren. Die Autophosphorylierung führt zur Aktivierung der Kinase. Dieses Ergebnis zeigte, daß eine MAP-Kinase-Kinase vielleicht unnötig ist und daß die nächste „stromaufwärts“-Komponente ein Proteinaktivator sein könnte, der die Autophosphorylierung sti-

mulierte. Es wurde bald gezeigt, daß die MAP-Kinase-Aktivatoren tatsächlich Protein-Kinasen sind, die eine Mutantenform der MAP-Kinase, die keine enzymatische Aktivität aufweist, phosphorylieren können^[52, 53]. Auch die Aminosäuresequenz-Daten aus unserem und anderen Laboratorien zeigten, daß die Aktivatoren Protein-Kinase-Sequenzmotive enthielten. Später wurden ähnliche „Aktivatoren“, d.h. MAP-Kinase-Kinasen, in PC12-Zellen gefunden, die durch Nervenwachstumsfaktoren oder Bradykinin stimuliert wurden waren^[54, 55]. Gomez und Cohen zeigten, daß die aktivierte MAP-Kinase-Kinase von einer Serin/Threonin-Phosphatase inaktiviert werden konnte, aber nicht von einer Tyrosin-Phosphatase^[54]. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, daß eine zusätzliche Serin/Threonin-Kinase „stromaufwärts“, d.h. wahrscheinlich eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase an diesem Weg beteiligt ist. Der gegenwärtige Stand der MAP-Kinase-Kaskade wird – ohne die vermutete MAP-Kinase-Kinase-Kinase – in Abbildung 5 gezeigt.

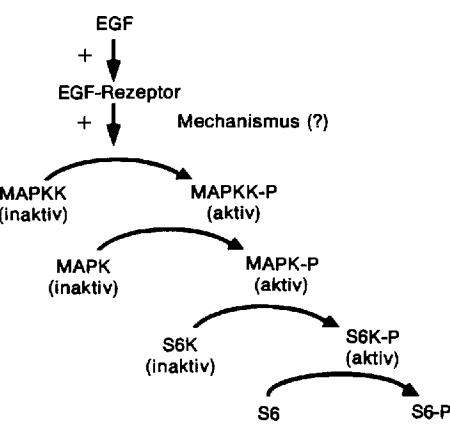


Abb. 5. Die MAP-Kinase-Kaskade. EGF = epidermaler Wachstumsfaktor; MAP = Mikrotubuli-assoziertes Protein, K = Kinase, S6 = ribosomales Protein S6.

Viele Laboratorien arbeiten gegenwärtig sehr intensiv an der Identität der MAP-Kinase-Kinase-Kinase und dem Mechanismus, durch den solch ein Enzym reguliert werden könnte. Von Kyriakis et al. wurde berichtet, daß Raf-1 die MAP-Kinase-Kinase aktiviert und daher als Kinase-Kinase-Kinase in Betracht kommt^[56]. Dieses Ergebnis wurde von Dent et al.^[57] bestätigt. Andere Untersuchungen wiesen darauf hin, daß cdc2 eine „stromaufwärts“-Komponente der MAP-Kinase-Kaskade, aber nicht die Kinase-Kinase-Kinase selbst sein könnte^[58]. Schließlich gibt es Beweise dafür, daß p21 ras an irgendeiner Stelle zwischen Rezeptor und den Komponenten der kürzlich identifizierten Kaskade wirkt^[59–62]. Ein etwas vernachlässigter Sektor auf dem Gebiet der MAP-Kinase-Kaskade ist die Frage nach ihrer genauen Funktion und den Gründen für die Existenz eines so komplizierten Schemas. Es ist wahrscheinlich, daß für jede der Protein-Kinasen einer solchen Kaskade mehrere Substrate existieren, und es ist in diesem Zusammenhang interessant, daß mehrere Transkriptionsfaktoren als Substrat für die MAP-Kinase und die S6-Kinase gelten. Die einzelnen Kinasen dürften wohl auch bestimmte metabolische Enzyme als Substrat haben, die bisher noch nicht identifiziert werden konnten. Schließlich könnten einige der Kinasen wiederum andere Kinasen regulieren^[63].

Schlußfolgerung

Ich habe versucht, die frühen Arbeiten über die Interkonversionsreaktionen der beiden Formen der Glycogen-Phosphorylase und Phosphorylase-Kinase zusammenzufassen. Ein drittes Enzym, das eine wichtige Rolle in den frühen Arbeiten über Phosphorylierung und Dephosphorylierung spielte, war die Glycogen-Synthase. Ein großer Teil der Forschung über dieses Enzym wurde von Joseph Larner et al. während der frühen sechziger Jahre durchgeführt. Sie fanden heraus, daß – im Gegensatz zur Wirkung der Phosphorylierung auf die Phosphorylase und Phosphorylase-Kinase – die Phosphorylierung der Synthase einen Aktivitätsabfall zur Folge hat. Da das Gebiet der Protein-Phosphorylierung während der ersten zehn Jahre von denen dominiert war, die am Glycogen-Metabolismus arbeiteten, glaubten manche, daß die Regulation von Enzymen über Phosphorylierung-Dephosphorylierung auf dieses Gebiet beschränkt sei. Aber durch die Entdeckung einer multifunktionellen cyclo-AMP-abhängigen Protein-Kinase, die – wie Kuo und Green-gard^[64] sehr schnell fanden – weitverbreitet in der Natur ist, mußte diese Einschätzung aufgegeben werden.

Eine andere wichtige Entdeckung, die auf eine weite Verbreitung der Protein-Phosphorylierung hinwies, war die der Regulation der Pyruvat-Kinase durch Phosphorylierung^[65]. Wie man in Abbildung 6 sehen kann, wuchs die Zahl der Enzyme, die durch Phosphorylierung reguliert wurden, in den siebziger Jahren stark an. Wenn man die Protein-

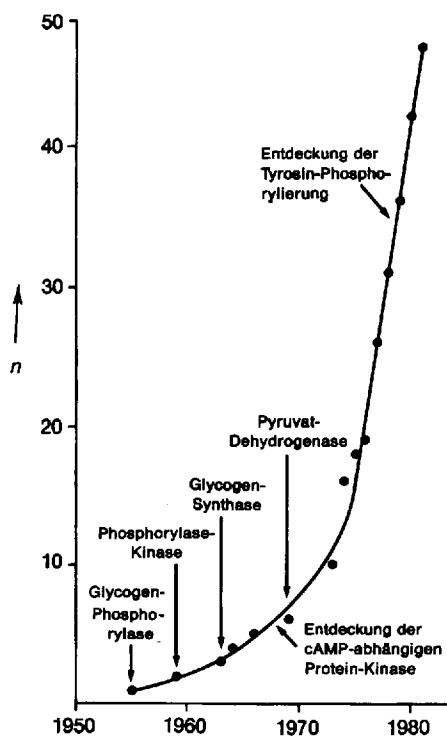


Abb. 6. Die wachsende Bedeutung der Protein-Phosphorylierung als Mechanismus der Enzymregulation. Aufgetragen ist die Zahl n der im jeweiligen Jahr bekannten, durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung regulierten Enzyme.

Phosphorylierung nicht-enzymatischer Proteine hinzuzählen würde, wäre die Kurve in Abbildung 6 noch steiler. Anschließend wird Ed Fischer einige der Entwicklungen beschreiben, die zu dieser Explosion beigetragen haben. Ich

nehme an, daß er auch einige der Irrtümer, die ich im historischen Abriß unserer gemeinsamen Arbeit gemacht habe, „korrigieren“ wird.

Ich möchte diesen Vortrag meinen Eltern, für die die Erziehung ihrer Kinder ein wichtiges Ziel im Leben war, und meiner Frau Deedy, die mich immer unterstützt hat, widmen. Anerkennen möchte ich die wichtigen Beiträge meiner zahllosen talentierten, zum Teil hier ungenannten Studenten und Postdoktoranden, die die meisten der erwähnten Experimente durchgeführt und die Richtung der Untersuchungen mitbestimmt haben.

Eingegangen am 12. Februar 1993 [A912]
Übersetzt von Dr. Christiane Koszka, Berlin

- [1] C. Cori, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1939**, 7, 260–268.
- [2] G. T. Cori, A. A. Green, *J. Biol. Chem.* **1945**, 158, 321–332.
- [3] G. T. Cori, C. F. Cori, *J. Biol. Chem.* **1943**, 151, 31–38.
- [4] G. T. Cori, *J. Biol. Chem.* **1945**, 158, 333–339.
- [5] E. W. Sutherland, C. F. Cori, *J. Biol. Chem.* **1951**, 188, 531–543.
- [6] E. W. Sutherland, *Recent Prog. Horm. Res.* **1950**, 441–463.
- [7] A. A. Green, G. T. Cori, *J. Biol. Chem.* **1943**, 151, 21–29.
- [8] E. G. Krebs, E. H. Fischer, *J. Biol. Chem.* **1955**, 216, 113–120.
- [9] E. H. Fischer, E. G. Krebs, *J. Biol. Chem.* **1955**, 216, 121–132.
- [10] E. G. Krebs, E. H. Fischer, *Biochim. Biophys. Acta* **1956**, 20, 150–157.
- [11] E. G. Krebs, A. B. Kent, E. H. Fischer, *J. Biol. Chem.* **1958**, 231, 78–83.
- [12] W. L. Meyer, E. H. Fischer, E. G. Krebs, *Biochemistry*, **1964**, 3, 1033–1039.
- [13] R. B. Huston, E. G. Krebs, *Biochemistry* **1968**, 7, 2116–2122.
- [14] E. H. Fischer, D. J. Graves, E. R. S. Crittenden, E. G. Krebs, *J. Biol. Chem.* **1959**, 234, 1698–1704.
- [15] E. W. Sutherland, W. D. Wosilait, *Nature* **1955**, 175, 169.
- [16] T. W. Rall, E. W. Sutherland, W. D. Wosilait, *J. Biol. Chem.* **1956**, 218, 483.
- [17] W. D. Wosilait, *J. Biol. Chem.* **1958**, 233, 597.
- [18] E. W. Sutherland, T. W. Rall, *J. Biol. Chem.* **1958**, 233, 1077–1091.
- [19] G. Burnett, E. P. Kennedy, *J. Biol. Chem.* **1954**, 211, 969–988.
- [20] C. F. Cori, G. T. Cori, *J. Biol. Chem.* **1928**, 79, 309–355.
- [21] E. W. Sutherland, *The Harvey Lectures, Series 57*, Academic Press, New York, **1962**, S. 17–33.
- [22] E. G. Krebs, D. J. Graves, E. H. Fischer, *J. Biol. Chem.* **1959**, 234, 2867–2873.
- [23] C. F. Corin, *Enzymes: Units of Biological Structure and Function* (Hrsg.: O. H. Gaebler), Academic Press, New York, **1956**, S. 573.
- [24] E. Ozawa, K. Hosoi, S. Ebashi, *J. Biochem.* **1967**, 61, 531–533.
- [25] R. J. A. Grand, S. Shenolikar, P. Cohen, *Eur. J. Biochem.* **1981**, 113, 359–367.
- [26] J. B. Posner, R. Stern, E. G. Krebs, *J. Biol. Chem.* **1965**, 240, 982–985.
- [27] E. G. Krebs, R. J. DeLange, R. G. Kemp, W. D. Riley, *Pharmacol. Rev.* **1966**, 18, 163–171.
- [28] R. J. DeLange, R. G. Kemp, W. D. Riley, R. A. Cooper, E. G. Krebs, *J. Biol. Chem.* **1968**, 243, 2200–2208.
- [29] D. A. Walsh, J. P. Perkins, E. G. Krebs, *J. Biol. Chem.* **1968**, 243, 3763–3765.
- [30] F. Huijing, J. Larner, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1966**, 23, 259–263.
- [31] S. Shoji, D. C. Parmelee, R. D. Wade, S. Kumar, L. H. Ericsson, K. A. Walsh, H. Neurath, G. L. Long, J. G. DeMaille, E. H. Fischer, K. Titani, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1981**, 78, 848–851.
- [32] D. R. Knighton, J. Zheng, L. F. T. Eyck, V. A. Ashford, N.-H. Xuong, S. S. Taylor, J. M. Sowadski, *Science*, **1991**, 253, 407–414.
- [33] B. E. Kemp, D. B. Bylund, T. S. Huang, E. G. Krebs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1975**, 72, 3448–3452.
- [34] E. Humble, L. Berglund, V. Titanji, O. Ljunstrom, B. Edlund, O. Zetterquist, L. Engstrom, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, 66, 614–621.
- [35] P. Daile, P. R. Carnegie, J. D. Young, *Nature* **1975**, 257, 416–418.
- [36] O. Zetterquist, U. Ragnarsson, E. Humble, L. Berglund, L. Engstrom, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1976**, 70, 696–703.
- [37] B. E. Kemp, D. J. Graves, E. Benjamin, E. G. Krebs, *J. Biol. Chem.* **1977**, 252, 4888–4894.
- [38] S. Cohen, G. Carpenter, L. E. King, Jr., *J. Biol. Chem.* **1980**, 255, 4834–4842.
- [39] M. Kasuga, Y. Zick, D. L. Blithe, F. A. Karlsson, H. U. Häring, C. R. Kahn, *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 9891–9894.
- [40] R. M. Denton, *Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* **1986**, 293–341.
- [41] M. H. Cobb, O. M. Rosen, *J. Biol. Chem.* **1982**, 258, 12472–12481.
- [42] I. Novak-Hofer, G. Thomas, *J. Biol. Chem.* **1984**, 259, 5995–6000.
- [43] L. M. Ballou, P. Jenö, G. Thomas, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 1188–1194.
- [44] L. M. Ballou, M. Siegmund, G. Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 7154–7158.

- [45] J. L. Andres, J. L. Maller, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 151–156.
 [46] T. W. Sturgill, L. B. Ray, E. Erickson, J. L. Maller, *Nature* **1988**, *334*, 715–718.
 [47] J. S. Gregory, T. G. Boulton, B.-C. Sang, M. H. Cobb, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 18397–18401.
 [48] N. G. Ahn, E. G. Krebs, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 11495–11501.
 [49] N. G. Anderson, J. L. Maller, N. K. Tonks, T. W. Sturgill, *Nature* **1990**, *343*, 651–653.
 [50] N. G. Ahn, R. Seger, R. L. Bratlien, C. D. Diltz, N. K. Tonks, E. G. Krebs, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 4220–4227.
 [51] R. Seger, N. G. Ahn, T. G. Boulton, G. D. Yancopoulos, N. Panayotatos, E. Radziejewska, L. Ericsson, R. L. Bratlien, M. H. Cobb, E. G. Krebs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 6142–6146.
 [52] J. Posada, J. A. Cooper, *Science* **1992**, *255*, 212–215.
 [53] R. Seger, N. G. Ahn, J. Posada, E. S. Munar, A. M. Jensen, J. A. Cooper, M. H. Cobb, E. G. Krebs, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 14373–14381.
 [54] N. Gomez, P. Cohen, *Nature* **1991**, *351*, 69–72.
 [55] N. G. Ahn, D. J. Robbins, J. W. Haycock, R. Seger, M. H. Cobb, E. G. Krebs, *J. Neurochem.* **1992**, *59*, 147–156.
 [56] J. M. Kyriakis, H. App, X. Zhang, P. Banerjee, D. L. Brautigan, U. R. Rapp, J. Avruch, *Nature* **1992**, *358*, 417–421.
 [57] P. Dent, W. Haser, T. A. J. Haystead, L. A. Vincent, T. M. Roberts, T. W. Sturgill, *Science* **1992**, *257*, 1404–1406.
 [58] S. Matsuda, H. Kosako, K. Takenaka, K. Moriyama, H. Sakai, T. Akiyama, Y. Gotoh, E. Nishida, *EMBO J.* **1992**, *11*, 973–982.
 [59] S. M. Thomas, M. DeMarco, G. D'Arcangelo, S. Halegoua, J. S. Brugge, *Cell* **1992**, *68*, 1031–1040.
 [60] K. W. Wood, C. Sarnecki, T. M. Roberts, J. Blenis, *Cell* **1992**, *68*, 1041–1050.
 [61] A. M. M. deVries-Smits, B. M. T. Burgering, S. J. Leevers, C. J. Marshall, J. L. Bos, *Nature* **1992**, *357*, 602–604.
 [62] D. J. Robbins, M. Cheng, E. Zhen, C. A. Vanderbilt, L. A. Feig, M. H. Cobb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 6924–6928.
 [63] D. Stokoe, D. G. Campbell, S. Nakielny, H. Hidaka, S. J. Leevers, C. Marshall, P. Cohen, *EMBO J.* **1992**, *11*, 3985–3994.
 [64] J. F. Kuo, P. Greengard, *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 3417–3419.
 [65] T. C. Linn, F. H. Pettit, F. Hucho, L. J. Reed, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1969**, *64*, 227–234.

... meine
ANGEWANDTE
CHEMIE
gehört zu mir !

Willy P., Doktorand,
neue Routen zur Spitzenforschung
erkundend - zuverlässige Orientierung gibt
ihm sein ganz persönliches Exemplar der
ANGEWANDTEN

Bestellen auch Sie gleich Ihr
persönliches Abonnement der Angewandten!
Anruf beim VCH-Leserservice genügt:
0 62 01/ 606-199 (Fax -117).

VCH